

**Untersuchungen zur Entwicklung
der Laterallinie beim Zebrafisch
*Danio rerio***

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades

der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der Universität zu Köln

vorgelegt von

Anne Groth

aus Osterode am Harz

Köln 2002

Berichterstatter: Prof. Dr. J. A. Campos-Ortega
Prof. Dr. S. Roth

Tag der mündlichen Prüfung: 12.02.200

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1 Das Lateralliniensystem: Ursprung, Aufbau und Funktion	1
1.1.1 Zelluläre Zusammensetzung der Neuromasten.....	2
1.1.2 Innervierung der Neuromasten.....	4
1.1.3 Weitere Sinnesorgane.....	6
1.2 Ontogenese des Lateralliniensystems: morphologische und genetische Aspekte	7
1.2.1 Plakoden.....	7
1.2.2 Primordien.....	8
1.2.3 Wanderung der Primordien.....	10
1.2.4 Genetische und molekulare Analyse der Neuromasten-Entwicklung.....	11
1.3 Der Zebrafisch als Modellsystem	13
1.4 Zielsetzung der vorliegenden Arbeit	15
2. Material&Methoden	16
2.1 Zur Haltung und Zucht des Zebrafisches	16
2.2 Puffer, Materialien und Lösungen	17
2.3 Methoden	22
2.3.1 Bestimmung der Entwicklungsstadien.....	22
2.3.2 Betäubung von Fischembryonen und –larven.....	22
2.3.3 Fixierung.....	22
2.3.4 Histologische Färbemethoden.....	23

Inhaltsverzeichnis

2.3.4.1 DASPEI-Färbung.....	23
2.3.4.2 Fuchsin-Färbung.....	23
2.3.4.3 <i>whole mount</i> Immunohistochemie.....	24
2.3.4.4 <i>whole mount-in situ</i> Hybridisierungen.....	26
2.3.4.5 <i>Tunel</i> -Färbung.....	27
2.3.5 Herstellung Digoxigenin-markierter RNA-Sonden.....	28
2.3.6 Herstellung Gelatine-beschichteter Objektträger.....	29
2.3.7 Einbettungen in Durcapan.....	30
2.3.8 Einbettungen in Glycerin.....	30
2.3.9 Semidünnschnitte.....	30
2.4 Zellmarkierungen.....	31
2.4.1 Verwendete Fluoreszenzfarbstoffe.....	31
2.4.2 Durchführung der Zellinjektionen.....	32
2.4.3 Bestimmung der Injektionskoordinaten.....	33
2.5 Konfokale Mikroskopie.....	37
2.6 Verwendete Zebrafischstämme.....	37
2.7 Abkürzungen, Symbole und Konventionen.....	38
3. Ergebnisse.....	40
3.1 Die embryonale Laterallinie.....	40
3.1.1 Das Verteilungsmuster der primären Neuromasten.....	40
3.1.2 Primäre Neuromasten gehen aus einem	

Inhaltsverzeichnis

gemeinsamen Primordium hervor.....	42
3.1.3. Mitosen und Zelltod im Primordium und den Proneuromasten.....	50
3. 2 Zur Bildung der postembryonalen Laterallinie.....	52
3.2.1. Das Erscheinen sekundärer Neuromasten.....	52
3.2.2 Ein sekundäres Primordium generiert sekundäre Neuromasten.....	56
3.2.2.1 Fuchsin-Färbungen.....	60
3.2.2.2 Verdopplungen von Neuromasten.....	63
3.2.3. Ventrale Verlagerung der Rumpflinie.....	67
3.3 Untersuchungen zur Herkunft der Primordien.....	69
3.3.1 <i>pea3</i> -Expression in der postotischen Plakode und dem Primordium.....	69
3.3.2 Die Markierungsexperimente.....	74
3.3.2.1 Die Zelltypen der Laterallinie.....	76
3.3.2.2 Vorläufer des ersten Primordiums liegen im nicht neuralen Ektoderm.....	79
3.3.2.3 Die Zellen der Laterallinie gehen aus der postotischen Plakode hervor.....	82
3.3.2.4 Der Ursprung beider Primordien liegt im Plakodengewebe.....	85
3.3.2.5 Mosaikzusammensetzung der Neuromasten.....	87
3.3.2.6 Eine Beteiligung der Neuralleistenzellen bei der Generierung von <i>Schwann</i> -Zellen.....	88
4. Diskussion.....	90

Inhaltsverzeichnis

4.1 Allgemeine Betrachtungen.....	90
4.1.1 Zum Wanderverhalten der Primordien.....	91
4.1.2 Zellteilungen innerhalb der Primordien.....	92
4.2. Zur Bildung des postembryonalen Lateralliniensystems.....	94
4.3 Zum Ursprung der Primordien.....	96
4.4 Eine Beteiligung der Neuralleiste an der Bildung der Laterallinie – binäre Herkunft der Gliazellen?.....	98
5. Literatur.....	101
6. Anhang	

1. Einleitung

1.1 Das Lateralliniensystem: Ursprung, Aufbau und Funktion

Ein nur bei Fischen und aquatischen Amphibien entwickeltes Sinnessystem ist das Seitenlinienorgan (Schulze, 1870; Wright, 1951, Coombs *et al.*, 1989), ein mechanorezeptives Sinnessystem zur Wahrnehmung von Schwingungen unter Wasser. Es dient der Detektion und Lokalisation von Bewegungen, wird aber auch zur Ortung von ruhenden Gegenständen aufgrund der Reflexion von Wasserströmungen genutzt (Czihak *et al.*, 1990).

Das einzelne Sinnesorgan, das diesem System zu Grunde liegt, ist der Neuromast. Er kann entweder oberflächlich auf der Haut oder direkt unterhalb der Epidermis in flüssigkeitsgefüllten Kanälen versenkt liegen. Die in Kanalsystemen eingebetteten Neuromasten kommunizieren nur noch über Poren mit dem Außenmedium. Das Versenken des Neuromasts unter die Epidermis dient dem Schutz des sensiblen Sinnesorgans vor Wasserströmungen. So bilden schnelle Schwimmer die kompliziertesten und am stärksten verzweigten Kanalsysteme aus (Diedershagen, 1995).

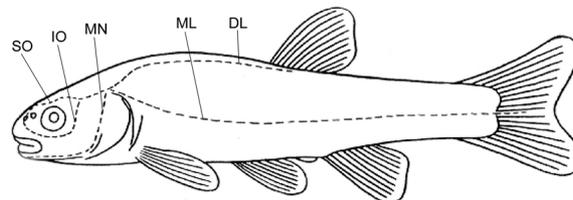


Abb. 1.1 Lage der Hauptlinien des Lateralliniensystems der Knochenfische. Das System besteht aus der supraorbitalen (SO), infraorbitalen (IO) und der mandibularen (MN) Linie des Kopfes und der dorsalen (DL) sowie der mittleren (ML) Linie des Rumpfes. Aus Czihak *et al.*, 1990

Die Neuromasten sind in einem regelmäßigen und wiederkehrenden Muster über den Kopf und Rumpf der Tiere verteilt. Die auffällige Anordnung von Neuromasten in longitudinal verlaufenden Linien war namensgebend für das Seitenlinien- bzw. Lateralliniensystem. Die sog. anteriore Laterallinie (ALL) rostral zum Ohr beinhaltet die supraorbitale, die infraorbitale, und die mandibulare Kopflinie um Auge, Kiefer und Operkulum (siehe **Abb. 1.1**). Die posteriore Laterallinie (PLL) umfasst drei an der

Flanke des Tieres verlaufende Linien, wobei die erste dorsal, die zweite mittig und die dritte ventral verläuft. Bei Fischen sind Neuromasten auch auf der Schwanzflosse ausgebildet.

1.1.1 Zelluläre Zusammensetzung der Neuromasten

Die mechanorezeptive Komponente eines Neuromasts ist die Haarzelle, ein Zelltyp, der bei allen heutigen Vertebraten auch im Gehörorgan zu finden ist.

Fossilfunde belegen, dass schon vor 500 Millionen Jahren in kieferlosen Fischen vermutlich Haarzellen nicht nur im Seitenlinienorgan, sondern auch in den semizirkulären Kanälen und den Schweresinnesorganen des Innenohrs eine Funktion hatten (Corwin *et al.*, 1991). Dies lässt einen gemeinsamen, entwicklungsgeschichtlichen Ursprung der beiden Sinnessysteme vermuten. Die Frage, ob sich das Innenohr als Variation aus der Laterallinie der Fische entwickelt hat (Acousticolateralis-Hypothese; Van Bergeijk, 1967), oder ob Ohr und Seitenlinie parallel, aber unabhängig voneinander, aus einem gemeinsamen primitiven System heraus entstanden sind (Wever, 1974), ist bis heute umstritten (Streit, 2001).

Obwohl eine phylogenetische Beziehung zwischen Ohr und Laterallinie bisher weder bewiesen noch eindeutig widerlegt werden konnte, ist eine funktionelle Überlappung der beiden Systeme jedoch offensichtlich: Beide Sinnessysteme basieren auf Haarzellen als Rezeptoren und sind in der Lage, Wasserschwingungen zu detektieren. Auch der Frequenzbereich beider Systeme überlappt, wobei die Laterallinie einen niederfrequenten Bereich von wenigen Hertz bis ungefähr 200 Hertz abdeckt und der Wahrnehmungsbereich des Ohres von einem hochfrequenten Frequenzbereich von wenigen Hertz bis zu mehreren 1000 Hertz reicht.

Der Aufbau der Haarsinneszelle wird in **Abb. 1.2** beispielhaft an der schematischen Darstellung einer Haarzelle des auditorischen Systems gezeigt. Sie besitzen an ihrer apikalen Oberfläche ein Bündel von 30 bis 300 aktin-reichen Stereocilien, die dichtgepackt ihrer Länge entsprechend in Reihen angeordnet liegen, mit den kürzesten Stereocilien auf der einen Seite und zunehmend längeren Stereocilien hin zur gegenüberliegenden Seite. Direkt benachbart zu den längsten Stereocilien steht ein einzelnes Kinocilium, eine echte und unbewegliche Cilie. Die Stereo- und Kinocilien

der Rezeptorzellen ragen in eine gemeinsame, leicht auslenkbare Gallertkappe, die *Cupula*. Sie dient als Angriffsfläche für Strömungsreize.

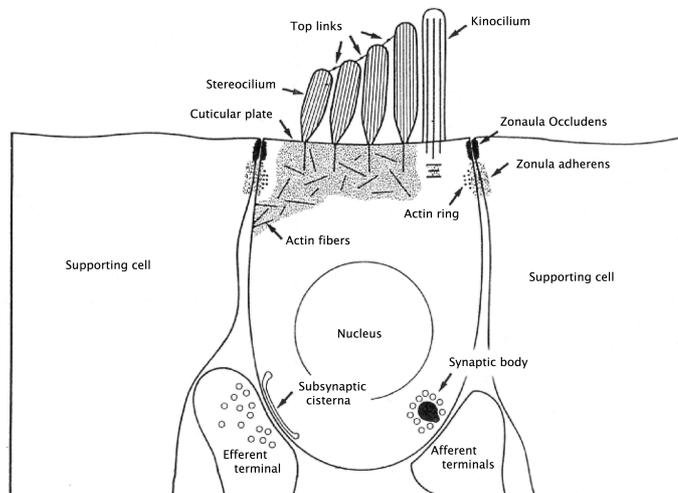


Abb. 1.2 Darstellung einer auditorischen Haarsinneszelle. Aus Corwin und Warchol (1991).

Die gerichtete Anordnung der Stereocilien gibt der Haarzelle eine strukturelle und funktionelle Polarität (Corwin und Warchol, 1991) mit einer maximalen Reizempfindlichkeit entlang einer definierten Achse: Eine Auslenkung der Bündel in Richtung der langen Stereocilien führt zu einer Depolarisation der Sinneszelle und erfordert eine größere Kraft als die Auslenkung in die entgegengesetzte Richtung, die eine Hyperpolarisation hervorruft (Flock und Strelhoff, 1984; Crawford und Fettiplace, 1985).

Beim *Axolotl*, einem aquatischen Urodel, wird die Polarität eines Neuromasts schon direkt nach Bildung des Organs erkennbar (Smith *et al.*, 1988).

Ein mechanischer Reiz, also die Auslenkung der Stereocilienbündel, führt zu einem veränderten Membranpotential der Sinneszelle, was die Transmitterausschüttung an chemischen Synapsen an der basalen Membran der Sinneszelle auslöst. Dadurch wird an den afferenten Endigungen der sensorischen Neuronen ein elektrischer Impuls erzeugt, der dann aus der Peripherie kommend zum Hirnstamm und an übergeordnete Zentren des zentralen Nervensystems weitergeleitet wird.

Die Haarzellen der Vertebraten sind trotz ähnlichen Bauprinzips und ähnlicher Funktion phylogenetisch nicht von den mechanorezeptiven Haarzellen der Invertebraten abzuleiten (Budelmann, 1989, Jørgensen, 1989).

Neben den Haarzellen besteht der Neuromast noch aus zwei weiteren Zelltypen, der sog. Stützzelle und der Mantelzelle (Metcalf *et al.*, 1985). Die Zellen sind so

angeordnet, dass ein innerer Kreis von Haarsinneszellen seitlich von einem Kranz äußerer Mantelzellen und basal von den Stützzellen umgeben wird. Ein funktioneller Unterschied zwischen Stütz- und Mantelzellen besteht z.B. bei der Bildung der *Cupula*. Hierbei werden die Mucopolysaccharide, aus denen das Herz der *Cupula* besteht, von den Stützzellen sezerniert, während die Mantelzellen sulfatisierte Mucopolysaccharide für die Hülle der *Cupula* bilden (Blaxter, 1987; Winkelbauer, 1989).

Zur Vereinfachung wird im weiteren Verlauf dieser Arbeit jedoch ausschließlich von „Stützzellen“ (*supporting cells*) gesprochen, wobei diese Bezeichnung hier die Mantelzellen mit einschließen soll.

Untersuchungen am Zebrafisch konnten zeigen, dass Stützzellen selbst in Neuromasten adulter Fische mitotisch aktiv bleiben. Im Gegensatz dazu zeigen ausdifferenzierte Haarzellen keine Teilungsaktivität, jedoch eine kontinuierliche Apoptoserate (Williams und Holder, 2000). Möglicherweise stellen die Stützzellen eine Population undifferenzierter Vorläuferzellen dar, die das Potential innehalten, Sinneszellen auszubilden. So könnten z.B. durch Verletzung verursachte Verluste in der Population der Haarsinneszellen durch Zellteilung und Rekrutierung der äußeren Stützzellen wieder ausgeglichen werden (Cole und Ross, 2001).

1.1.2 Innervierung der Neuromasten

Innerviert werden Neuromasten durch sensorische Neuronen, deren Zellkörper in zwei kranialen Ganglien zusammengefasst liegen: Das präotische Ganglion innerviert die Neuromasten des Kopfes (ALL), das postotische Ganglion die Neuromasten auf Rumpf und Schwanz (PLL). Die Projektionen der ALL und PLL Neuronen weisen im Nerv eine somatotopische Ordnung auf, wobei weit dorsal gelegene Axone zu posterior gelegenen Neuromasten und ventral verlaufende Projektionen zu anterior gelegenen Neuromasten führen. So wird die Position eines Neuromasts entlang der anterior/posterioren Körperachse durch die Anordnung der zentralen Projektionen der sensorischen Neuronen repräsentiert (Alexandre und Ghysen, 1999). Die sensorischen Bahnen aus der Peripherie zum Zentralnervensystem sind also anatomisch so organisiert, dass die räumlichen Relationen zwischen den Rezeptoren bewahrt werden. Eine entsprechende somatotopische Ordnung axonaler Projektionen ist auch aus allen

Stationen des auditorischen Systems der Säuger bekannt (Rose, 1960), die hier als Tonotopie bezeichnet wird.

Die Axone der sensorischen Neuronen für die Neuromasten der posterioren Laterallinie verlaufen in longitudinaler Richtung vom postotischen Ganglion bis zu den jeweiligen Neuromasten, deren Haarzellen sie innervieren. Die Axone liegen als Bündel zusammengefasst und bilden den Lateralliniennerv. So genannte *Schwann*-Zellen, ein Gliazelltyp des peripheren Nervensystems, sind beim Zebrafisch an der Faszikulierung des Nerven maßgeblich beteiligt (Gilmour *et al.*, 2002). Sie liegen dicht an dicht aufgereiht entlang der einzelnen Axone und umwickeln diese. Die Ummantelung der Axone durch *Schwann*-Gliazellen stellt funktionell eine elektrische Isolierung der Axone dar, ist aber auch Struktur gebend, da sie die Gesamtzahl der Axone zu einem kompakten Strang bündeln.

Neben der afferenten (sensorischen) Innervierung erhält der Neuromast als Sinnesorgan auch eine Innervierung durch efferente Neuronen, deren Zellkörper nicht in Ganglien liegen, sondern zum Zentralen Nervensystem gehören. Efferente Systeme besitzen sowohl „feedback“, als auch „feedforward“-Funktionen. Bei Ersterem kann die Reizschwelle der Sinnesorgane nach einer erfolgten Dauerreizung durch Inhibierung der afferenten Aktivität heraufgesetzt werden, um eine Überstimulation des Systems zu verhindern. In einem „feedforward“-System können durch inhibierende Signale an die Sinneszellen äußere Reize, z.B. durch Eigenbewegungen des Fisches verursacht, herausgefiltert werden. Ebenfalls kann aber auch die Reizschwelle der Sinneszellen durch exzitatorische Signale herabgesetzt werden, wodurch das Sinnessystem sensitiviert wird (Bricaud *et al.*, 2001).

Im larvalen Zebrafisch existieren zwei rhombenzephal Kerne, die zur efferenten Innervierung der Neuromasten beitragen, der „rostrale efferente Nucleus“ (REN) und ein dazu caudal gelegener „efferenter Nucleus“ (CEN). Eine derartige Organisation findet man außer bei *Danio* noch in anderen adulten Fischarten wie z.B. *Sarotherodon* (Claas und Müntz, 1980), *Carassius* (Zottoli und van Horne, 1983), *Ictalurus* (New und Singh, 1994) und *Aplocheilichthys* (Wagner und Schwartz, 1996). Dagegen sind in anderen bisher untersuchten Fischarten, einschließlich des Zebrafisches, alle efferenten Neuronen in einem einzigen Nucleus versammelt, dem sog. OEN. Bricaud *et al.*, gehen davon aus, dass diese anatomische Trennung in REN und CEN nicht topographischer Natur ist, sondern einen funktionellen Hintergrund hat. So zeigen beide Kerne keinen auffälligen Unterschied in ihrer axonalen Projektion, da

sowohl CEN als auch REN Fasern zu den Sinnesorganen der ALL und der PLL ausbilden (Bricaud *et al.*, 2001). Die Autoren vermuten, dass der CEN durch seine direkte Nachbarschaft zum Axon der *Mauthner*-Zelle (Metcalf *et al.*, 1985) an „feedforward“-Funktionen, der REN eher an „feedback“-Funktionen beteiligt ist. Die *Mauthner*-Zellen der Zebrafischlarve liegen im Hinterhirn und sind motorische Neuronen, die an der Steuerung der Eigenbewegung des Fisches beteiligt sind. Da der Großteil aller rhombencephalen Neuronen Cholinacetyl-Transferase exprimiert (Meredith und Roberts, 1987; Brantley und Bass, 1988), vertreten die Autoren die Meinung, dass die rhombencephalen Kerne inhibitorisch wirken.

Ein weiterer efferenter Kern liegt im ventralen Diencephalon (DELL, diencephale Efferenz der Laterallinie). Eine TH-Immunoreaktivität der DELL Neuronen weist sie als catecholaminerg (möglicherweise dopaminerg) aus (Bricaud *et al.*, 2001 und darin enthaltene Zitate). Aufgrund der Lage der DELL Neuronen im ventralen Hypothalamus und der Natur ihres Neurotransmitters wird vermutet, dass diese Neuronen innerhalb des Seitenliniensystems an der Modulierung der Sensitivität beteiligt sind und exzitatorisch wirken.

1.1.3 Weitere Sinnesorgane

Neben dem Neuromasten wurde, ebenfalls der Laterallinie zugehörig, eine zweite Klasse von kleineren Mechanorezeptoren, die sogenannten Pit-Organe („*pit organs*“), beschrieben. Sie sind mit einer geringeren Zahl von Haarzellen ausgestattet und besitzen eine geringere Reizschwelle für niederfrequente Bewegungsreize (Northcutt und Bleckmann, 1993).

In Salamandern, Rochen und einigen wenigen Knochenfischen tritt eine zusätzliche Klasse von Laterallinienrezeptoren auf, die sog. Ampullenorgane oder *Lorenzini-Ampullen*. Dies sind Elektrorezeptoren, die zur Perzeption der elektrischen Feldstärke sowie der räumlichen Verteilung der Feldlinien genutzt werden. Sie stellen modifizierte Haarsinneszellen dar, die jedoch ihre Cilien verloren haben. Ampullenorgane liegen benachbart zu den Kopflinien von Neuromasten und *Pit*-Organen (Fritsch, 1981; Northcutt, 1986, 1992) und werden von Ausläufern des Seitenliniennervs innerviert. Es wird angenommen, dass Elektrorezeptoren vorrangig zur Ortung von Beute eingesetzt werden (Kalmijn, 1974; Zakon, 1988).

1.2 Ontogenese des Lateralliniensystems: morphologische und genetische Aspekte

Im Rahmen des phylogenetischen Überganges von Invertebraten zu den Vertebraten entwickelten sich eine Reihe morphologischer Neuerungen. Neben der Bildung eines Neurocraniums und bestimmter Umgestaltungen innerhalb der Entwicklung des paraxialen Mesoderms, die zur Ausbildung eines muskulösen Pharynx führten, zählten dazu auch zahlreiche Umgestaltungen innerhalb des Nervensystems. Das Gehirn vergrößerte sich und wurde in Verbindung mit der Entwicklung paariger Augen weitreichend umgestaltet. Die Anlage von migratorischen Neuralleistenzellen und neurogener Plakoden im Kopfektoderm führte zur Bildung bipolarer sensorischer Neuronen des peripheren Nervensystems (Butler, 2000, Shimeld und Holland, 2000).

1.2.1 Plakoden

Alle paarigen Sinnesorgane der Vertebraten entstehen aus einfachen epithelialen Verdickungen, den Plakoden, die während der Ontogenese in rostro-caudaler Richtung seitlich der Hirnanlage aufgereiht liegen (Baker und Bronner-Fraser, 2001). Die Erstellung von Anlagekarten früher Neurulastadien in verschiedenen Vertebratenspezies konnte zeigen, dass die zukünftigen Kopfplakoden aus Ektodermzellen, am Rand der Neuralplatte zwischen Neuralleistenzellen und Zellen der zukünftigen Epidermis, hervorgehen (Baker und Bronner-Fraser, 2001 und darin enthaltene Zitate). Induktive Prozesse aus seitlich und darunter gelegenen Geweben steuern die Umgestaltung der einschichtigen, ektodermalen Plakoden zu komplexen Sinnesorganen (Graham und Begbie, 2000). Untersuchungen an zahlreichen Vertebratenspezies konnten zeigen, dass das Plakodengewebe der otischen Anlage gleichermaßen Rezeptorzellen des Sinnesepithels und die sie innervierenden sensorischen Neuronen hervorbringt. Letztere delaminieren als Neuroblasten aus dem Plakodenbereich und gruppieren sich, nach der Differenzierung zu bipolaren Neuronen, abseits der Sinnesorgane zu sensorischen Ganglien. Ihre aufsteigenden Fasern stehen in Kontakt zu höheren Schaltzentren des ZNS, absteigende Fasern projizieren in die Peripherie und innervieren dort die Sinneszellen.

Gleiches gilt für die Entwicklung der Laterallinie aus der postotischen Plakode.

Gompel *et al.* konnte inzwischen durch Zellmarkierungsversuche an Zebrafischembryonen in Blastomerenstadien zeigen, dass sensorische Neuronen und Haarsinneszellen der Rumpf-Laterallinie zwar in direkter Nachbarschaft zueinander innerhalb der ektodermalen Plakoden entstehen, jedoch nicht verwandtschaftlich auseinander hervorgehen (Gompel *et al.*, 2001).

1.2.2 Primordien

Der Entwicklung des Seitenliniensystems wurde bereits zu Beginn des 20. Jahrhunderts große Aufmerksamkeit geschenkt, da es schon damals ein attraktives System zur Untersuchung grundlegender embryologischer Aspekte wie z.B. Zellmigration, Gewebepolarität und Regeneration peripherer Nervenfasern und deren Interaktionen mit ihren Zielorganen darstellte (Winkelbauer und Hausen, 1983). Der Großteil der frühen experimentellen Arbeiten wurde an Amphibienlarven durchgeführt (Harrison, 1904; Stone, 1922; Wright, 1947). Diese Studien zeigten, dass jede Linie des Sinnessystems, bestehend aus einer Reihe einzelner Sinnesorgane, jeweils aus einem eigenen Primordium hervorgeht. Die Primordien haben ihren Ursprung in bestimmten Bereichen der epidermalen Plakoden innerhalb der Kopfreion nahe der Ohranlage (Stone, 1922). Untersuchungen von Winkelbauer und Hauser zur Entstehung der supraorbitalen Kopflinie des Krallenfrosches, *Xenopus laevis*, ergaben, dass das die supraorbitale Linie hervorbringende Primordium, nach aktiver Streckung entlang des dorsalen Augenrandes in Zellgruppen, von durchschnittlich acht Zellen untergliedert wird. Diese Zellgruppen, die sog. Primärorgane, entwickeln sich dann zu den Rezeptororganen, den Neuromasten, den *Pit* Organen und den Ampullen weiter. Die Streckung des Primordiums ist weitestgehend auf massive Zellteilungen und weniger auf eine Neuordnung der Zellen untereinander oder einer Gestaltänderung der Zellen zurückzuführen (Winkelbauer und Hauser, 1993).

Im Gegensatz dazu zeigen Primordien, die die Rumpflinien hervorbringen, ein aktives Wanderverhalten entlang der rostro/caudalen Achse des Embryos bzw. der Larve (Harrison, 1904; Stone, 1922; Metcalfe, 1984; Lannoo und Smith, 1989; Smith *et al.*, 1990; Gompel *et al.*, 2001). Die Primordien entfernen sich aus dem Bereich des postotischen Ektoderms und wandern subepidermal in Richtung Schwanzende. Dabei

folgen sie festgelegten Routen. Auf ihrem Weg legen sie an definierten Positionen Zellgruppen, sog. Primärorgane ab, die im weiteren Verlauf zu Neuromasten reifen.

Neuronen, die in der Plakodenregion zurückbleiben, bilden das Laterallinienganglion. Ihre Axone wandern gemeinsam mit den Primordiumszenellen in die Peripherie und innervieren jeden neugebildeten Neuromasten umgehend (siehe **Abb. 1.3**).

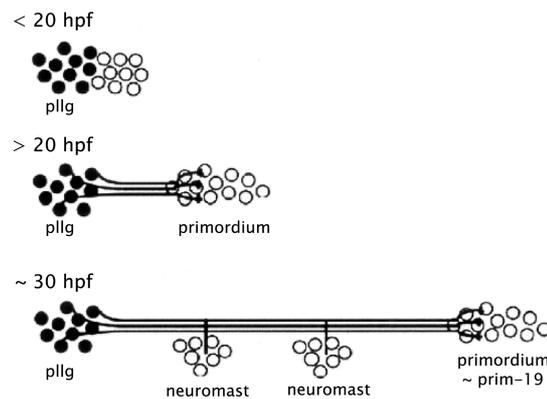


Abb. 1.3 Schematische Darstellung der frühen Entwicklung des Lateralliniennervs im Zebrafisch. Rostral ist links; dorsal ist oben. Das Auswachsen der Axone beginnt nicht vor 20 Stunden nach Befruchtung (hpf). Noch bilden die Zellen des zukünftigen Primordiums einen einheitlichen Zellverband mit den Ganglionzellen aus. Nach 20 hpf senden die Neuronen des sensorischen Ganglions erste Axone aus, deren Wachstumskegel zusammen mit dem Primordium nach caudal abwandern und das 19. Rumpsegment (prim-19) ungefähr um 33 hpf erreichen. Zu diesem Zeitpunkt wurden vom Primordium bereits zwei Neuromasten abgelegt und durch die mitwandernden Fasern innerviert. Aus Becker *et al.* (2001)

Im Zebrafischembryo verläuft die Route des posterioren Laterallinienprimordiums entlang des horizontalen Myoseptums, auf dessen Höhe auch der Lateralliniennerv entsteht.

Einige Mutanten des Zebrafisches zeigen während der Somitenbildung starke Defekte. Als Folge werden Myotomgrenzen nur unzureichend ausgebildet und in einigen Fällen wird das horizontale Myoseptum nicht angelegt. So ist in *sonic-you* und *you-too* Mutanten, denen das horizontale Myoseptum fehlt, die Position der Neuromasten und der Verlauf des Lateralliniennervs von der ursprünglich mittleren zu einer ventralen Position verschoben.

Offensichtlich orientiert sich das Primordium auf seiner Wanderung an lokalen Leitmolekülen des Substrats. Smith *et al* zeigten in Transplantationsexperimenten am Axolotl (*Ambystoma mexicanum*), dass die gerichtete Migration des Primordiums

sowohl vom Ektoderm als auch von dem darunter liegendem Mesoderm abhängig ist (Smith *et al.*, 1990). Die genaue Platzierung („Spacing“) der Sinnesorgane entlang der antero/posterioren Achse ist nach Aussage der Autoren dagegen Substrat unabhängig und wird möglicherweise durch intrinsische Eigenschaften des Primordiums, oder der entstehenden Sinnesorgane selbst, bestimmt.

Die Laterallinie wird vermutlich um den 5. Tag der Entwicklung funktionsfähig (Metcalf *et al.*, 1985).

1.2.3 Wanderung der Primordien

Mit der Frage nach den molekularen Ursachen dieses gerichteten Zellwanderverhaltens und Axonwachstums beschäftigen sich einige aktuelle Arbeiten. Das HNK-1 Glycoepitop, eine 3'-Sulfat-Glucuronsäure, wird umfangreich im Nervensystem exprimiert und spielt vermutlich im Rahmen des Axonwachstums als Vermittlermolekül in Verbindung mit anderen membrangebundenen Erkennungsmolekülen, wie Molekülen der Immunglobulin-Superfamilie, Cadherinen, Integrinen, Glycolipiden und Tenascinen, eine wichtige Rolle bei gerichtetem Zellwanderverhalten.

Die Injektion eines HNK-1 Antikörpers in 16 Stunden alten Zebrafischembryonen behindert selektiv nur das Wachstum des Lateralliniennervs, jedoch nicht das Wachstum anderer Axone wie z.B. die der ventralen Motorneuronen. Unbeeinflusst bleibt auch das Wanderverhalten des Primordiums und die Ablage der Proneuromasten (Becker *et al.*, 2001). Dieses Experiment legt nahe, dass Primordiumzellen anderen molekularen Wegweisern folgen, als die mit ihnen assoziierten Wachstumskegel. Am gerichteten Axonwachstum sind Leitmoleküle unterschiedlichster Qualität und Funktion, attraktiv wie auch repulsiv, beteiligt.

Die Axone der sensorischen Neuronen könnten direkt durch Oberflächenmoleküle der primordialen Zellen, z.B. durch Bindung an NCAM, geführt werden (Cole und Schachner, 1987). Zusätzlich kann auch das Substrat eine richtende Funktion ausüben. Für den Zebrafisch ist bekannt, dass das repulsive Molekül SemaZ1a in den dorsalen und ventralen Myotomen exprimiert wird, nicht aber entlang des horizontalen Myoseptums. So werden möglicherweise die SemaZ1a-sensitiven Axone des Lateralliniennervs durch diesen Sema freien Korridor geführt (Shoji *et al.*, 1998).

Weiterhin wiesen Lee *et al.* die Expression dreier *Roundabout (robo)* Homologe im Laterallinienprimordium des Zebrafisches nach (Lee *et al.*, 2001). Sie kodieren für Transmembranrezeptoren und sind bei *Drosophila* an der Richtungsweisung von Axonen (Seeger *et al.*, 1993) und gerichteter Migration neuronaler und mesodermaler Zellen beteiligt.

Zu den wichtigsten Klassen von Leitmolekülen zählen Semaphorine, Netrine, Ephrine und die erst kürzlich beschriebenen Slit-Moleküle. Jeder dieser Molekülklassen ist eine ihr verwandte Rezeptorklasse zugehörig. Im Falle der Slits sind es die Roundabout-Rezeptoren (Chisholm und Tessier-Lavigne, 1999). Nach Aussage der Autoren könnten Slits und Robos im Zebrafisch nicht nur Aufgaben bei der Wegweisung von Axonen haben, sondern auch bei der Bildung von Axon-Verzweigungen und bei der Zellwanderung.

1.2.4 Genetische und molekulare Analyse der Neuromasten-Entwicklung

Im Rahmen der umfassenden Sichtungen auf Entwicklungsmutanten am Zebrafischembryo in Tübingen und Boston konnte eine große Zahl an Mutationen isoliert werden, die offensichtliche anatomische Defekte am Innenohr zeigen (Whitfield *et al.*, 1996). Obwohl nicht systematisch danach gesichtet wurde, konnten in diesem Rahmen zwei Mutationen (1 und 2) gefunden werden, die die Entwicklung des Lateralliniensystems betreffen: (1) *dog-eared (dog)* Embryonen zeigen Störungen in beiden Systemen, dem Innenohr und der Laterallinie. Ihnen fehlen die Sinnesepithelien der Bogengänge (Cristae) und eine Anzahl von Neuromasten der posterioren Laterallinie. (2) Die *Hypersensitive* Mutante (*hps*) dagegen zeigt eine erhöhte Anzahl von Neuromasten innerhalb der posterioren Laterallinie bei 5 Tage alten Larven und einen späten Pigmentierungsdefekt im Rumpf der Larven, jedoch keinen Ohrdefekt.

Inzwischen haben Kozlowski *et al.* das der *dog*-Mutante zugrundeliegende Gen, *eyes-absent-1 (eya-1)*, kloniert und das Expressionsmuster detailliert beschrieben (Kozlowski *et al.*, 2002). Wie bei *Xenopus* (David *et al.*, 2001) wird *eya1* auch im Zebrafisch in den neurogenen Plakoden (pituitary, olfactory, otic and lateral line) sowie in den Somiten, den hyperaxialen Muskelvorläuferzellen und den Branchialbögen exprimiert. Ältere Stadien zeigen Transkripte in ventralen Bereichen des otischen Vesikels und innerhalb der Laterallinie in den Ganglien, dem wandernden Primordium und den daraus

hervorgehenden Sinnesorganen mit Haar- und Stützzellen. Bei Säugern führt der Verlust der *eya1* Funktion durch Haploinsuffizienz zur Ausbildung des *Branchio Oto Renal* Syndroms. Dieser auch beim Menschen bekannte Defekt wird charakterisiert durch Entwicklungsstörungen innerhalb der vorderen zwei Branchialbögen, dem Innenohr und den Nieren, und hat als auffälligstes Merkmal Gehörlosigkeit zur Folge.

Zu der Frage, an welchen spezifischen molekularen und zellulären Prozessen *eya1* beteiligt ist, können bisher nur Vermutungen angestellt werden. Die Familie der *eyes absent* Gene kodiert für transkriptionelle Koaktivatoren. Die breitgefächerte Expression von *eya1* in Plakoden und Somiten über einen langen Zeitraum hinweg lässt vermuten, dass *eya1* verschiedene Funktionen im Verlauf der Induktions-, Spezifizierungs- und Differenzierungsphase hat.

Proneurale und neurale Gene spielen offensichtlich auch bei der Differenzierung von Haar- und Stützzellen eine entscheidende Rolle. Die Expression eines *atonal* Homologs, *math1*, legt im Innenohr der Maus potentielle Haarsinneszellen fest, die dann durch laterale Inhibition des Delta-Notch Signalweges in ihrer Anzahl limitiert, und einzelne zukünftige Haarzellen selektiert werden (Lanford *et al.*, 1999). Expression von *zath1*, *notch3*, *notch5*, *delta A* und *delta C* im Laterallinienprimordium und den juvenilen Neuromasten (Itoh und Chitnis, 2001) und der Ohranlage (Riley *et al.*, 1999) des Zebrafisches beweist, dass auch hier die gleichen molekularen Mechanismen an der Verteilung von Stütz- und Sinneszellen beteiligt sind.

Auch verschiedene Vertreter des BMP-Signalweges zeigen Expression innerhalb der Ohranlage und der Laterallinie im Zebrafisch (Mowbray *et al.*, 2001). *Bmp2b* und *bmp4* und *smad5* (ein Vermittler des BMP-Signals) werden in den vorderen Zellen des Primordiums und in den Zellen von Proneuromasten exprimiert. Transkripte des BMP-Inhibitors *follistatin* konnten in Stützzellen 5 Tage alter Neuromasten nachgewiesen werden. Mowbray *et al.* vermuten in diesem Zusammenhang, dass auch im Innenohr Bmps und Smads an der Differenzierung der Sinnesepithelien beteiligt sind. Welche spezifischen Aufgaben sie haben ist noch unbekannt, sie sind aber mit großer Wahrscheinlichkeit an Zellschicksalsentscheidungen zwischen Haarsinneszellen und Stützzellen beteiligt.

Der Transkriptionfaktor *fgf8*, Mitglied der Familie der Fibroblast Wachstums Faktoren (FGF), nimmt während der Gliederung der Neuralplatte eine übergeordnete, organisatorische Funktion ein und ist an zahlreichen zellulären Prozessen, wie z.B. der Identität und dem Überleben von Zellen, Proliferation und Richtungsweisung von

Axonen beteiligt (Ornitz und Itoh, 2001). Zwei ETS Transkriptionsfaktoren, *erm* und *pea3*, wurden im Zebrafisch von Münchberg *et al.* kloniert (Münchberg *et al.*, 1999). Sie zeigen eine enge Verknüpfung mit der Expression von *fgf8* und stehen vermutlich unter transkriptioneller Kontrolle des FGF Signalweges (Roehl und Nüsslein-Volhard, 2001; Raible und Brand, 2001). In späteren Somitenstadien zeigt *erm* Expression in bestimmten Bereichen innerhalb des Vorderhirns, an der Mittelhirn/Hinterhirngrenze, in den differenzierenden Rhombomeren, den Branchialbögen, dem otischen Vesikel, der Brustflosse, den Somiten und der Schwanzknospe.

Im Gegensatz dazu wird *pea3* nicht in Rhombomeren, aber in *Rohon-Beard* Neuronen, den Plakoden der Laterallinie und dem Herz exprimiert, sowie später auch in den Primordien der Laterallinie.

Die *pea3* Expressionsdomäne dient im Rahmen dieser Arbeit als Marker der ektodermalen Plakoden der pLL und des auswandernden Primordiums der Rumpflinie.

1.3 Der Zebrafisch als Modellsystem

Vor zwei Jahrzehnten fand der Zebrafisch, *Danio rerio*, Eingang in die experimentelle Entwicklungsbiologie. Seither dient der Zebrafischembryo neben *Xenopus*, Maus und Huhn als repräsentatives Modellsystem der Vertebratenentwicklung. Der Zebrafisch, beheimatet in den Süßgewässern Nordindiens, zählt zu der Unterfamilie der Bärblinge. Haltung und Züchtung sind relativ unkompliziert. Wildtypische Fische können preiswert von hiesigen Zoohandlungen bezogen werden. Seine kurze Generationsphase erlaubt eine schnelle Nachzucht. Bei idealen Außenbedingungen (pH-Wert: 7, Temperatur: 29,5°C), sowie reichlicher und regelmäßiger Fütterung kommen Jungtiere nach etwa 2,5 bis 3 Monaten zur Geschlechtsreife. Eine Eiablage von ca. 100-300 Eiern pro Weibchen/Tag garantiert zudem eine stetige Nachkommenschaft. Eine wichtige Eigenschaft, die den Zebrafisch zu einem hervorragenden Untersuchungsobjekt der Entwicklungsbiologie macht, ist seine extrakorporale Entwicklung in Verbindung mit der Durchsichtigkeit der Embryonen. Das Ei des Zebrafisches ist ca. 0,7 mm groß und kann unter dem Stereomikroskop bei 16-facher Vergrößerung betrachtet werden. Die Embryonalentwicklung ist verhältnismäßig kurz. Die Zeitspanne von Befruchtung der Eizelle bis zum Schlüpfen der Larve aus der Eihülle (Chorion) umfasst 72 h. Die Größe des Eies und die leichte Zugänglichkeit erlauben eine weite Spanne experimenteller

Möglichkeiten. Zum einen können klassische Untersuchungen wie die Beobachtung und Beschreibung von Entwicklungsstadien (Kimmel *et al.*, 1995), Transplantationsexperimente zur Untersuchung des Determinationsverhaltens einzelner Zellen oder Gewebestücke (Eisen, 1991; Ho *et al.*, 1990) sowie die Etablierung von Zellkulturen durchgeführt werden.

Aktuelle Fragestellungen zielen auf molekularbiologische Untersuchungen ab. Die Suche nach neuen mutanten Formen mit Hilfe der chemischen Mutagenese hat eine Vielzahl an Entwicklungsmutanten hervorgebracht (Haffter *et al.*, 1996; Driever *et al.*, 1996). Auf die einfachen Beobachtungen wildtypischer und mutanter Entwicklungsprozesse folgt die Untersuchung der molekularen Hintergründe. Nur wenige der bisher phänotypisch beschriebenen Mutanten sind bislang molekular aufgeklärt worden (Schulte-Merker *et al.*, 1994). Voraussetzung für die Klonierung eines Gens ist das Vorliegen einer genauen genetischen Karte. Da sich Positionsklonierungen ausgehend von chemisch induzierten Mutanten als sehr aufwendig erwiesen, wurde es notwendig, Methoden für eine effizientere Insertionsmutagenese zu entwickeln.

Inwieweit ein Versuchsorganismus als Modellsystem für andere Tiergruppen stehen kann, hängt im Allgemeinen von seiner Vergleichbarkeit ab: die Entwicklung des Versuchstieres darf keinen Spezialfall darstellen. Daten und Ergebnisse, die am Zebrafisch gewonnen werden, müssen auf andere Vertebratengruppen übertragbar sein. Übereinstimmungen zu anderen Tiergruppen wurden sowohl auf embryologischer als auch auf molekularer Ebene nachgewiesen. Zahlreiche Zebrafischgene zeigen Sequenzhomologien zu Genen anderer Tiergruppen. So wurden im Zebrafischgenom Homologe zu ursprünglich aus *Drosophila melanogaster* bekannten Genen, wie den proneuralen und neuralen Genen *achaete-scute*, *notch* und *delta*, gefunden (Bierkamp und Campos-Ortega, 1993). Trotz einiger morphologischer Besonderheiten innerhalb der Zebrafischentwicklung gleicht auch sie denen anderer Vertebratensysteme, so dass die gewonnenen Erkenntnisse übertragbar erscheinen (Kimmel, 1989; Eyal-Giladi, 1997).

1.4 Zielsetzung der vorliegenden Arbeit

Mit Beginn dieser Arbeit im Frühjahr 2000 waren beim Zebrafisch ausschließlich die Entwicklungsprozesse beschrieben, die zur Ausbildung der embryonalen Laterallinie führen. Im Verlauf der larvalen Phase nimmt die Laterallinie jedoch an Komplexität zu. Eine beachtliche Zahl zusätzlicher Neuromasten wird generiert und positioniert. Nach dreiwöchiger Entwicklung, kurz bevor die Schuppenbildung einsetzt, hat sich ein dichtes Verteilungsmuster von Neuromasten herausgebildet, wobei innerhalb der einzelnen Linien des Rumpfes an jeder Myotomgrenze mindestens ein Sinnesorgan platziert liegt. Über die Herkunft dieser sekundären Neuromasten des larvalen Systems lagen keine Kenntnisse vor. Wie schon Untersuchungen an Amphibien belegen konnten, erschien auch im Zebrafisch die Existenz weiterer Primordien, die entlang bereits angelegter Linien wandern und zusätzliche Neuromasten hervorbringen, plausibel. Auch andere Musterbildungsprozesse waren denkbar.

Die Zielsetzung der Arbeit war zunächst die Beobachtung und Beschreibung der frühen Prozesse, die die larvale Laterallinie hervorbringen. Im weiteren Verlauf sollte auch die Herkunft der sekundären Neuromasten geklärt werden. Als drittes Teilziel wurde untersucht, ob weitere Primordien existieren, die, ähnlich wie in Amphibien, entlang bereits angelegter Linien wandern und zusätzliche Neuromasten hervorbringen, oder ob auch anderen Musterbildungsprozesse denkbar sind.

Mit Hilfe von Lebendbeobachtungen am Lichtmikroskop unter Interferenz-Phasenkontrast (*Nomarski* Optik) und am LSM unter zu Hilfenahme der H2A.F/Z:GFP Linie (eine Zebrafischlinie, die in allen Zellkernen ein Histon2A.F/Z:GFP Fusionsprotein exprimiert; Pauls *et al.* 2001) konnten Zellbewegungen, Wanderverhalten von Zellgruppen, Mitosen, aber auch apoptotische Ereignisse innerhalb der Gewebe untersucht werden. Zusätzliche Färbemethoden, wie Fuchsin- und DASPEI-Färbung, erschienen hilfreich, um eine detailliertere Auswertung vorzunehmen. Zellmarkierungsexperimente mit Fluoreszenzfarbstoffen an frühen und späten Neurulationsstadien sollten Aufschluss darüber geben, ob Haar- und Stützzellen der primären und sekundären Neuromasten möglicherweise aus einer gemeinsamen ektodermalen Anlage hervorgehen. Bis heute gibt es konträre Meinungen auch darüber, in welchem Umfang beim Zebrafisch Neuralleistenzellen an der Zusammensetzung des Primordiums bzw. an der Bildung der Neuromasten beteiligt sind (Collazo *et al.*, 1994). Auch zu dieser Fragestellung sollten Einzellmarkierungen Aufschluss geben.

2. Material & 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 Lichtrhythmus von 14 h hell zu 10 h dunkel. Die Wassertemperatur wurde in einem Bereich von 24 - 28°C gehalten.

Das zur Aquarienfüllung verwendete und über Aktivkohle gereinigt Leitungswasser wurde in einem Verhältnis von 1:1 mit VE Wasser verschnitten (Leitwert von ca. 500 - 600 $\mu\text{S}/\text{cm}$, Gesamthärte 17 - 20°dH). Nitrit- und Ammoniumkonzentration (nicht nachweisbar), Nitratkonzentration ($< 50 \text{ mg / l}$) 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 Salinenkrebses *Artemia salina* sowie *Bosmidien*, heimische Süßwasserkrebse, die tiefgefroren bezogen und über mehrere Monate gelagert werden konnten.

Die Eiablage und Aufzucht der Fische geschah in Anlehnung an die Angaben „*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
-H3	polyklonaler Kaninchen-menschliches Phospho-Histon H3	1 : 100	Upstate biotechnology (Lake Placid)
-acet.Tub	monoklonaler Maus-acetyliertes Tubulin aus Seeigel	1 : 100	Sigma, (Deisenhofen)
-FDA	monoklonaler Antikörper gegen Fluoreszin/ Oregon Green, Maus IgG	1 : 200	Molecular Probes
-RDA	monoklonaler Antikörper gegen Rhodamin, Kaninchen IgG	1 : 200	Molecular Probes

2. AK	Beschreibung	eingesetzte Verdünnung	bezogen von
b-G-_-M-HRP	biotinylierter Ziege-Maus Antikörper, Meerrettich-Peroxidase konjugiert	1 : 200	Vectastain
G-_-M-cy3	polyklonaler Ziege-Maus Antikörper, Maus IgG, Cy3 konjugiert	1 : 100	Amersham pharmaceuticals
G-_-M-HRP	polyklonales Ziege F(ab') ₂ -Fragment gegen Maus IgM und IgG (H+L), Meerrettich-Peroxidase konjugiert	1 : 1000	Dianova, Hamburg

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.

DASPEI

2-(4-(Dimethylamino)styryl)-N-ethylpyridinium Iodid; (*Fluka*)

DEPC- H₂O

0,1 %iges (w/v) DEPC in H₂O ü.N. auf 37°C stellen, dann autoklavieren.

Dig-Färbelösung

100 mM NaCl, 50 mM MgCl₂, 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.

Durcopan

(mittelfest, *Fluka*) Einbettungsmedium für fixierte Embryonen.

32 ml Epoxydharz,
+ 27 ml Härter,

+ 1 ml Beschleuniger,
+ 0,6 ml Weichmacher.

Epoxidharz und Härter zusammenfügen und gründlich vermischen. Tropfenweise den Beschleuniger zugeben und schließlich den Weichmacher sehr gründlich bis zur völligen Schlierenfreiheit unterrühren. Das leicht zähflüssige Durcopan in Einmal-Spritzen abfüllen und bei -20°C aufbewahren.

Fluoreszenzfarbstoffe:**FDA**

Fluorescein Dextran Amin (*Molecular Probes*), (Abs: 494 nm, Em: 521 nm); angewandte Konzentration: 100 mg / ml in 0,3 M KCl, dafür wurden 250 µl KCl (0,3 M) über einen 0,45 µm Filter steril gefiltert, in 25 mg FDA (pulverisiert) gegeben und gut gelöst.

RDA

Rhodamin Dextran Amin (*Molecular Probes*) (Abs: 570nm, Em: 590 nm); angewandte Konzentration: 50 mg / ml in 0,3 KCl.

H₂O₂

(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).

Kapillaren für Zellinjektionen

Borosilikatglaskapillaren (*Hilgenberg*, Art.Nr. 1403501); für Einzellmarkierungen wurden Borosilikatglas-Kapillaren mit Innenfilament OD 1,0 mm, ID 0,58 mm verwendet. Zum Ziehen der Kapillaren stand ein WPI-Puller zur Verfügung. Als Heizfilament wurden 2,5 x 2,5 mm Boxfilamente verwendet. Programm 21 mit

folgenden Variablen: HEAT 480 PULL 150 VEL 100 TIME 150. Die Länge der Kapillarenspitze betrug ca. 7 - 10 mm. Die Kapillaren wurden von hinten mit der Farbstofflösung befüllt, 0,25 µl pro Kapillare.

Methylenblau

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

Methylzellulose

(*Sigma*; 400 cpi) stabilisierendes Medium zur Injektion junger Embryonen; 4 g Methylzellulose werden in 100 ml $\frac{1}{3}$ Zebrafischringer gegeben und für mehrere Stunden bei 30°C gerührt, bis das Pulver gelöst ist. Ungelöste Partikel können abzentrifugiert werden.

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.

Phosphatpuffer:**PBS**

130 mM NaCl; 7 mM Na₂HPO₄; 3 mM KH₂PO₄; 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.

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; CaCl₂; 34,96 g / l; CaCl₂ x 2 H₂O; Autoklavieren.

 $\frac{1}{3}$ ZFR

12 ml #1 + 9 ml #2 + 879 ml dd H₂O; auf pH 7,2 mit NaOH, 1N einstellen.

2.3 Methoden**2.3.1 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., 1992, 1995.

2.3.2 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 H₂O 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 ¹/₃ZFR mit 4,2 ml Tricainlösung versetzt.

2.3.3 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.

2.3.4 Histologische Färbemethoden

2.3.4.1 DASPEI-Färbung

DASPEI (2-(4-(Dimethylaminostyryl)-1-methyl-pyridinium Iodid); Fluka (39417)

Durch Baden der dechorionisierten Embryonen bzw. Larven in einer 5 μ M Lösung des Fluoreszenzfarbstoffes DASPEI in $\frac{1}{3}$ ZFR können die Haarsinneszellen der oberflächlich liegenden Neuromasten einzeln angefärbt werden.

Das Prinzip dieser Färbung beruht darauf, dass der Fluoreszenzfarbstoff von den Stereocilien, vermutlich über Kationenkanäle, aufgenommen und in ihnen angereichert wird, so dass dieser Zelltyp unter UV-Licht direkt sichtbar wird (Abs: 461/Em: 589 nm).

Diese Färbemethode lässt sich uneingeschränkt an Individuen aller Entwicklungsstadien durchführen. Beobachtet wurde, dass ältere Larven (> 14 Tage) sowie adulte Individuen kurz nach der Behandlung starben. Embryonen und junge Larven (< 14 Tage) überlebten die Behandlung. Zudem ist bekannt, dass die Sinneszellen nach Aufnahme des Farbstoffes funktionsuntüchtig werden und absterben. Eigene Beobachtungen konnten diesen Zusammenhang bestätigen.

2.3.4.2 Fuchsin-Färbung

Lichtmikroskopische Färbemethode nach P. Ehrlich.

Mit einer wässrigen, schwach angesäuerten Lösung von Fuchsin werden die Zellkerne des Gewebes angefärbt.

- Fixierung der Embryonen bzw. Larven ü.N. bei 4°C in 4 %igem Paraformaldehyd.
- Überführung in 70 %iges Ethanol.
- für 20 min in 70 %iges Ethanol waschen.
- Hydrolyse in 2N HCl für 20 min bei 60°C.
- 4 x waschen für je 1 min in H₂O.
- Färben in einer 1 %igen Lösung von basischem Fuchsin in 2,5 %iger Essigsäure für 5 bis 10 min bei RT.

- Differenzieren in 5 %iger Essigsäure für ca. 10 min.
- mehrmaliges Waschen in H₂O.
- Embryonen bis zu einem Alter von 24 hpf wurden zur mikroskopischen Untersuchung nach dem Färben in 86 %iges Glycerin überführt und auf Objektträgern flachpräpariert (s. 2.3.8 Einbettung in Glycerin).
- ältere Embryonen (> 24 hpf) und Larven wurden wie folgt in Kunstharz auf Objektträgern dauerhaft eingebettet:
- Entwässern in aufsteigender Alkoholreihe: je 5 min in 70 %igem, 80 %igem, 90 %igem, 96 %igem, 2 x je 10 min in 100 %igem Ethanol und je 10 min in 100 %igem Aceton.
- ü.N. bei 4°C in einem 1 : 1 Gemisch aus Aceton und Durcopan inkubieren.
- am folgenden Tag Aceton abdampfen lassen, Embryonen bzw. Larven in frisches Durcopan überführen und auf Objektträger aufziehen, versiegeln und den Kunstharz bei 70°C ü.N. aushärten lassen.

2.3.4.3 *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 H₂O₂ 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°C vorgekühltem Methanol und für mind. 30 min bei -20°C zur Permeabilisierung aufbewahren. Dieser Schritt dient auch der Inaktivierung endogener Peroxidasen. Embryonen können in Methanol bei -20°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°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 H₂O₂-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 H₂O 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.

2.3.4.4 *whole mount-in situ* Hybridisierungen

- bis zu 30 h alte Embryonen in 4 %igem PFA ü.N. bei 4°C fixieren.
- bei RT in PBT waschen und dechorionisieren.
- in 100 % Methanol überführen und für mind. 30 min bei -20°C inkubieren (Embryonen können in 100 %igem Methanol bei -20°C dauerhaft gelagert werden).
- für 5 min mit 50 %igem Methanol / PBT bei RT waschen.
- für 5 min mit 30 %igem Methanol / PBT bei RT waschen.
- 2 x 5 min mit PBT waschen.
- nachfixieren für 20 min in 4 %igem PFA bei RT.
- 2 x 5 min mit PBT waschen.
- zur Permeabilisierung werden die Embryonen in einer 1 : 500 verdünnten Proteinase K / PBT Lösung anverdaut: Embryonen bis 24 h für 6 min, Embryonen älter als 24 h für 15 min.
- kurz mit PBT stoppen, dann 5 min mit PBT waschen.
- nachfixieren für 20 min in 4 %igem PFA bei RT.
- 2 x 5 min mit PBT waschen.
- kurz mit H₂O waschen und sofort gegen eine Lösung von 1 ml 1,2 M Triethanolamin pH 7 mit 2,5 μ l Acetanhydrid austauschen und für 10 min bei RT zur Unterdrückung der endogenen Phosphatasen inkubieren.
- 2 x in PBT für 10 min waschen.
- Embryonen für 5 min in Hyb₋ (ohne Blockierungsreagenzien) bei 65°C inkubieren, im Anschluss für mind. 4 h bei 65°C in Hyb₊ prähybridisieren.
- Abziehen der alten Lösung und 100 μ l frische Hyb₊ Lösung mit digoxigeninmarkierter RNA-Probe (1 μ l aus der *in vitro*-Transkription) zugeben und für 16 h bei 65°C inkubieren.
- Hybridisierungslösung abziehen, (nicht verwerfen, da sie wiederverwendet werden kann).
- Waschschritte:
 - 15 min bei 65°C 75 %ig Hyb₊ / 25 %ig 2 x SSC
 - 15 min bei 65°C 50 %ig Hyb₊ / 50 %ig 2 x SSC
 - 15 min bei 65°C 25 %ig Hyb₊ / 75 %ig 2 x SSC
 - 15 min bei 65°C 100 %ig 2 x SSC

- 30 min bei 65°C 100 %ig 0,2 x SSC
- 30 min bei 65°C 100 %ig 0,2 x SSC
- 10 min bei RT 75 %ig 0,2 x SSC / 25 %ig PBT
- 10 min bei RT 50 %ig 0,2 x SSC / 50 %ig PBT
- 10 min bei RT 100 %ig PBT
- 2 h präinkubieren der Embryonen in 1 %igem BSA / PBT.
- Inkubation bei 4°C ü.N. oder für 2 h bei RT mit einer 1 : 6000 verdünnten Lösung der zuvor präabsorbierten, alkalisch Phosphatase-gekoppelten α -Dig Fab-Fragmenten in 1 %igem BSA / PBT.
- 4 x waschen in 1 %igem BSA / PBT für 25 min bei RT.
- Embryonen 2 x kurz in Dig-Färbelösung waschen, in Dreierblockschälchen überführen, Lösung abziehen und 1 ml frische Dig-Färbelösung mit 4,5 μ l NBT und 3,5 μ l BCIP zugeben.
- Färbung durch mehrmaliges Waschen mit PBT stoppen.

2.3.4.5 *Tunel-Färbung*

- bis zu 30 h alte Embryonen in 4 %igem Paraformaldehyd ü.N. bei 4°C fixieren.
- bei RT in PBT waschen und dechorionisieren.
in 100 %iges Methanol überführen und für mind. 30 min bei -20°C inkubieren (Embryonen können in 100 %igem Methanol bei -20°C dauerhaft gelagert werden). Pigmentierte Embryonen können in einer 3 % - 10 %igen H₂O₂ / MeOH Lösung ü.N. gebleicht werden.
- für 5 min mit 50 %igem Methanol / PBT bei RT waschen.
- für 5 min mit 30 %igem Methanol / PBT bei RT waschen.
- 2 x 5 min mit PBT waschen.
- nachfixieren für 20 min in 4 %igem PFA bei RT.
- 2 x 5 min mit PBT waschen.
- zur Permeabilisierung werden die Embryonen in einer 1 : 500 verdünnten Proteinase K / PBT Lösung anverdaut: Embryonen bis 24 h für 6 min , Embryonen älter als 24 h für 15 min.
- kurz mit PBT stoppen, dann 5 min mit PBT waschen.
- Nachfixieren für 20 min in 4 %igem PFA bei RT.

- 2 x 5 min mit PBT waschen.
- kurz mit H₂O waschen und sofort gegen eine Lösung von 1 ml 1,2 M Triethanolamin pH 7 mit 2,5 μ l Acetanhydrid austauschen und für 10 min bei RT zur Unterdrückung der endogenen Phosphatasen inkubieren.
- 2 x in PBT für 10 min waschen.
- für 1 h im Equilibrierungspuffer (Tunel-Kit Puffer # 01) bei RT inkubieren.
- Puffer abziehen und gegen eine 1 : 3 verdünnte Lösung von *working strength terminal TdT* / Puffer # 02 austauschen und ü.N. bei 37°C inkubieren.
- Stop / Wash Puffer 1 : 40 in dd H₂O verdünnen.
- 10 x 10 min mit Stop / Wash Puffer bei RT waschen.
- 2 x 10 min mit PBT waschen.
- Embryonen für 2 h bei RT in 10 %igem BSA / PBT Lösung blocken.
- Blocklösung gegen den entsprechend in 1,5 %igem BSA / PBT verdünnten α -DIG-AP gekoppelten Antikörper austauschen und ü.N. bei 4°C inkubieren.
- Waschen in PBT bei RT für 10 x 10 min.
- Embryonen 2 x kurz in Dig-Färbelösung waschen, in Dreierblockschälchen überführen, Lösung abziehen und 1 ml frische Dig-Färbelösung mit 4,5 μ l NBT und 3,5 μ l BCIP zugeben.
- Färbung durch mehrmaliges Waschen mit PBT stoppen.

2.3.5 Herstellung Digoxigenin-markierter RNA-Sonden

Die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Sonden wurden wie in Tabelle 2.1 angegeben linearisiert und transkribiert.

- Der Vektor pBluescript mit dem als Sonde dienenden cDNA-Fragment wird linearisiert, wobei stromabwärts gelegene, vektorielle Sequenzen abgetrennt werden und ein rein den cDNA-Sequenzen entsprechendes Transkript gebildet wird.
- Der linearisierte Vektor wird mit Phenol / Chloroform extrahiert, gefällt und in einem geeigneten Volumen H₂O plus 1 μ l RNase-Inhibitor (40 U / μ l, Boehringer) aufgenommen
- Folgender Reaktionsansatz wird pipettiert und für 2 h bei 37°C inkubiert:

x μl linearisierter Vektor (x μl sollen 1 μg Vektor enthalten),
 2 μl 10 x Transkriptionspuffer,
 2 μl Dig / Flu-NTP *labeling Mix*,
 2 μl T3- bzw. T7-Polymerase,
 1 μl RNase-Inhibitor (40 U / μl),
 auf 20 μl mit DEPC-H₂O auffüllen.

- Reaktion mit 4 μl 0,1 M EDTA stoppen.
- Fällen mit 2,5 μl 4M LiCl und 75 μl 100 %igem Ethanol bei -70°C für 30 min.
- Kurz in 70 %igem Ethanol waschen, Pellet trocknen.
- Aufnehmen in 100 μl DEPC-H₂O plus 1 μl RNase-Inhibitor (40 U / μl).

Folgende Sonden wurden für diese Arbeit verwendet:

Sonde	Name des Vektors	Vektor erhalten von	linearisiert mit	Polymerase
<i>nkx5.1</i>	pBS <i>nkx5.1</i>	E. Bober	EcoRI	T7
<i>pea3</i>	pBS <i>pea3</i>	H. Steinbeißer	NotI	T7
<i>eyal</i>	pCS2+ <i>eyal</i>	C. Petit	EcoRI	T7
<i>myoD</i>	pBS <i>myoD</i>	E. Weinberg	BamHI	T7
<i>krox20</i>	KS+ <i>krox20</i>	unbekannt	PstI	T3

2.3.6 Herstellung Gelatine-beschichteter Objektträger

- Gelatinelösung: 1,25 g Gelatine / 250 ml dd H₂O erwärmen,
- Objektträger ca. 15 min unter fließendem Wasser waschen,
- 2 x kurz in dd H₂O tauchen,
- 2 x kurz in 96%iges EtOH tauchen,
- trocknen,
- in 0,5 %ige Gelatinelösung tauchen,
- trocknen,
- im Präparatekasten staubfrei aufbewahren.

2.3.7 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.

2.3.8 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.

2.3.9 Semidünnschnitte

Die in Kunstharzblöcke eingebetteten Embryonen werden in Blockhalter gespannt und mit einer scharfen Rasierklinge zugeschnitten. Die Schnitte (50 – 100 μm) wurden von Hand mit einer Schick-Rasierklinge gefertigt und auf Gelatine-beschichtete Objektträger gebracht.

Anschließend wurden die Schnitte mit Durcopan (mittelfest) und einem Deckglas eingedeckelt.

2.4 Zellmarkierungen

2.4.1 Verwendete Fluoreszenzfarbstoffe

Als Fluoreszenzfarbstoffe dienten für Zellmarkierungsexperimente Fluorescein Dextran Amin (FDA) und Rhodamin Dextran Amin (RDA). Aufgrund ihres hohen Molekulargewichts (MW 10000) war eine Diffusion über *gap-junctions* zwischen benachbarten Zellen ausgeschlossen. FDA wird durch blaues Licht (Abs: 494 nm, Em: 521 nm) angeregt, Rhodamin im grünen Spektralbereich (Abs: 570 nm, Em: 590 nm). Die aufgrund freier Aminogruppen in neutraler Lösung (pH 7) leicht negativ geladenen Farbstoffe wurden iontophoretisch in die embryonalen Zellen injiziert. Das Chromophor blieb auch nach Fixierung des Gewebes stabil, da die Aminogruppe durch kovalente Bindung der Aldehydgruppe des Fixativs (Paraformaldehyd, 4 %) stabilisiert wurde. Dies ermöglichte die Anfertigung unbegrenzt haltbarer Dauerpräparate. Die Fluoreszenzfärbung wurde im fixierten Gewebe direkt unter UV-Licht gesichtet oder aber durch Verwendung eines HRP-konjugierten FDA- bzw. RDA-Antikörpers und einer daran anschließenden HRP-Färbung sichtbar gemacht. Letztere Technik ermöglichte die Anfertigung von Schnittpräparaten.

Vorrangig wurde in allen Markierungsexperimenten RDA verwendet. RDA stellte sich als Fluoreszenzmarker gegenüber FDA als geeigneter heraus, da in späteren Entwicklungsstadien die Pigmentzellen bei UV-Bestrahlung Licht ebenfalls im grünen Spektralbereich reflektieren und dadurch FDA-Markierungen teilweise kaschiert werden. In einer Experimentreihe wurden jedoch RDA und FDA gleichzeitig verwendet. Hier sollten innerhalb eines Embryos zwei benachbarte Regionen untersucht werden. Durch Verwendung verschiedener Farbstoffe konnte die Nachkommenschaft der jeweiligen Fluoreszenzmarkierung zugeordnet werden.

2.4.2 Durchführung der Zellinjektionen

Als Injektionsmikroskop diente ein *Zeiss* „Standard“ Mikroskop (Objektive: *Zeiss* 6,3 / 0,20 (Neofluar), *Zeiss* 16 / 0,35 (Plan), *Leitz* 10 / 0,30 (Plan/ Fluor)).

Zur Vorbereitung auf die Zellmarkierung wurden Embryonen des gewünschten Alters einzeln in einen Tropfen Methylzellulose (3 %) überführt, der zuvor in die Vertiefung eines Hohlschliffobjektträgers aufgetragen wurde. Hier wurden die Eier mit Hilfe feiner Uhrmacherpinzetten dechorionisiert. Die in der Methylzellulose „schwebenden“ Embryonen konnten unter Verwendung eines feinen Wimpernhärchens leicht umorientiert werden, ohne direkt berührt zu werden. Die Embryonen sind auch in diesen Stadien noch recht fragil und ein direkter Kontakt mit Pinzetten, Pipetten oder anderem Werkzeug sollte vermieden werden. Der dechorionisierte Embryo wurde jeweils so ausgerichtet, dass der Bereich der vorderen Somiten in Aufsicht im unteren Drittel des Bildfeldes zu sehen war, mit dem anterioren Ende nach oben und der Schwanzknospe nach unten.

Bestimmung des Entwicklungsstadiums, Dechorionisieren und Orientieren der Embryonen geschah unter einem Stereomikroskop bei 5-facher Vergrößerung. Für die eigentlichen Injektionsexperimente wurde an einem mit Epifluoreszenz ausgestatteten *Zeiss*-Standardmikroskop bei 125-facher Vergrößerung gearbeitet.

20 Minuten vor Beginn des Experiments wurden Injektionskapillaren mit Fluoreszenzfarblösung gefüllt. Dabei wurde ein Tröpfchen (0.25 μl) FDA an der offenen Rückseite der Kapillare abgesetzt, welches dann durch Kapillarkräfte bis in die Spitze gesogen wurde. Die befüllte Kapillare wurde auf die Platinelektrode des Kapillarenhalters gesteckt, der seinerseits von einem *Leitz*-Mikromanipulator geführt wurde. Nachdem die Gegenelektrode in die Methylzellulose eingeführt war, konnte die Kapillare in die gewünschte Position über den Embryo gebracht und nach abwechselndem Fokussieren der Zelle und Höhenverstellen der Nadel erfolgreich in die Zelle eingeführt werden. Die FDA-Injektion erfolgte bei einer Stromstärke von ca. 20 nA, die von einem *WPI*-Mikroiontophorese Stromgenerator aufgebracht wurde. Die Dauer der Injektion, und damit die Menge des eingebrachten Farbstoffes, ist unter zugeschaltetem Fluoreszenzlicht kontrolliert worden. Ob eine Injektion erfolgreich verlief, konnte schon nach 15 bis 20 Minuten beurteilt werden. Ein Teil der Zellen überlebte die Prozedur nicht. Teilweise verfehlte die Kapillare auch die Zelle und der Fluoreszenzfarbstoff wurde in die Zellzwischenräume injiziert. Nach der zweiten

Kontrolle unter Fluoreszenzlicht wurde die Position der markierten Zelle kartiert und tabellarisch verzeichnet. Zusätzlich wurde jeder Embryo unter Fluoreszenzlicht in dorsaler und lateraler Ausrichtung fotografiert.

Die Auswertungen der Fluoreszenzmarkierungen wurden an einem *Zeiss* Photomikroskop: „Axiophot“ mit Durchlicht und Auflicht-Fluoreszenz durchgeführt. (Okulare: Zeiss 0,5 x / 25 (Plan); Objektive: Zeiss 10 x 0,25 (Achrostigmat), 20 x 0,45 (Achrostigmat), 20 x 0,50 (Plan-Neofluar), 40 x 0,75 (Plan-Neofluar), 63 x 1,25 (Plan-Neofluar; Oil)). Das *Axiophot* war ausgestattet mit einer HBO 50 Fluoreszenzleuchte, einer CCD Farbkamera (12 V) sowie einem Kamerasteuergerät (AVT-Horn).

Bilddaten wurden über einen PC unter Verwendung der *dhs*-Bilddatenbank eingezogen und verwaltet und anschließend auf CD-ROM gespeichert und archiviert. Im Anschluss an die fotografische Auswertung wurden die Embryonen in Zebrafischringer überführt und zur weiteren Entwicklung in einem 23°C-Inkubator gesammelt. Die Sichtung der Markierungen erfolgte am darauffolgenden Tag. In einigen Fällen wurde die Beobachtung der Markierung über zwei bis drei Tage ausgedehnt, um das weitere Entwicklungsschicksal der Zellen genauer zu bestimmen.

2.4.3 Bestimmung der Injektionskoordinaten

Im Rahmen dieser Arbeit wurden drei Serien von Injektionsexperimenten durchgeführt. Die Injektionen der Serie #1 wurden an jungen Neuralplattenstadien (2-Somiten, 10,5hpf) durchgeführt. Serie #2 umfasste Embryonen früher Neuralkielstadien (5/6-Somitenstadien, 12hpf), Serie #3 Embryonen älterer Neuralkielstadien (8/9-Somitenstadien, 13hpf). Serie #2 gliederte sich wiederum auf in (a) Markierungen innerhalb der Epidermis (= Markierung von Plakodenzellen) und (b) Markierungen in den dorsalen Abschnitt des Neuralkiels (= Markierung von Neuralleistenzellen). Die Position der markierten Zellen wurde unmittelbar am Embryo unter Fluoreszenzlicht bestimmt. Dabei diente der rechte Rand des Notochords (bei 2-Somiten Embryonen) bzw. der rechte Rand des Neuralkiels (bei Stadien älter als 5-Somiten) als medio-lateraler und die erste Somitengrenze als anterio/posteriorer Referenzpunkt. Eine Darstellung dieser Verhältnisse findet sich in folgender Abbildung:

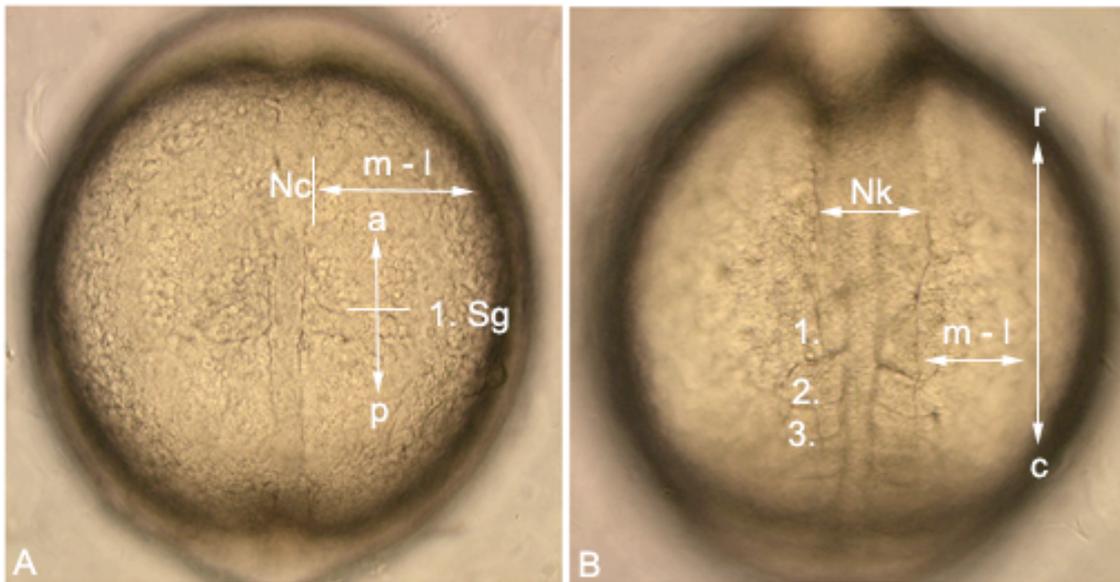


Abb. 2.1: Positionsbestimmung des Injektionsortes innerhalb des Ektoderms.

A: 10,5 hpf Embryo in dorsaler Aufsicht **B:** 12 hpf Embryo im Neuralkielstadium in dorsaler Aufsicht. Dargestellt sind die Messgrößen, die zur Bestimmung des Injektionsortes verwendet wurden. Ausdehnung der Neuralplatte: ca. $300\mu\text{m}$, bzw. rund 63 Zellen, bei einem errechneten Zelldurchmesser von $4,75\mu\text{m}$. (Nc) Notochord, (Nk) Neuralkiel, (1.Sg) Grenze zwischen erstem und zweitem Somiten, (m-l) medio-lateral, (a) anterior, (c) caudal, (p) posterior, (r) rostral. Anterior zeigt nach oben.

Embryonen früher Somitenstadien wiesen, bedingt durch natürliche Varianz, kreisrunde bis ovale Formen auf. Da sie aufgrund der unterschiedlichen Größenverhältnisse nicht miteinander in Bezug gesetzt werden konnten, wurden für Injektionsexperimente möglichst ähnlich geformte Embryonen verwendet.

Die medio-laterale (m-l) und antero-posteriore (a-p) Position der markierten Zelle(n) wurden für Serie #1 als Injektionskoordinaten (m-l / a-p) tabellarisch verzeichnet und im Anschluss in eine schematisierte Karte übertragen.

In vorangegangenen Zellmarkierungsexperimenten (Papan, 1997) wurde die Position fluoreszenzmarkierter Zellen innerhalb der Neuralplatte mit Hilfe eines Okular-Gitternetzes und eines zusätzlichen Mikromaßstabes bestimmt. Hierbei wurde die Neuralplatte vereinfacht als plane Struktur betrachtet. Tatsächlich weist sie jedoch aufgrund der kreisrunden Form der Embryonen zum Rand eine Krümmung auf. Die Positionsbestimmung nach dieser Methode ist legitim für mediale und intermediäre Bereiche der Neuralplatte und der dabei entstehende Fehlerwert ist zu vernachlässigen.

Laterale Bereiche des Embryos erscheinen jedoch in dorsaler Aufsicht durch die plane Projektion aufgrund der Oberflächenwölbung verzerrt. Da in diesem Experiment ausschließlich Zellen untersucht wurden, die am äußeren Rand der Neuralplatte bzw. weit lateral dazu lagen, musste ein anderer Ansatz zur Positionsbestimmung gewählt werden. So wurde der Abstand jeder einzelnen Markierung vom jeweiligen Referenzpunkt durch Zählen der dazwischenliegenden Zelldurchmesser erhalten.

Im Rahmen der Injektionsserien #2 a, b und #3 wurden Zellmarkierungen innerhalb einer zuvor klar definierten Region durchgeführt. Diese Region stellt den posterioren Teil der *pea3*-Expressionsdomäne dar und umfasst einen Bereich von 8 x 25 Zellen innerhalb des Ektoderms, seitlich zum Neuralkiel (vergleiche **Abb.2.2**).

Die Position der einzelnen Markierungen wurde direkt am Mikroskop bestimmt und in eine schematisierte Karte übertragen. Zusätzlich wurden Kontrollinjektionen nach der Methode von Müller (Müller *et al.*, 1996) durchgeführt. Hierzu wurden alle Injektionen doppelt ausgeführt, wobei der erste Embryo zur Weiterentwicklung aufgehoben und der zweite direkt fixiert wurde. Eine daran anschließende *in situ* Färbung mit der *pea3*-Sonde gab Aufschluss über die Position der Markierung in Bezug zur *pea3* Domäne. FDA und RDA konnten in fixiertem und gefärbtem Gewebe direkt unter UV-Licht gesichtet werden. Alle Markierungen, auch wenn sie außerhalb der *pea3*-Region lagen, kamen zur Auswertung. Kontrollmarkierungen konnten ausschließlich für die Experimentreihe an 8/9-Somiten Embryonen durchgeführt werden, da erst ab diesem Stadium die *pea3* Domäne den vollen Umfang entwickelt hatte.

Die Injektionsserie #2 beinhaltete, wie oben erwähnt, zwei Staffeln. (a): Markierungen innerhalb der mutmaßlichen postotischen Plakode (Epidermis). (b): Markierungen innerhalb des dorsalen Dachs des Neuralkiels. Dort liegen die noch prämigratorischen Neuralleistenzellen. Die Positionen der markierten Zellen wurden fotografisch festgehalten und in eine schematisierte Karte übertragen.

In allen Injektionsserien wurden sowohl Einzell- als auch Mehrzellmarkierungen zur Auswertung gebracht. Innerhalb der Neuralplatte konnten zwei benachbarte, fluoreszenzmarkierte Zellen leicht als zwei Einzelzellen erkannt werden. Innerhalb der ersten Serie wurde festgehalten, ob einzelne oder Gruppen von Zellen markiert wurden. In Neuralkielstadien dagegen waren Markierungen dicht nebeneinander liegender Zellen nicht sicher als Ein- oder Mehrzellmarkierung zu erkennen. In Serie #2 und #3 wurden Einzellmarkierungen nicht gesondert verzeichnet. Diese Daten standen einer klonalen Analyse nicht zur Verfügung.

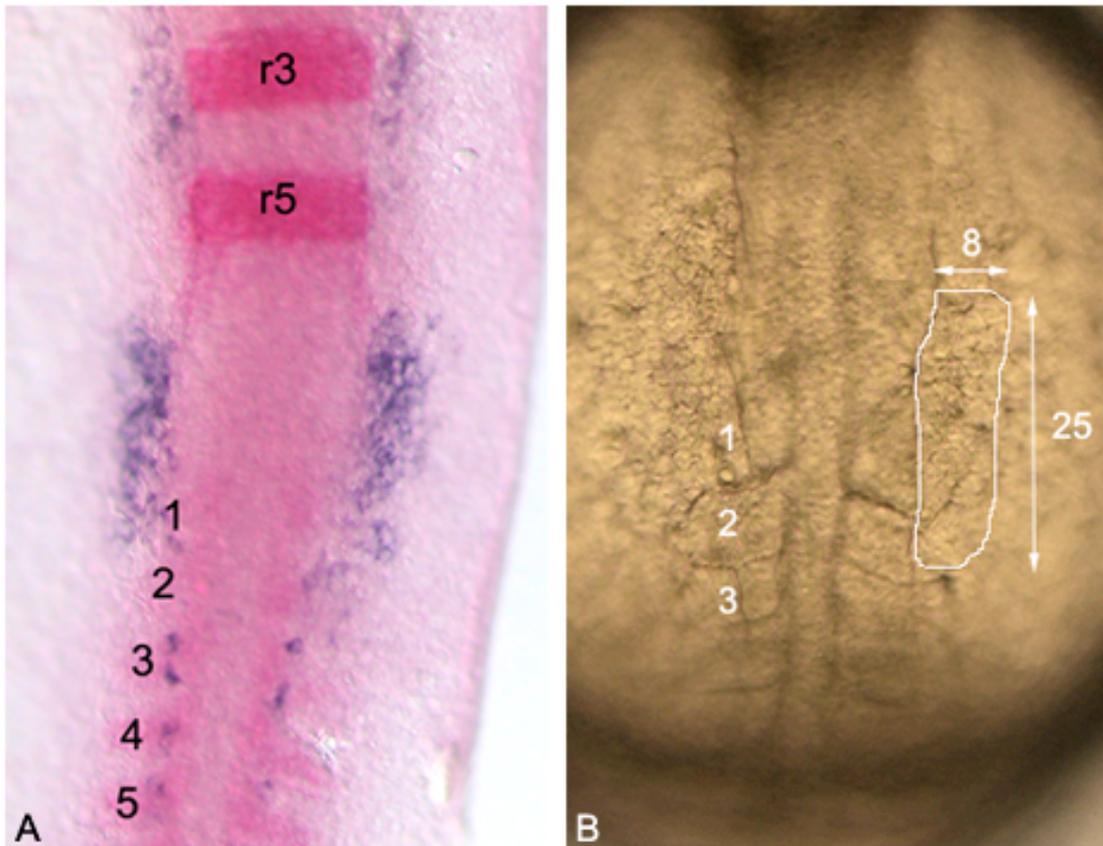


Abb. 2.2: Darstellung der epidermalen Plakodenregion, innerhalb welcher die Zellmarkierungen erfolgten. **A:** Ausschnitt eines 7/8 Somitenembryo in dorsaler Aufsicht. 3fach-in situ Färbung mit den Sonden: *krox20* (rot), *myoD* (rot) und *pea3* (blau). Die *krox20*-Domänen „r3“ und „r5“ markieren die Rhombomeren 3 und 5 im oberen Bildabschnitt. Die Position der frühen Somiten (1, 2, 3...) wird durch die *myoD*-Expression im unteren Bildabschnitt hervorgehoben. Die blaue Färbung markiert alle *pea3* exprimierenden Zellen. **B:** Dorsalansicht eines Embryos im Neuralkielstadium (13 hpf), der weiß eingefasste Bereich markiert den Injektionsbereich und besitzt die Größe der in **A** dargestellten *pea3*-Domäne mit einem Durchmesser von ca. 8 Zellen entlang der medio-lateralen und 25 Zellen entlang der antero-posterioren Achse. Anterior ist oben.

2.5 Konfokale Mikroskopie

Konfokale Bilder wurden an einem *Zeiss* „LSM 410Axiovert“ unter Verwendung eines 40 fach 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 %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 in $\frac{1}{3}$ ZFR wurde die Kammer großzügig bedeckt. Um das Verdunsten der Flüssigkeit und ein Austrocknen der Fische über längere Untersuchungszeiträume hinweg zu vermeiden wurde die Kammer mit einem weiteren Deckglas abgeschlossen.

Alle Bilddaten wurden im Anschluss auf CD-ROM gespeichert.

Die Auswertung und Bearbeitung der Bildserien wurde im Graphikprogramm *scion image* (für PC) bzw. *NIH-image* (für *Macintosh*) und *Adobe Photoshop* vorgenommen.

2.6 Verwendete Zebrafischstämme

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

Fluoreszenzmikroskopische in vivo Untersuchungen zum Wanderverhalten des Laterallinienprimordiums wurden an der transgenen H2A.F/Z:GFP Zebrafischlinie vorgenommen. Individuen dieser Linie exprimieren in allen Zellkernen ein Histon2A.F/Z:GFP Fusionsprotein, das durch UV-Bestrahlung ansprechbar ist. Diese Linie wurde von Pauls, Geldmacher-Voss und Campos-Ortega etabliert und freundlicherweise zur Verfügung gestellt.

2.7 Abkürzungen, Symbole und Konventionen

Abs	–	Absorption (in nm)
AK	–	Antikörper
AP	–	Alkalische Phosphatase
BCIP	–	5-Bromo-4-Chloro-3-Indolylphosphat
BSA	–	(<i>bovine serum albumine</i>) Rinderserumalbumin
DAB	–	Diaminobenzidin
dd H ₂ O	–	doppelt destilliertes H ₂ O
DEPC	–	Diethylpyrocarbonat
dH	–	Grad deutscher Härte (Gesamthärte des Leitungswassers)
Dig	–	Digoxygenin
DMF	–	Dimethylformamid
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
pLL	–	posteriore Laterallinie
pLLG	–	Ganglion der posterioren Laterallinie
pLLP	–	Primordium der posterioren Laterallinie

RDA	–	Rhodamin Dextran Amin
RT	–	Raumtemperatur
s	–	Sekunden
SSC	–	<i>standart saline citrat</i>
TAE	–	Tris/Acetat/EDTA-Puffer
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.

3. Ergebnisse

3.1 Die embryonale Laterallinie

3.1.1 Das Verteilungsmuster der primären Neuromasten

Mit Abschluss des zweiten Tages der Entwicklung ist die embryonale Laterallinie in ihrer Grundstruktur angelegt. Sie umfasst rund fünf Kopfneuromasten und eine Anzahl von sieben bis acht Neuromasten, die entlang beider Flanken des Fischembryos in rostro/caudaler Richtung positioniert liegen. Die Untersuchungen dieser Arbeit befassen sich ausschließlich mit der Entwicklung der medialen Rumpflinie. Alle im Folgenden gemachte Angaben beziehen sich nur auf diesen Anteil des posterioren Lateralliniensystems.

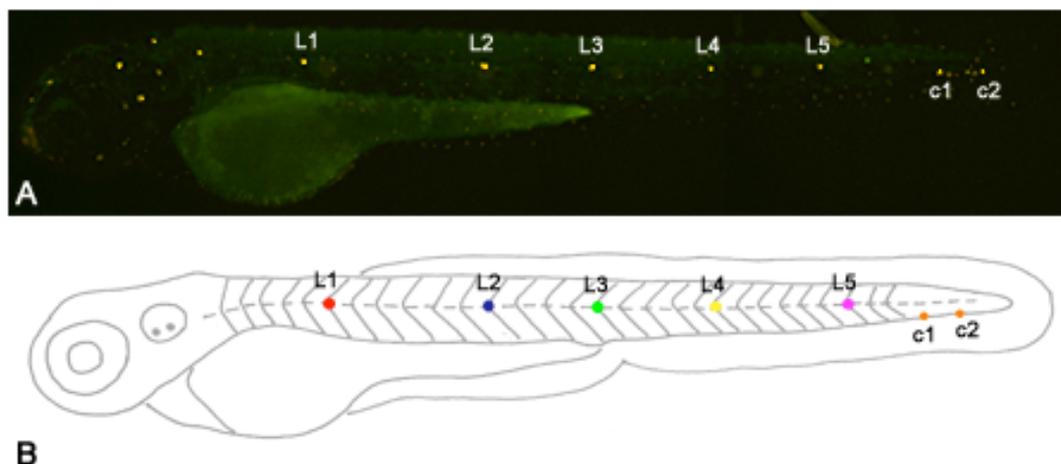


Abb. 3.1: **A:** Darstellung einer DASPEI-gefärbten Larve bei 72 hpf in Lateralansicht. Der Fluoreszenzfarbstoff hat sich in ausdifferenzierten Haarsinneszellen der primären Neuromasten angereichert. Neben den Rumpfneuromasten (L1 bis C2) sind auch Kopfneuromasten deutlich zu erkennen. **B:** Schematische Darstellung der gleichen Larve. Die einzelnen Neuromasten der posterioren Rumpflinie sind farblich hervorgehoben. Rostral ist links, dorsal ist oben.

Die Neuromasten der Rumpflinie kommen immer an intersomitischen Grenzen zu liegen. Auch bei späteren Lageveränderungen orientieren sie sich entlang dieser

Grenzen. Durch die Vitalfärbung mit dem Fluoreszenzfarbstoff DASPEI an >56 hpf (hpf: Stunden nach Befruchtung) alten Embryonen, dargestellt in **Abb.3.1**, wird die Verteilung der primären Neuromasten deutlich erkennbar: Der erste primäre Neuromast erscheint im Bereich der fünften bis sechsten Somitengrenze. Weitere Neuromasten folgen in regelmäßigen Abständen, wobei jeweils Intervalle von vier bis fünf Somiten entstehen.

Das Verteilungsmuster der primären Neuromasten erschien variabel und war selbst innerhalb eines einzelnen Individuums zwischen linker und rechter Körperhälfte selten übereinstimmend. In einer Stichprobe von 75 Larven bei 3dpf (dpf: Tage nach der Befruchtung) wurden die Positionen der ersten fünf Rumpfneuromasten bestimmt. Die ermittelten Werte sind in **Abb. 3.2** graphisch dargestellt. Neuromast L1 wurde in den meisten Individuen relativ präzise nahe des sechsten Somiten abgelegt. In den darauf folgenden Neuromasten kam es zu einer stärkeren Streuung entlang der antero-posterioren Achse. Die zweigipfligen Verteilungskurven deuten an, dass zwischen den einzelnen Neuromasten bestimmte Abstände eingehalten werden, so dass die Lage eines Neuromasten von der jeweiligen Position des vorhergehenden bestimmt wird.

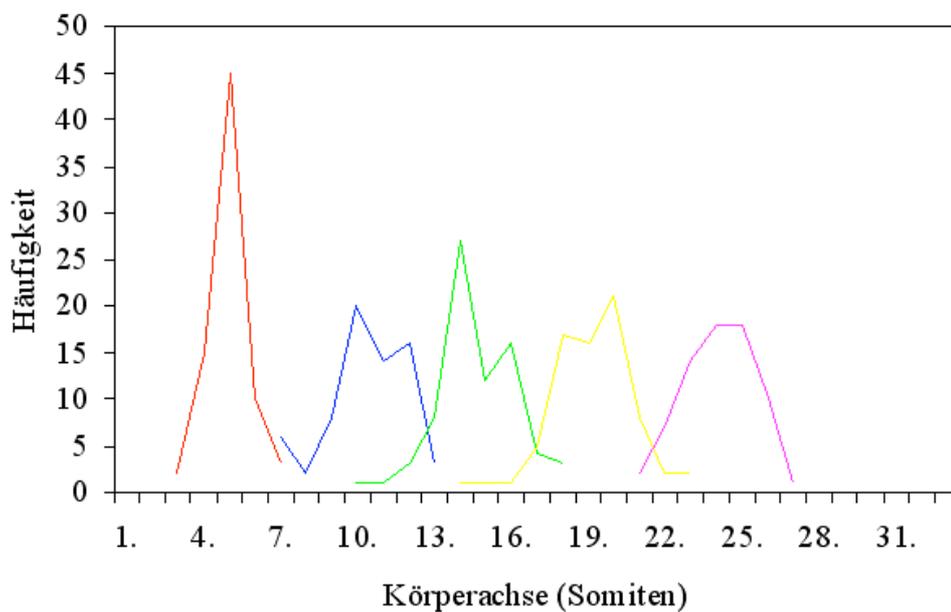


Abb. 3.2: Verteilung der ersten fünf primären Neuromasten entlang der Körperlängsachse. Die Verteilungskurven zeigen die ermittelten Positionen der einzelnen Neuromasten entlang der rostro-caudalen Achse in 75 untersuchten Individuen. Die Streuung nimmt deutlich zum Körperende hin zu. Die Farbcodierung der fünf Verteilungskurven ist übereinstimmend mit der der primären Neuromasten in **Abb. 3.1 B**.

Neben den fünf Rumpfneuromasten, die entlang der Flanke zwischen der 5. und 27. Somitengrenze direkt auf dem horizontalen Myoseptum zu liegen kommen, werden zwei weitere Neuromasten am caudalen Schwanzende abgelegt, die nicht mittig, sondern am unteren Rand der ventralen Somitenhälften positioniert werden. Ihr Abstand zueinander beträgt meist nur ein bis maximal drei Somitengrenzen. Abhängig davon, ob in diesem caudalen Abschnitt zwei oder drei Zellgruppen entstehen, kann die Gesamtzahl der primären Neuromasten, wie oben erwähnt, zwischen sieben und acht liegen.

3.1.2 Primäre Neuromasten gehen aus einem gemeinsamen Primordium hervor

Die Entstehung der primären Neuromasten und das Wanderverhalten des Primordiums wurde sowohl am Durchlichtmikroskop (Nomarski-Optik), als auch am LSM an transgenen H2A.F/Z:GFP Embryonen untersucht. In Zeitrafferaufnahmen konnte das Bewegungsverhalten der GFP-fluoreszenzmarkierten Zellkerne verfolgt und zu einem dynamischen Bild zusammengefügt werden.

Das Primordium, aus dem sich die primären Neuromasten entwickeln, wird als Primordium1 bezeichnet. In einem späteren Abschnitt der Arbeit wird die Existenz eines weiteren Primordiums belegt, das sekundäre Neuromasten hervorbringt und die Bezeichnung Primordium2 erhält. Das Primordium1 formiert sich unmittelbar hinter dem Ohrbläschen und kann bei 20 hpf erstmals als zusammenhängende Zellgruppe erkannt werden (**Abb. 3.3 A**). In den folgenden 28 Stunden wandert es entlang der Mitte des Rumpfes vom Ohr bis hinunter zum Schwanzende des Embryos und legt auf seinem Weg in weitgehend regelmäßigen Abständen Gruppen von Zellen ab.

Das Primordium1 stellt einen Verband von ca. 100 Zellen ($\bar{x}=110 \pm 14$, $n=12$) dar, der sich unterhalb der Epidermis auf Höhe des horizontalen Myoseptums über das somitische Mesoderm bewegt (vergleiche **Abb. 3.3 B**). Seine Zellen können anhand ihrer Größe und Form eindeutig vom umgebenen Gewebe abgegrenzt werden.

Das Primordium1 besitzt während der Migration eine leicht gestreckte Gestalt mit ca. 25 Zellen in der Länge und 5 bis 8 Zellen in der Breite (**Abb. 3.4 A + B**). Die Wandergeschwindigkeit des Primordiums1 wurde anhand von Zeitrafferaufnahmen berechnet. Es legt im Schnitt 1,6 Somiten pro Stunde bei 29°C zurück. Während des

Wanderprozesses zeigen die Zellen untereinander leichte Positionsveränderungen. So konnte beobachtet werden, dass einzelne Zellen unterschiedlich schnell wandern, gelegentlich zurückfallen und von benachbarten Zellen mitgeschoben werden oder umliegende Zellen überholen. Auch in Folge von Zellteilungen können ursprünglich benachbarte Zellen räumlich voneinander getrennt werden. Derartige Fluktuationen haben aber offensichtlich keinen großen Einfluss auf die Gesamtorganisation des Zellverbandes, so dass die relative Lage der Zellen zueinander erhalten bleibt.

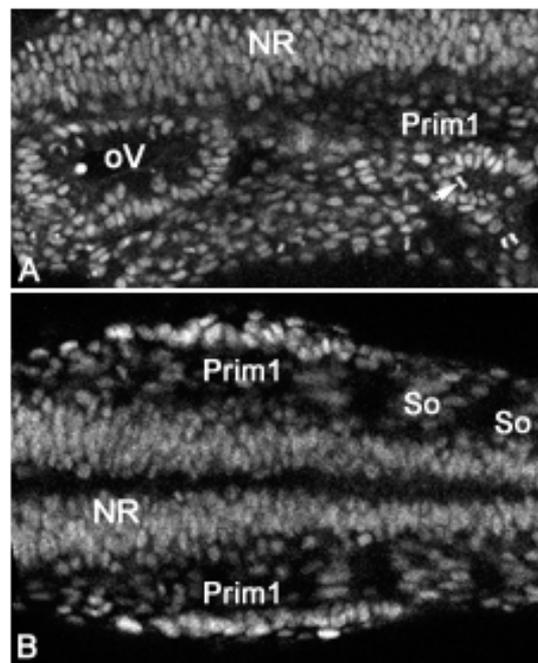


Abb. 3.3: **A:** Seitenansicht eines H2A.F/Z:GFP Embryos bei 20 hpf. Der hintere Abschnitt von Primordium1 (Prim1) ist am rechten Bildrand als zusammenhängende Zellgruppe erkennbar. Links im Bild liegt das otische Vesikel (oV). Die Pfeilspitze weist auf eine Zellteilung im Primordium hin. Rostral ist links, dorsal ist oben. **B:** Dorsalansicht eines 24 hpf H2A.F/Z:GFP Embryos. Je ein Primordium1 (Prim1) liegt seitlich an jeder Flanke des Körpers unmittelbar unterhalb der Epidermis über dem somitischen Mesoderm. (So) Somiten, (NR) Neuralrohr. Rostral ist links.

In regelmäßigen Intervallen werden im Verlauf der Migration am posterioren Pol des Primordiums Zellgruppen, sogenannte Proneuromasten oder Primärorgane, von durchschnittlich 30 Zellen ($x=30\pm 5$, $n=12$) abgelegt. Primordium und Proneuromast bewegen sich während der Trennung gemeinsam in konstanter Geschwindigkeit weiter.

Auch nach der vollständigen Abspaltung folgt der Proneuromast für weitere 90 min dem Primordium bevor er an der nächst folgenden Somitengrenze zu liegen kommt. **Abb. 3.5** zeigt die Ablage eines Proneuromasten in einem H2A.F/Z:GFP Embryo. Die Bilder sind einer Zeitrafferserie entnommen. Schon Stunden bevor es zur Abspaltung kommt, ist der zukünftige Neuromast als zusammenhängende Zellgruppe am hinteren Pol des Primordiums deutlich an seiner Gestalt zu erkennen. Dabei ordnen sich die Zellen so zueinander, dass sie als Gruppe eine Art Rosette bilden (siehe **Abb. 3.6**). Diese charakteristische Gestalt bleibt im weiteren Verlauf der Entwicklung erhalten. Im inneren Kreis der Rosette differenzieren später die Haarsinneszellen, im äußeren Kreis die Stützzellen. Acht Stunden nach Ablage eines Proneuromasts können die Haarsinneszellen anhand ihres ausgeprägten Stereocilienbündels morphologisch als solche erkannt werden. Erst jetzt ist die Anfärbung mit dem Farbstoff DASPEI erfolgreich, da der Farbstoff von den Stereocilien der Sinneszellen aufgenommen und angereichert wird.

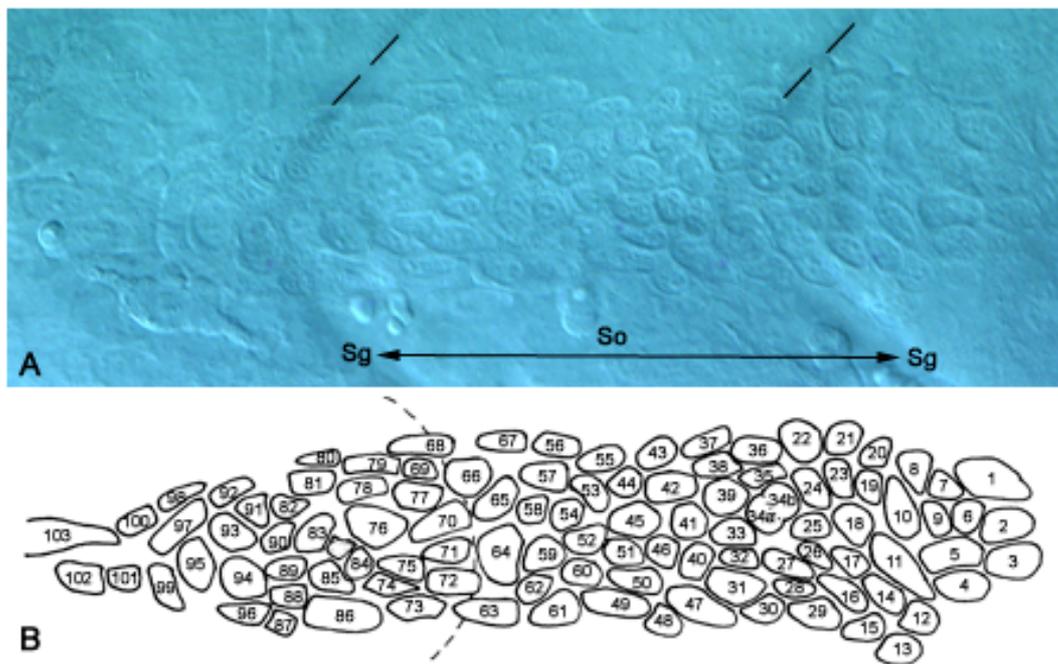


Abb. 3.4 A: Durchlichtmikroskopische Aufnahme (Nomaski-Optik) des Primordium1 bei ca. 30 hpf. Die Zellgruppe umfasst gut 100 Zellen und erstreckt sich entlang der rostro-caudalen Achse über die Breite von zwei Somiten (So). Die gestrichelten Linien kennzeichnen die intersomitischen Grenzen (Sg). Rostral ist links, dorsal ist oben. **B:** Schematische Darstellung der oberen Abbildung. Die gestrichelte Linie kennzeichnet die vordere Begrenzung des nächst

folgenden Proneuromasten. Die Zellen zeigen schon erste Anzeichen einer Umorientierung in eine Rosettenform. Zellen 76, 83, 84 und 85 bilden den inneren Zellkreis.

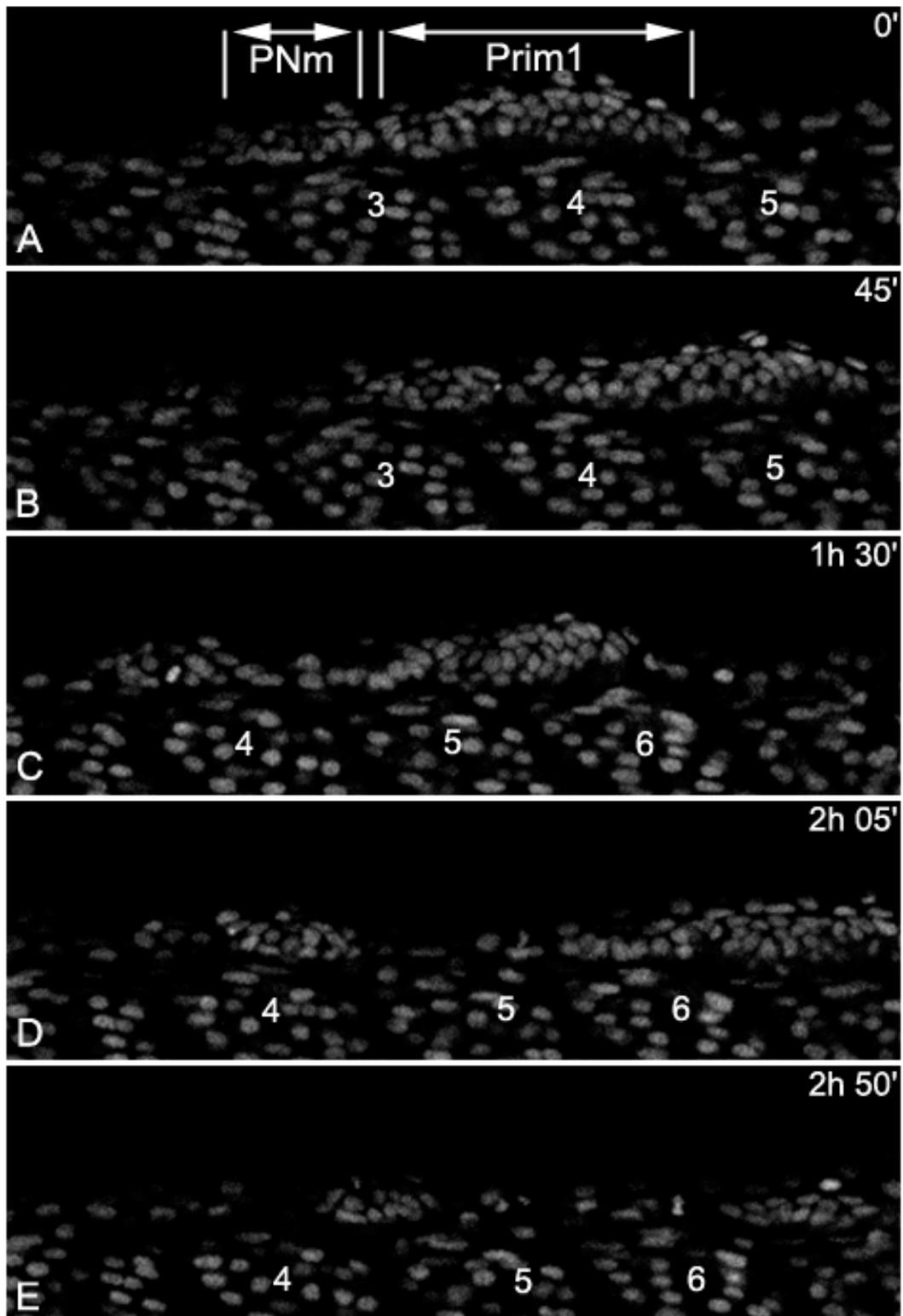


Abb. 3.5 A – E: Ablage eines Proneuromasten (PNm) vom Primordium1 (Prim1) im zeitlichen Verlauf. Einzelbilder aus einer LSM Zeitrafferserie an H2A.F/Z:GFP Embryonen. Beginn der Serie bei 24 hpf (prim-5). Der Proneuromast folgt dem Primordium für zwei Stunden (**A – C**), fällt dann zurück (**D**) und kommt an der 4./5. Somitengrenze zu liegen (**E**). (3, 4, 5 und 6 kennzeichnen den dritten bis sechsten Somiten). Rostral ist links, dorsal ist oben.

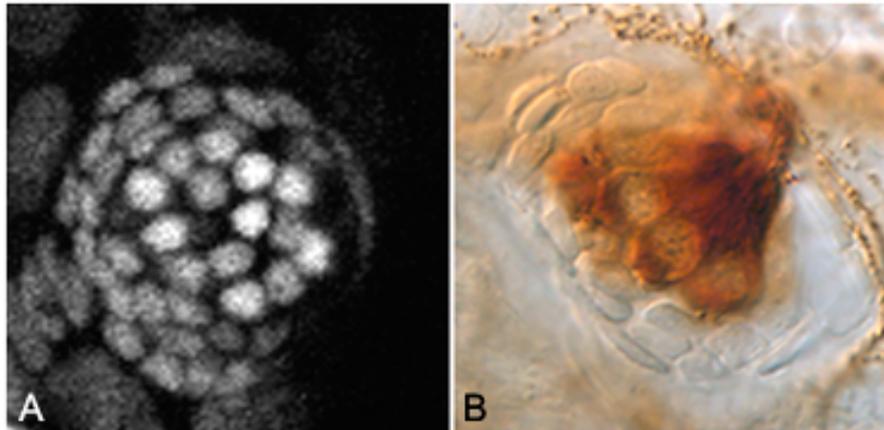


Abb. 3.6: Primärer Neuromast nach vier Tagen. **A:** Konfokale Aufnahme an einem H2A.F/Z:GFP Embryo. Rosetten-förmige Anordnung der Zellen mit ca. 14 Haarzellen im inneren Kreis und rund 40 äußeren Stützzellen. Nicht alle Zellkerne liegen in der gleichen optischen Ebene. **B:** Eine immunohistochemische Färbung gegen acetyliertes Tubulin macht die Haarsinneszellen der Neuromasten sichtbar. Deutlich zu erkennen sind die langen Cilienbündel der Sinneszellen. (Hz) Haarzellen, (Sz) Stützzellen, (C) Cilien.

Nach der Generierung der ersten fünf Rumpfneuromasten zeigt das Primordium1 einen auffallend kleineren Umfang. Zum Ende der Schwanzspitze, ungefähr auf Höhe des 29. bis 30. Somiten, verlässt die Zellgruppe ihren ursprünglichen Kurs und wandert abwärts zum ventralen Somitenrand. Dort kommen die verbleibenden Zellen des Primordiums zu liegen. Sie werden auf zwei Gruppen aufgeteilt und das Primordium erlischt. Die Größe der zwei caudalen Proneuromasten kann innerhalb einzelner Individuen sehr unterschiedlich ausfallen.

Die Größe des Primordiums ist im zeitlichen Verlauf nicht konstant. Die Zellzahl schwankt zwischen max. 120 Zellen kurz vor der Ablage und 80 Zellen nach Abtrennung eines Proneuromasts. Kontinuierliche Zellteilungen führen in diesem Zusammenhang zu einer stetigen Nachregulierung der Zellpopulation (siehe **Abb. 3.7**).

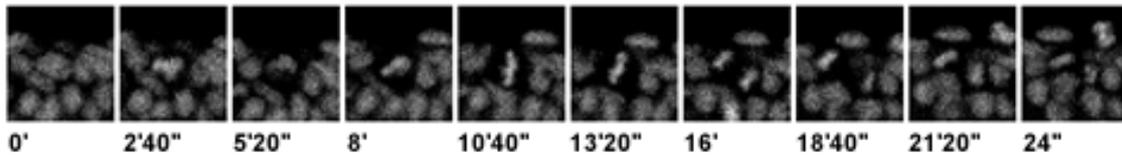


Abb. 3.7: Darstellung des Verlaufs einer Zellteilung innerhalb des Primordiums. Einzelbilder sind einer LSM Zeitrafferserie an H2A.F/Z:GFP Embryonen entnommen.

Die Axone der sensorischen Neuronen sind von Beginn an mit den Zellen des Primordiums assoziiert und wandern mit ihnen in die Peripherie (Metcalf *et al.*, 1985; Becker *et al.*, 2001, Gompel *et al.*, 2001). Folgende Abbildung zeigt den Verlauf der Axone. Sie wurden mit einem Antikörper gegen acetyliertes Tubulin immunohistochemisch angefärbt.

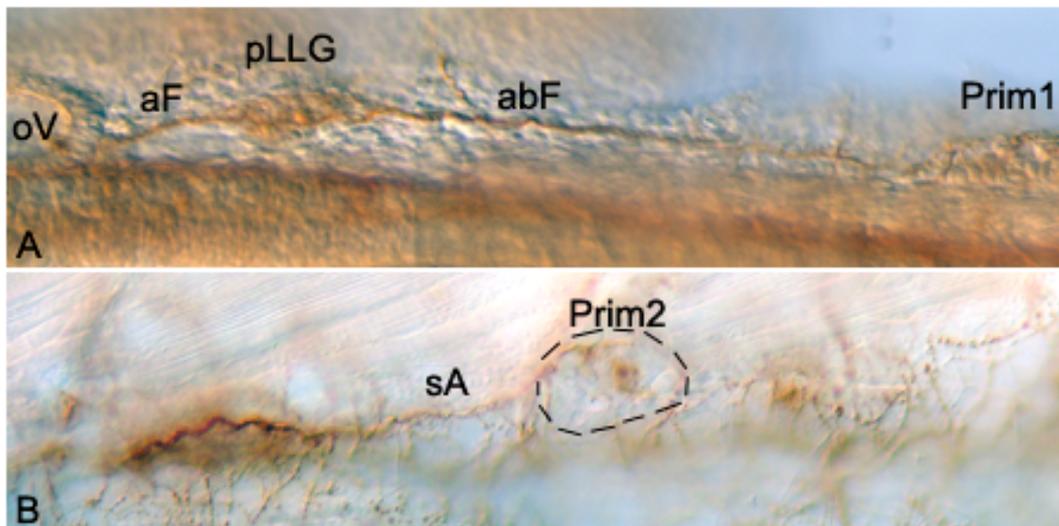


Abb. 3.8: Immunohistochemische Färbung gegen acetyliertes Tubulin. **A:** (24 hpf) Die Axone der sensorischen Neuronen, deren Zellkörper im postotischen Ganglion (pLLG) liegen projizieren zu den Zellen des Primordium1 (Prim1). Die absteigenden Fasern (abF) bilden den Lateralliniennerv. Aufsteigende Fasern (aF) projizieren vom Ganglion in das Zentralnervensystem (ZNS). (oV) otisches Vesikel. **B:** (6 dph) Die Zellen des Primordium2 (Prim2) (vergleiche Kapitel 3.2.2) scheinen in gleicher Weise mit den Axonen sensorischer Neuronen (sA) assoziiert zu sein. Die gestrichelte Linie kennzeichnet den Umfang des Primordiums. Rostral ist links, dorsal ist oben.

An immunohistochemischen Färbungen gegen acetyliertes Tubulin konnte gezeigt werden, dass die Zahl der sensorischen Neuronen im Ganglion der posterioren Laterallinie im Verlauf des ersten Entwicklungstages zunimmt. Das Ganglion wurde bei 36 hpf und 45 hpf an mehreren Individuen untersucht. **Abb. 3.9** verdeutlicht, dass der Umfang des Ganglions zwischen den untersuchten Zeitpunkten zunahm von ca. 15 Neuronen bei 36 hpf auf 25 Neuronen bei 45 hpf, also schätzungsweise zehn zusätzliche sensorische Neuronen generiert wurden.

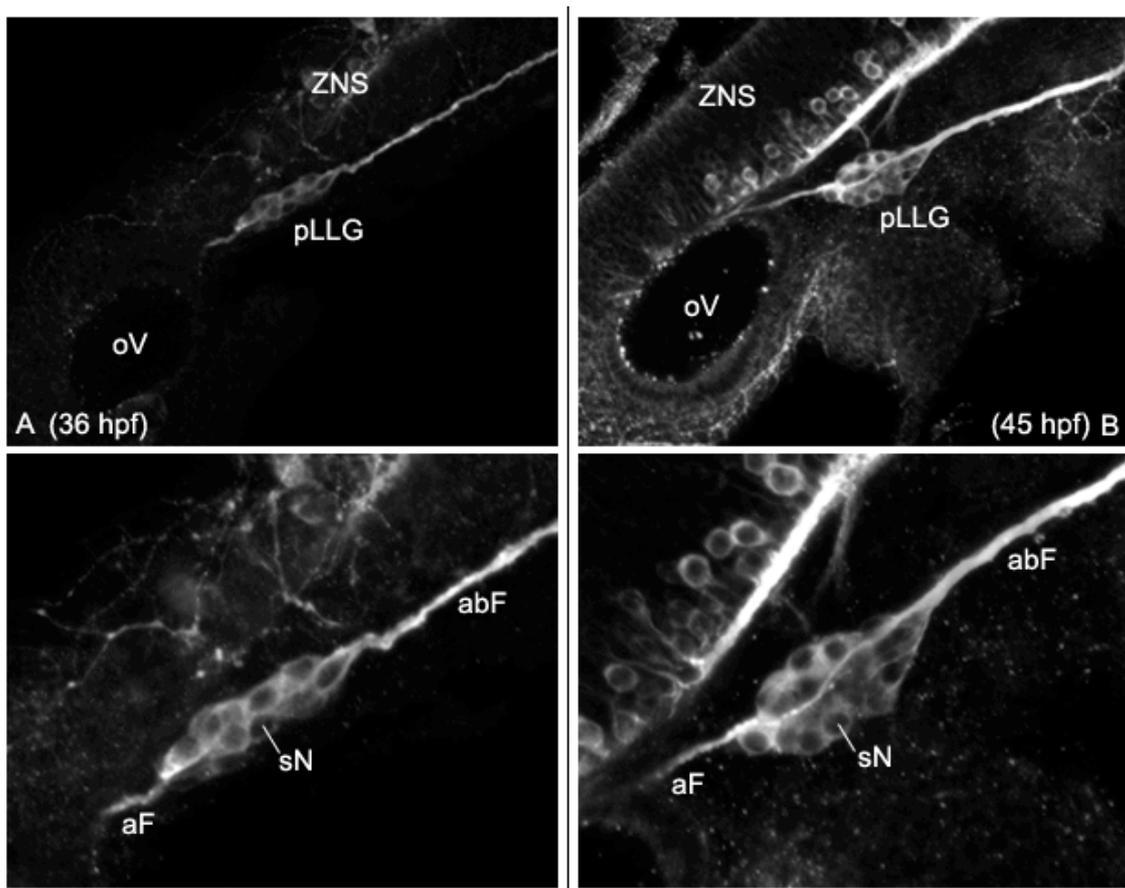


Abb. 3.9: Immunohistochemische Färbung gegen acetyliertes Tubulin unter Verwendung eines Cy3-gekoppelten zweiten Antikörpers. LSM Aufnahmen; Einzelbilder entstanden durch die Überlagerung mehrerer z-Ebenen. **A:** (36 hpf) Übersichts- (oberes Bild) und Detailaufnahme (unteres Bild) des Ganglions (pLLG). Zu diesem Zeitpunkt hat das Primordium1 die Höhe des 25. Somiten erreicht und bereits vier Neuromasten abgelegt. Die einzelnen Zellkörper der sensorischen Neuronen (sN) sind deutlich erkennbar. Axone projizieren in die Peripherie zu den Zellen des Primordiums und ins Zentralnervensystem (ZNS). **B:** (45 hpf) Übersichts- (oberes Bild) und Detailaufnahme (unterse Bild) des Ganglions. Der Umfang des postotischen Ganglions hat deutlich zugenommen, schätzungsweise zehn zusätzliche Neuronen wurden

generiert. (abF) absteigende Fasern, (aF) aufsteigende Fasern, (oV) otisches Vesikel. Rostral ist schräg unten links.

Beobachtungen junger Larven unter Interferenz-Phasenkontrast konnten zeigen, dass sich entlang der Fasern unmittelbar nach dem Verlassen des Primordiums zahlreiche Zellen gruppieren (siehe **Abb. 3.10**). Sie zeigen eine durchgehend einheitliche Gestalt, mit einem ovalen Zellkörper und dünnen Ausläufern zu beiden Seiten. Sie liegen hintereinander aufgereiht in engem Kontakt zu den Axonen und lagern sich entlang ihrer Längsachse an die Fasern an. In Zeitrafferserien konnte neben der Abspaltung von Proneuromasten zusätzlich beobachtet werden, wie am hinteren Pol des Primordiums kontinuierlich Einzelzellen den Zellverband verlassen. Der Verbleib dieser Zellen konnte in den Aufnahmen nicht genau verfolgt werden. Es schien, als kämen sie direkt nach Verlassen des Primordiums an der horizontalen Mittellinie zu liegen. Möglicherweise handelt es sich bei ihnen um *Schwann*-Zellen, die sich, wie oben beschrieben, an die mitwandernden Axone sensorischer Neuronen lagern.

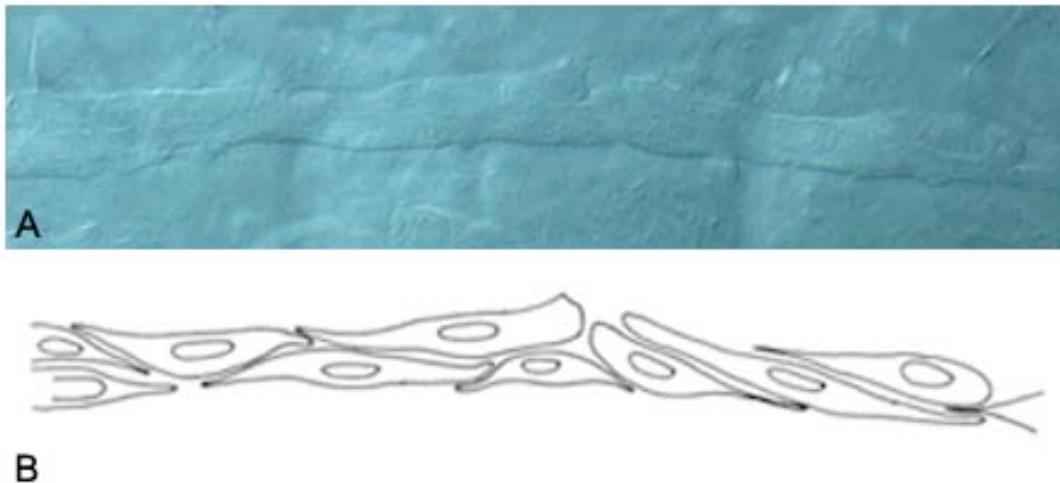


Abb. 3.10: Darstellung des Lateralliniennervs und der assoziierten Gliazellen (*Schwann*-Zellen). **A:** Durchlichtmikroskopische Aufnahme des Nervs in einem 36 hpf Embryo. Die Zellen liegen dicht hintereinander aufgereiht entlang der Axone. Teilweise sind auch ihre Zellkerne deutlich erkennbar. **B:** schematische Darstellung des oberen Bildausschnitts. Rostral ist links, dorsal ist oben.

3.1.3. Mitosen und Zelltod im Primordium und den Proneuromasten

Die Zeitrafferaufnahmen an H2A/F.Z:GFP Embryonen zeigen deutlich, dass sowohl die Zellen des Primordiums als auch die der Proneuromasten und der juvenilen Neuromasten mitotisch aktiv sind. γ -Phospho-Histon H3-Färbungen an 32 hpf bis 45 hpf Embryonen konnten diese Beobachtung bestätigen (**Abb. 3.11 A - D**).

Die Zellteilungen waren uneingeschränkt über das gesamte Ausmaß des Primordiums zu beobachten. Es gab keine gesonderten Bereiche innerhalb des Zellverbandes mit signifikant erhöhter Teilungsrate. In Zeitrafferserien wurden im Schnitt 2,5 Mitosen pro Stunde ($x = 2,5 \pm 1,4$; $n = 5$) gezählt. Interessanterweise fanden die Zellteilungen während der Migrationsbewegung der Zellen statt. Ob die einzelnen Zellen während des Zeitraumes der Teilung aktiv wanderten oder dazu abstoppten, aber von umliegenden Zellen passiv weitergeschoben wurden, konnte anhand des Bildmaterials nicht beurteilt werden. Auch in juvenilen Neuromasten wurden Mitosen beobachtet. Die Teilungsrate entsprach der des Primordiums.

Apoptotische Zellen konnten anhand des Filmmaterials ebenfalls beobachtet werden. Makrophagen, die die Reste apoptotischer Zellen aufnehmen und aus dem Gewebe beseitigen, waren an der Größe ihrer Kerne und der sehr schnellen, ungeordnet wirkenden Bewegungen zu erkennen. Jedoch wurden apoptotische Ereignisse erst in den reifenden Neuromasten (> 48 h) beobachtet. *Tunel*-Färbungen an 32 hpf bis 45 hpf Embryonen (**Abb.3.11 E - H**) bestätigen, dass es unter den Zellen des Primordiums nicht zum Zelltod kommt und apoptotische Zellen erst in abgelegten Neuromasten beobachtet werden.

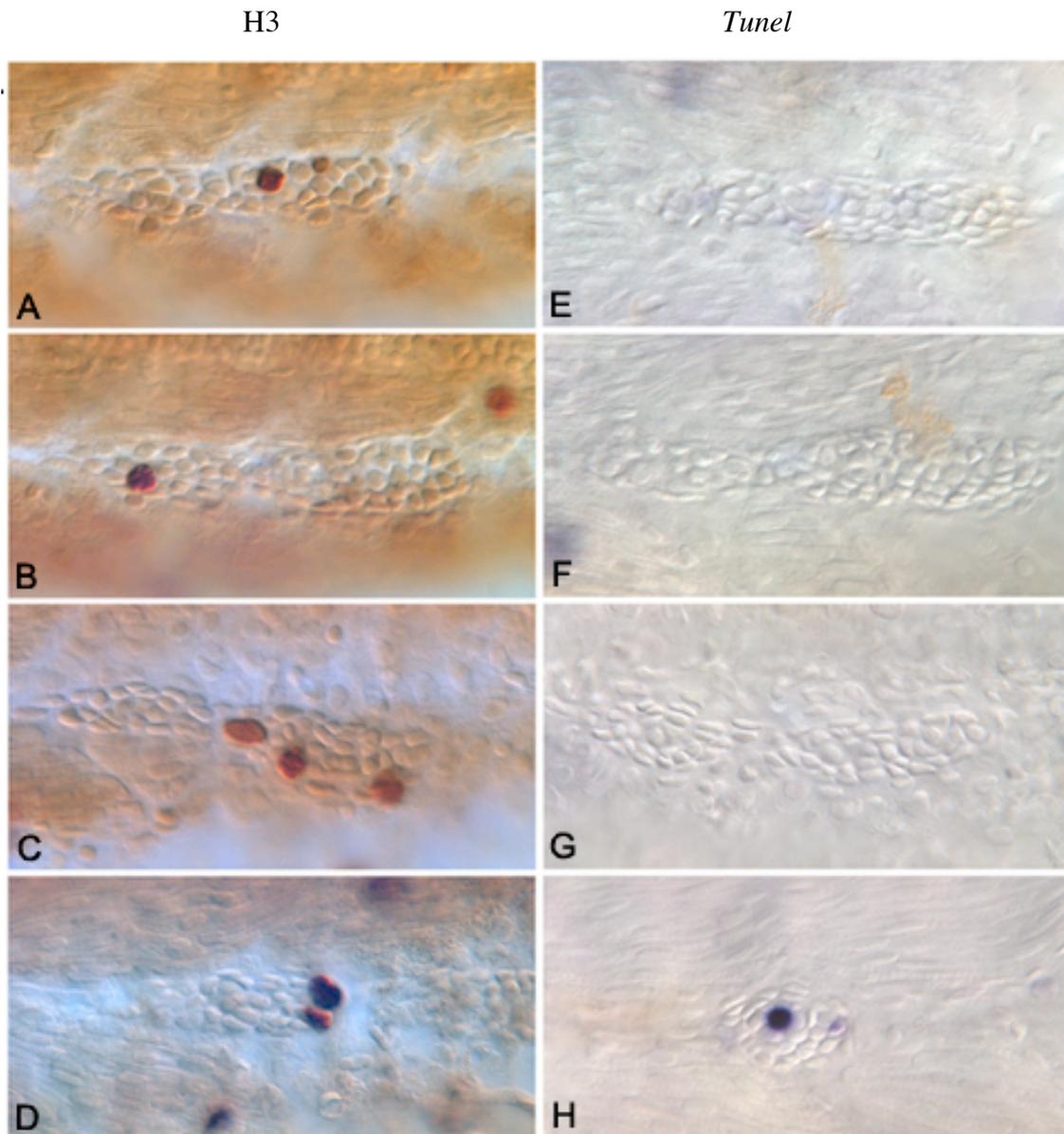


Abb 3.11: Mitosen und Apoptose im Primordium und den Proneuromasten. Die Verteilung und Häufigkeit von Zellteilungen (**A**, **B**, **C** und **D**) und Apoptose (**E**, **F**, **G** und **H**) innerhalb des Primordiums und der Proneuromasten wird anhand der Einzelbilder veranschaulicht. **A – D:** Immunohistochemische Färbung gegen Phospho-Histon H3 zur Anfärbung mitotischer Zellen in Embryonen zwischen 32 hpf und 45 hpf. **E – H:** *Tunel*-Färbung zur Anfärbung apoptotischer Zellen in Embryonen zwischen 32 hpf und 45 hpf.

3. 2 Zur Bildung der postembryonalen Laterallinie

3.2.1. Das Erscheinen sekundärer Neuromasten

Untersuchungen an jungen DASPEI-gefärbten Larven konnten zeigen, dass nach Fertigstellung der embryonalen Laterallinie die Anzahl der Sinnesorgane weiterhin zunahm. Zusätzliche Neuromasten erschienen zuerst im vorderen Rumpfbereich unmittelbar hinter dem ersten primären Neuromasten L1. Die Entstehung dieser sekundären Neuromasten verlief von anterior nach posterior, wobei sie in den Zwischenräumen der primären Neuromasten zu liegen kamen. Die Erweiterung der embryonalen Laterallinie wurde für die ersten acht Entwicklungstage in DASPEI-Färbungen quantitativ analysiert. Für jede der acht Altersgruppen wurde an 40 Individuen die Gesamtzahl der Neuromasten bestimmt. Die errechneten Mittelwerte sind in folgender Abbildung graphisch dargestellt.

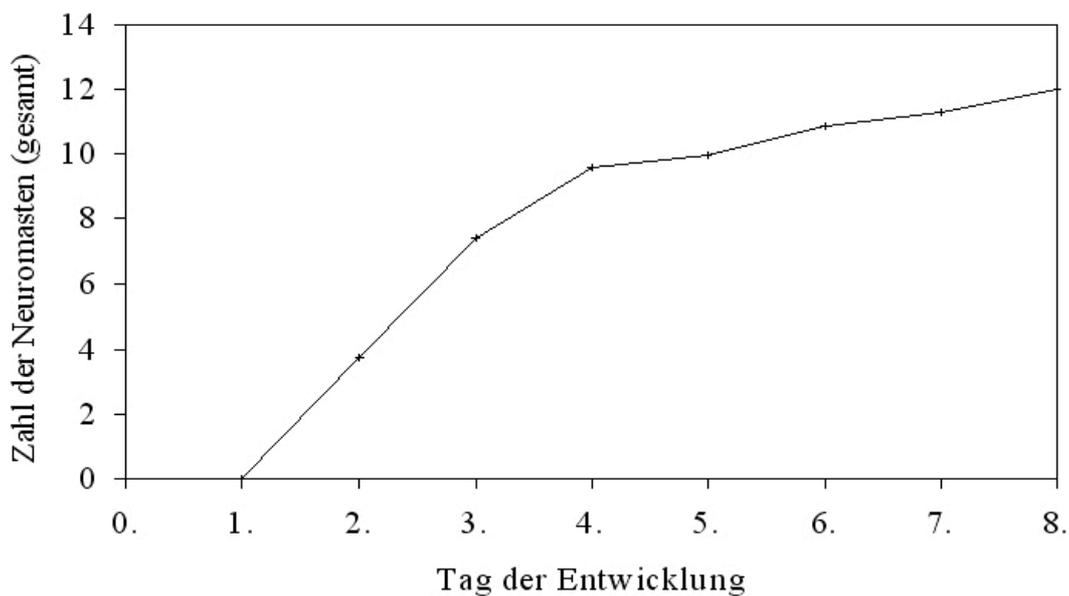


Abb. 3.12: Zunahme der Gesamtneuromastenzahl innerhalb der posterioren Laterallinie im Verlauf der ersten acht Entwicklungstage. Am achten Tag sind durchschnittlich zwölf Neuromasten angelegt. Die hier dargestellten Daten stammen aus Zählungen an DASPEI-gefärbten Larven (n = 40 je Stadium).

Die Bildung der Neuromasten setzt mit Beginn des zweiten Entwicklungstages ein. Bei 48 hpf sind alle primären Neuromasten angelegt, jedoch in DASPEI-Färbungen noch nicht vollständig sichtbar. Erst acht Stunden nach Ablage eines Neuromasts, wenn die ersten Haarsinneszellen ausdifferenziert und funktionsfähig sind, kann der DASPEI-Fluoreszenzfarbstoff von den Sinneszellen aufgenommen und angereichert werden. Da aber, so konnte später ermittelt werden, zwischen der Bildung von zwei aufeinanderfolgenden sekundären Neuromasten 16 Stunden liegen, hat die verzögerte Darstellung von acht Stunden in DASPEI-Färbungen bei älteren Stadien keinen Einfluss auf die ermittelten Daten.

In **Abb. 3.13** ist eine Serie von DASPEI gefärbten Larven unterschiedlichen Alters zusammengestellt. Nach acht Entwicklungstagen ist die Anzahl der Neuromasten auf durchschnittlich zwölf angestiegen. Das bedeutet, dass zwischen dem zweiten und achten Tag vier zusätzliche sekundäre Neuromasten angelegt wurden.

Die Situation nach vier Wochen der Entwicklung ist in **Abb. 3.13 E + E'** dargestellt. Die Zahl der Neuromasten hat soweit zugenommen, dass am Ende der Larvenentwicklung entlang der Flanke an jeder Myotomgrenze ein Sinnesorgan liegt. Die Position der ersten vier sekundären Neuromasten fällt von einem Individuum zum anderen sehr variabel aus. Der erste sekundäre Neuromast (S1) erscheint in allen untersuchten Fällen immer caudal zum ersten primären Neuromasten (L1). S1 kann direkt an die auf L1 folgende Somitengrenze oder erst in einigem Abstand dazu positioniert werden. Hier können Lücken von zwei bis drei unbesetzten Somitengrenzen entstehen. Der zweite sekundäre Neuromast (S2) folgt meist direkt auf S1. Im weiteren Verlauf kann eine Reihe von drei bis vier aufeinander folgenden sekundären Neuromasten gebildet werden, die alle im Zwischenraum von L1 und L2 zu liegen kommen (L1 - S1 - S2 - S3 - S4 - L2...). Möglich ist auch, dass S3 erst hinter L2 positioniert wird. Obwohl ihre Lage stark schwankt, befinden sich die ersten drei bis vier sekundären Neuromasten immer in einem Bereich zwischen L1 und L3.

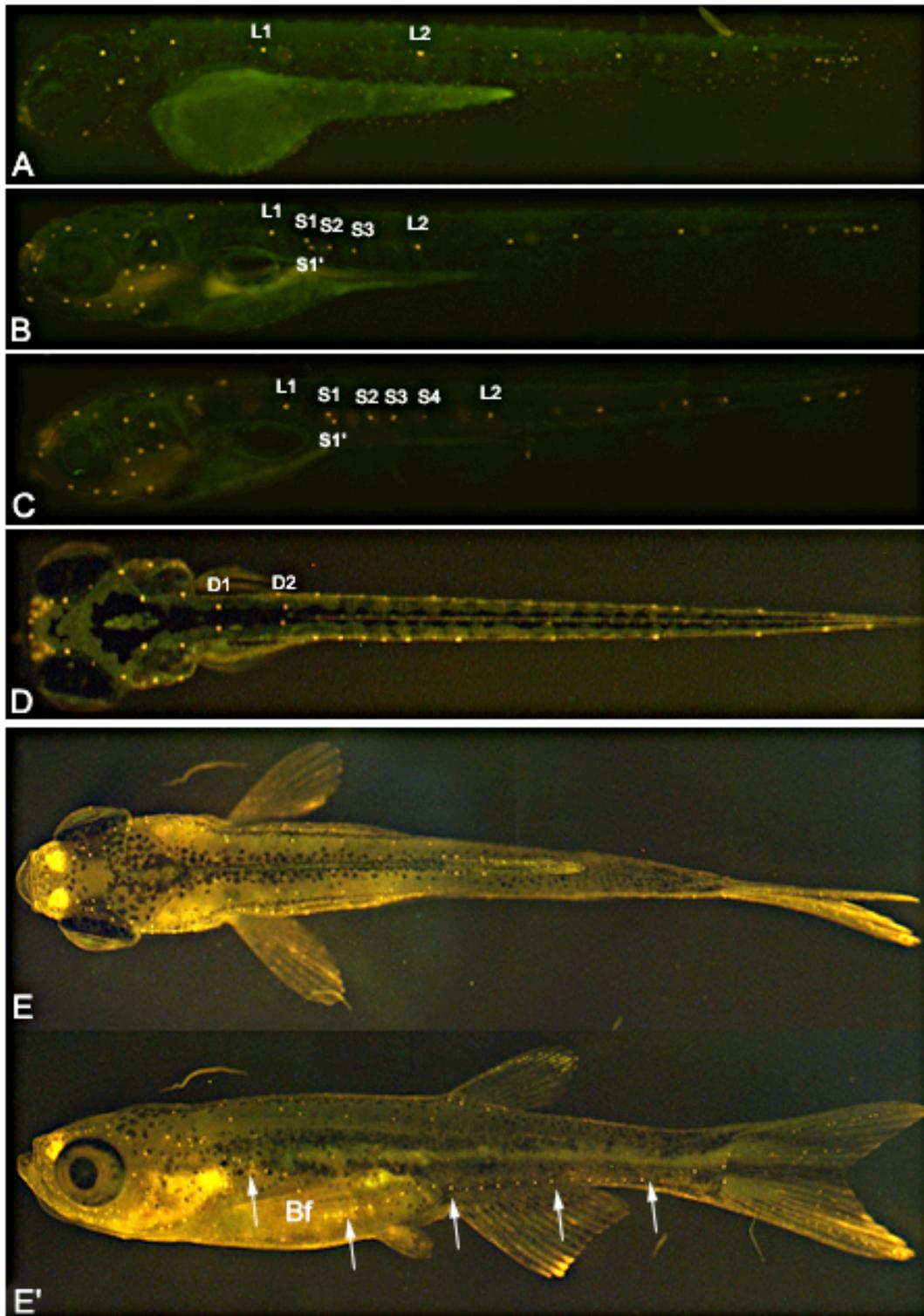


Abb. 3.13: DASPEI-Fluoreszenzfärbungen an Larven verschiedener Entwicklungsstadien.

A: Lateralansicht einer drei Tage pf alten Larve. Die primären Neuromasten sind vollständig angelegt. Die Position der zwei vorderen Neuromasten ist hervorgehoben (L1 und L2). **B:** Lateralansicht einer sechs Tage alten Larve. Im Zwischenraum von L1 und L2 erscheinen

zusätzliche Neuromasten (S1 + S1' bis S3). **C**: Lateralansicht einer acht Tage alten Larve. Die Zahl der sekundären Neuromasten ist auf fünf angestiegen (S1 + S1' bis S4). **D**: Dorsalansicht einer acht Tage alten Larve. Die ersten zwei Neuromasten der dorsalen Rumpflinie (D1 und D2) sind entwickelt und liegen nahe der dorsalen Körpermittellinie. **E + E'**: Dorsal- und Lateralansicht einer vierwöchigen Larve. Die posteriore Laterallinie besteht aus einer Reihe dicht hintereinander liegender Sinnesorgane. Jede Myotomgrenze ist von einem Neuromast besetzt. Der hintere Abschnitt der Laterallinie liegt in horizontaler Ausrichtung auf der ventralen Bauchseite der Larve. Die Neuromasten rostral zur Brustflosse (Bf) verlaufen von dieser ventralen Position in schräger Linie bis auf die Höhe des horizontalen Myoseptums. Der unterschiedliche Verlauf der posterioren Linie wird durch die fünf Pfeile markiert (siehe dazu Kapitel 3.2.3). Rostral ist links, dorsal ist oben.

Zeitgleich mit der Entstehung sekundärer Sinnesorgane innerhalb der medialen Rumpflinie werden die ersten Neuromasten der dorsalen Rumpflinie sichtbar. **Abb. 3.13 D** zeigt eine acht Tage alte Fischlarve. Zu diesem Zeitpunkt sind je zwei Neuromasten (D1 und D2) auf jeder Körperseite entstanden. Sie liegen hintereinander, parallel zur rückwärtigen Mittellinie. In vier Wochen alten Larven erstreckt sich die dorsale Linie bis zur Rückenflosse und ist damit voll entwickelt.

Das sukzessive Erscheinen zusätzlicher Sinnesorgane in antero-posteriorer Richtung läßt die Vermutung zu, dass ein weiteres Primordium zu deren Entstehung beiträgt.

3.2.2 Ein sekundäres Primordium generiert sekundäre Neuromasten

Im Rahmen dieser Arbeit konnte ein weiteres Primordium, Primordium2, identifiziert werden. Es wurde erstmals in Zeitrafferaufnahmen an H2A/F.Z:GFP transgenen Embryonen gesichtet und durch weitere durchlichtmikroskopische Beobachtungen detailliert beschrieben. Dieses Primordium hat seinen Ursprung ebenfalls in einem Bereich posterior zum Ohrbläschen und tritt als Zellverband bei ca. 45 hpf in Erscheinung. Zu diesem Zeitpunkt liegt die Zellgruppe unmittelbar vor dem ersten Somiten und umfasst ca. 35 Zellen. Bei 48 hpf, wenn Primordium1 den 30. Somiten passiert, hat das zweite die Position des 2. Somiten erreicht.

In einigen Dauerpräparaten von 40 hpf bis 45 hpf Embryonen konnte gelegentlich beobachtet werden, dass am oberen Rand von Primordium2 eine Gruppe von etwa 15 bis 20 Zellen abgespalten wird. In anderen Individuen lag diese Gruppe in einigem Abstand entfernt über dem Primordium. Bei dieser zweiten Zellgruppe handelt es sich vermutlich um das Primordium der dorsalen Rumpflinie, deren Neuromasten zeitgleich mit den sekundären Neuromasten der mittleren Rumpflinie erscheinen. Es gibt Hinweise darauf, dass Primordium2 und das Primordium der dorsalen Neuromasten aus einem gemeinsamen Pool von Zellen hervorgehen, der möglicherweise von Primordium1 noch vor dem ersten Somiten zurückgelassen wird. Die Entstehung der dorsalen Linie wurde jedoch hier nicht näher untersucht.

Eine Darstellung von Primordium2 findet sich in **Abb. 3.14**. Es zeigt in der Größe und Gestalt seiner Zellen ein ähnliches Erscheinungsbild wie Primordium1 und wandert entlang der gleichen Route auf Höhe der horizontalen Mittellinie des Rumpfes. Ein bedeutender Unterschied zu Primordium1 besteht in der Gesamtgröße der Zellgruppe. Es umfasst im Schnitt 34 Zellen ($x = 34 \pm 12$, $n = 15$). Seine Wandergeschwindigkeit beträgt 0,4 Somiten/h bei 29°C. Es bewegt sich somit um ein Viertel langsamer als das Primordium1.

Die abgelegten Proneuromasten sind mit einer Größe von ca. 20 Zellen ($x = 23 \pm 5$, $n = 12$) ebenfalls kleiner als die Proneuromasten des ersten Primordiums. Nach Ablage eines Proneuromasts dieser Größe wird jedoch das Primordium, das lediglich 30 bis 40 Zellen beinhaltet, auf ein Minimum von 10 Zellen reduziert (siehe **Abb. 3.15**).

Weiterhin wurden pro Stunde 1,3 Mitosen ($x = 1,3 \pm 0,4$; $n = 4$) ermittelt. Das Primordium bewegt sich nur sehr langsam fort und zwischen der Ablage aufeinander folgender Neuromasten liegen durchschnittlich 16 h. Da innerhalb dieses Zeitraumes ca.

25 zusätzliche Zellen gebildet werden können, erscheint es möglich, dass der Verlust in der Zellzahl durch Mitosen wieder ausgeglichen werden kann.

Noch vor der Ablage des ersten Proneuromasts passiert das Primordium² den ersten primären Neuromast (L1), indem es ventral ausweicht und ihn umwandert. Dies geschieht mit unveränderter Geschwindigkeit. Nach dem Umwandern von L1 reduziert das Primordium seine Geschwindigkeit deutlich. Ab diesem Zeitpunkt sind vermehrt Zellteilungen zu beobachten. Schließlich kommt die Zellgruppe an einer Somitengrenze zum Stillstand und rundet sich ab. Dieser Prozess erstreckt sich über einen langen Zeitraum von acht bis zwölf Stunden. Im weiteren Verlauf trennt sich dann am caudalen Pol ein Verband von maximal zehn Zellen ab, der die Wanderung fortsetzt, während der hintere Teil der Zellgruppe als Proneuromast zurück bleibt. Auch hier zeigt der Proneuromast schon viele Stunden vor der Abtrennung aus dem Zellverband die charakteristische Rosettenform, die ihn als zukünftigen Neuromasten kennzeichnet.

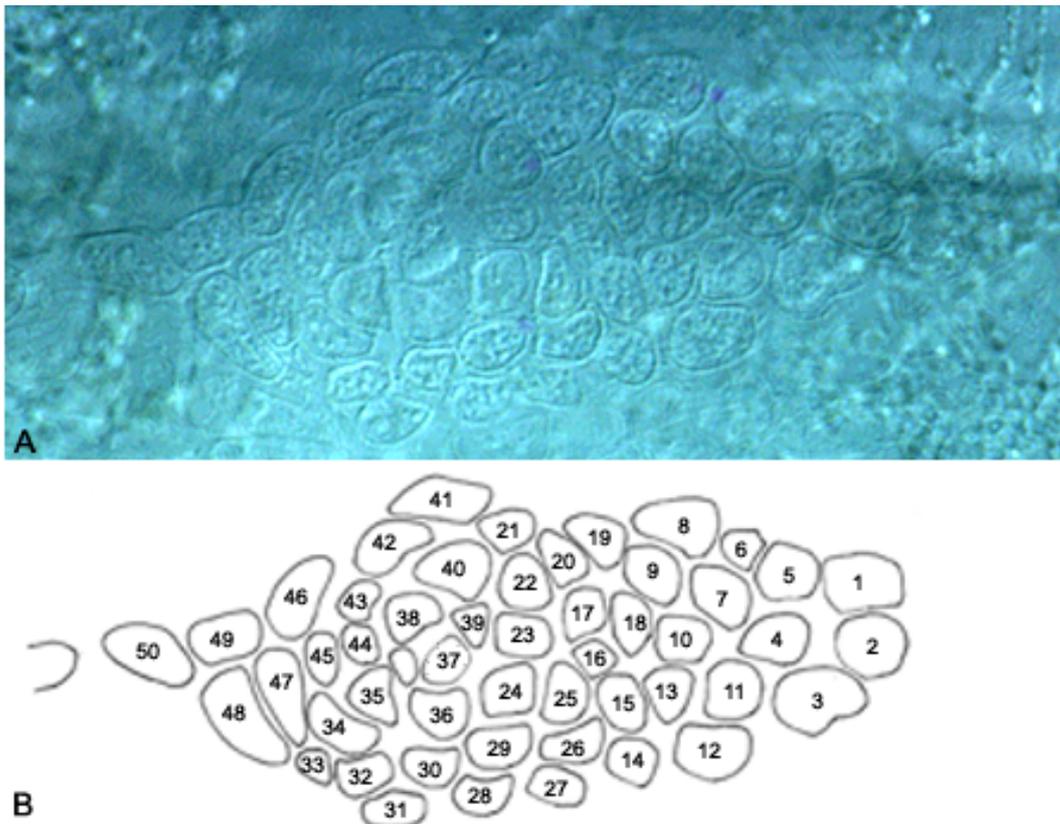


Abb. 3.14 A: Durchlichtmikroskopische Aufnahme (Nomaski-Optik) des Primordium² in einer fünf Tage alten Larve. Das hier dargestellte Primordium umfasst 50 Zellen und steht wenige Stunden vor der Ablage eines Proneuromasts. Im hinteren Bereich der Zellgruppe wird die

Rosettenförmige Anordnung der Zellen erkennbar. **B**: Schematische Darstellung des oberen Bildes. Der innere Zellkreis des zukünftigen Neuromasts wird von Zelle 35, 36, 37, 38 und 39 gebildet. Zelle 1 bis 20 werden voraussichtlich als Primordium² die Wanderung fortsetzen. Die verbleibenden Zellen werden gemeinsam abgelegt und entwickeln sich zu einem sekundären Neuromasten.

An Zeitrafferserien konnte die Ablage eines Proneuromasts nicht verfolgt werden, da Beobachtungen nur für eingeschränkte Zeiträume von rund 48 h durchgeführt wurden; denn bei längerer Bestrahlungsdauer kam es durch massives Bleichen zur Abnahme des Fluoreszenzsignals und zu eventuellen Störungen des Entwicklungsablaufes. Zusätzlich wurde in älteren Larven die Fluoreszenz der Kerne zunehmend durch die aufkommende Pigmentierung abgeschirmt. Zur Unterdrückung der Pigmentbildung in den Melanophoren wurden die Embryonen und Larven in einer mit PTU versetzten Ringerlösung gehalten, dies verhinderte jedoch nicht die Bildung der gelben und silberfarbenden Pigmentfarbstoffe der Iontho- und Iridiophoren, die sich bei konfokalen Aufnahmen ebenso störend erwiesen. Die Beobachtungen wurden in älteren Larvenstadien auch dadurch erschwert, dass die Oberfläche des Tieres nicht länger, wie im Embryo, plan war, sondern durch die Ausbildung der Myomere eine dreidimensionale Struktur erhielt. So wanderte das Primordium² (vergleichbar mit einer Berg- und Talfahrt) über sich aufwölbende Myomere und nachfolgende Einbuchtungen entlang der Myotomgrenzen. In optischen Schnitten war das Primordium daher nie als zusammenhängende Struktur erkennbar. Um alle Bereiche des Primordiums zu allen Zeitpunkten der Wanderung zu erfassen, mußte eine Vielzahl zusätzlicher z-Ebenen untersucht werden, was wiederum eine erhöhte Strahlungsbelastung und Bleichung des Fluoreszenzsignals zur Folge hatte.

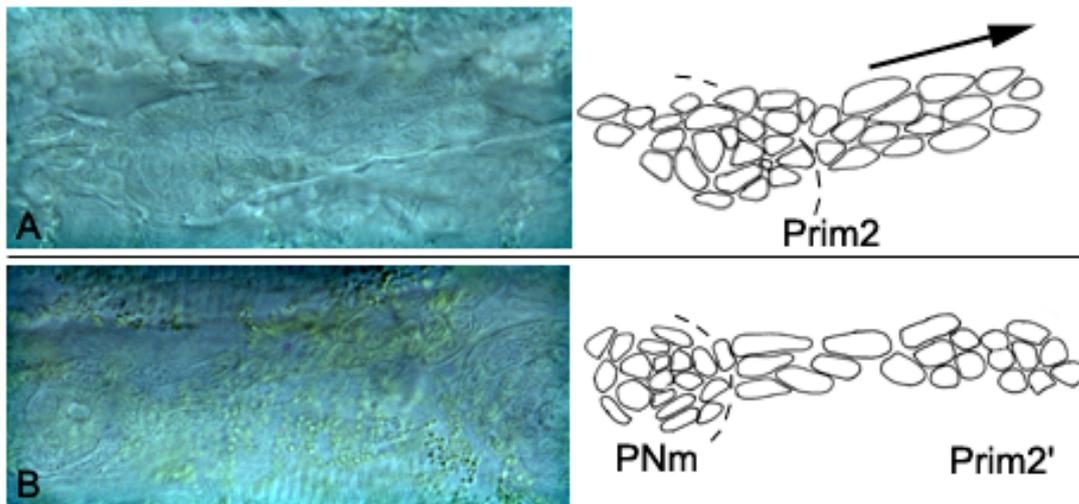


Abb.3.15: Ablage eines Proneuromasts aus dem Primordium2. Durchlichtmikroskopische Aufnahme (Nomaski-Optik) und schematische Darstellung. **A:** Primordium2 (Prim2) umfaßt ca. 40 Zellen. Der zukünftige Proneuromast formiert sich am hinteren Ende des Primordiums als eigenständige Zellgruppe und rundet sich ab (gestrichelte Linie). Der vordere Teil des Primordiums streckt sich entlang der Wanderrichtung (Pfeil). **B:** Der Proneuromast (PNm) hat sich fast vollständig abgetrennt (gestrichelte Linie). Er bleibt zurück, während eine Zellgruppe von ca. 14 Zellen am vorderen Pol (Prim2') die Wanderung fortsetzt. Die Zellen zwischen beiden Zellgruppen kommen voraussichtlich entlang der Axone zu liegen. Rostral ist links, dorsal ist oben.

3.2.2.1 Fuchsin-Färbungen

Der gesamte Verlauf des Primordiums entlang der rostro-caudalen Achse konnte umfassend an Fuchsin-gefärbtem Material untersucht werden. Dazu wurden Serien von Zebrafischlarven im Alter von drei Tage bis zu vier Wochen gesammelt, fixiert und gefärbt. Die Verwendung einer wässrig-sauren Fuchsin-Lösung führt zur Anfärbung aller Zellkerne innerhalb des Gewebes. So konnten Aggregationen von Zellen und morphologische Strukturen erkannt werden (siehe **Abb. 3.16**). Das horizontale Myoseptum, die primären Neuromasten und das sekundäre Primordium waren deutlich zu erkennen.

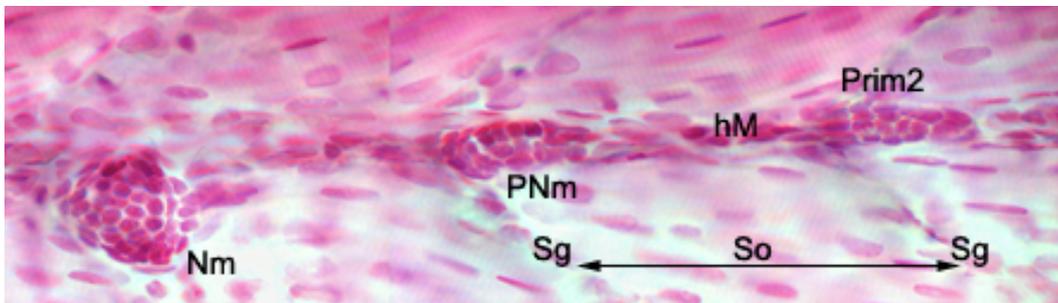


Abb. 3.16: Detailaufnahme aus einer sechs Tage alten Fuchsin-gefärbten Larve. Lateralansicht. Das Primordium2 (Prim2) liegt am horizontalen Myoseptum (hM), knapp eine Somitenbreite (So) von dem zuletzt abgelegten Proneuromasten (PNm) entfernt. Der Proneuromast umfasst mehr Zellen als das Primordium und ist an einer Somitengrenze (Sg) positioniert. Am linken Bildrand liegt ein primärer Neuromast (Nm), ebenfalls auf Höhe des horizontalen Myoseptums. Das Bild wurde durch die Überlagerung mehrerer Einzelbilder erstellt. Rostral ist links, dorsal ist oben.

Das sekundäre Primordium konnte in fast allen Fällen gesichtet und in den ältesten Larven bis zur Position der 28./29. Myotomgrenze verfolgt werden. Somit konnte anhand des Materials eine kontinuierliche Serie der Wanderbewegung erstellt werden. Im folgenden Diagramm ist die Wanderung des zweiten Primordiums entlang der rostro-caudalen Körperachse im zeitlichen Verlauf dargestellt:

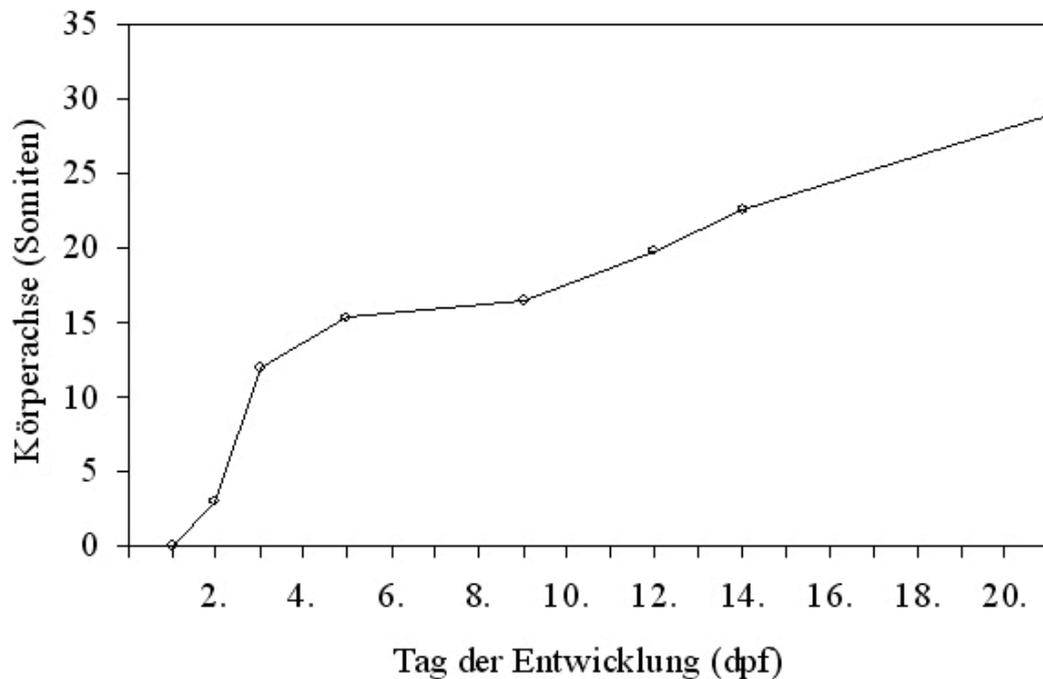


Abb. 3.17: Verlauf der Wanderung des Primordium2 in den ersten drei Wochen der Entwicklung. Nach dem vierten Tag der Entwicklung nimmt die Wandergeschwindigkeit ab und bleibt bis zum Ende relativ konstant.

Die Daten legen nahe, dass sich der Migrationsprozess des sekundären Primordiums über einen Zeitraum von drei Wochen erstreckt. Die Serie stellte sich aus Momentaufnahmen unterschiedlicher Individuen zusammen. Das Material gab keinen Aufschluss darüber, ob die als Primordium2 definierte Struktur tatsächlich Neuromasten hervorbrachte. Es konnte lediglich eine zeitliche Korrelation zwischen der Lage des mutmaßlichen Primordiums und dem Erscheinen juveniler sekundärer Neuromasten hergestellt werden. Vor dem Primordium lagen immer nur primäre Neuromasten. Zuletzt abgelegte, sekundäre Neuromasten waren in allen Fällen immer nur hinter dem Primordium, also rostral dazu, zu finden. Siehe dazu die folgende Abbildung:

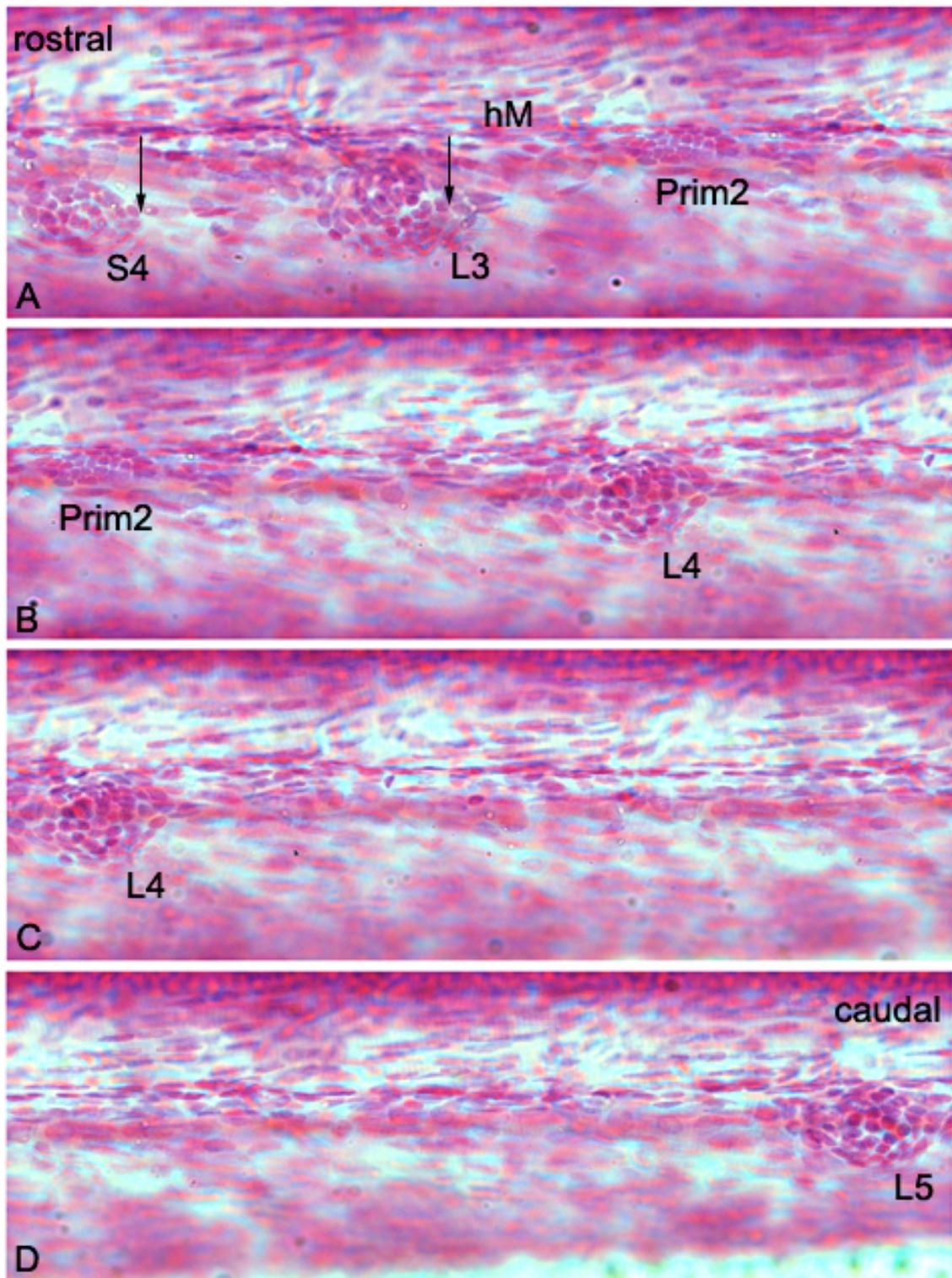


Abb. 3.18: Lateralansicht einer neun Tage alten Fuchsin-gefärbten Larve. **A – D:** Bildserie von vier hintereinander liegenden Abschnitten der posterioren Rumpflinie. Die Einzelbilder überschneiden sich jeweils in ihren Bildausschnitten. Dargestellt wird der Bereich zwischen dem primären Neuromasten L3 und L5. Sekundäre Neuromasten liegen nur hinter Primordium2 (Prim2). Zu sehen ist der sekundäre Neuromast S4 am rechten Bildrand in **A**. Vor dem

Primordium (**B**, **C** und **D**) liegt jedoch kein sekundärer Neuromast. Die Pfeile weisen auf eine ventrale Verlagerung der Neuromasten S4 und L3 hin. Die Neuromasten L4 und L5, die vor dem Primordium liegen, befinden sich noch auf Höhe des horizontalen Myoseptums (hM). Siehe dazu Kapitel 3.2.3. Rostral ist links, dorsal ist oben.

3.2.2.2 Verdopplungen von Neuromasten

Im vorderen Rumpfbereich sind nach dem sechsten Tag der Entwicklung Verdopplungen von bereits angelegten Neuromasten zu beobachten. Dieser Prozess scheint nicht auf primäre Organe beschränkt zu sein, sondern ist vermutlich von der spezifischen Größe des Neuromasts abhängig. An Fuchsin-Präparaten konnte die Verdopplung von Neuromasten zu verschiedenen Zeitpunkten in Momentaufnahmen dargestellt werden (siehe **Abb. 3.19**). Mikroskopische Beobachtungen unter Interferenz-Phasenkontrast ermöglichten dagegen, den Ablauf der Verdopplung *in vivo* zu verfolgen.

Im Verlauf dieses Prozesses geht die typische Rosettenform der Zellgruppe nicht verloren. Kontinuierliche Zellteilungen in den äußeren Stützzellen führen zur Bildung einer neuen Zellgruppe, die sich allmählich vom „Mutterneuromast“ abspaltet. In **Abb. 3.19 A** sind zwei noch nicht vollständig voneinander getrennte Zellgruppen deutlich als Doppelrosette erkennbar. Nach der Trennung der beiden Neuromasten wandert der untere entlang der Myotomgrenze ventral ab. An einem bestimmten Punkt ändert er die Route und wandert quer in horizontaler Richtung weiter. Übereinanderliegende Zellgruppen, die aus Verdopplungen hervorgehen, behalten ihre relative Lage zueinander nur für kurze Zeit bei. Der neuentstandene Neuromast ist bereits am darauffolgenden Tag in die horizontale Linie integriert. Diese Beobachtungen widersprechen der Meinung, dass Neuromasten ausschließlich entlang der dorso-ventralen Körperachse wandern können (Ledent, 2002).

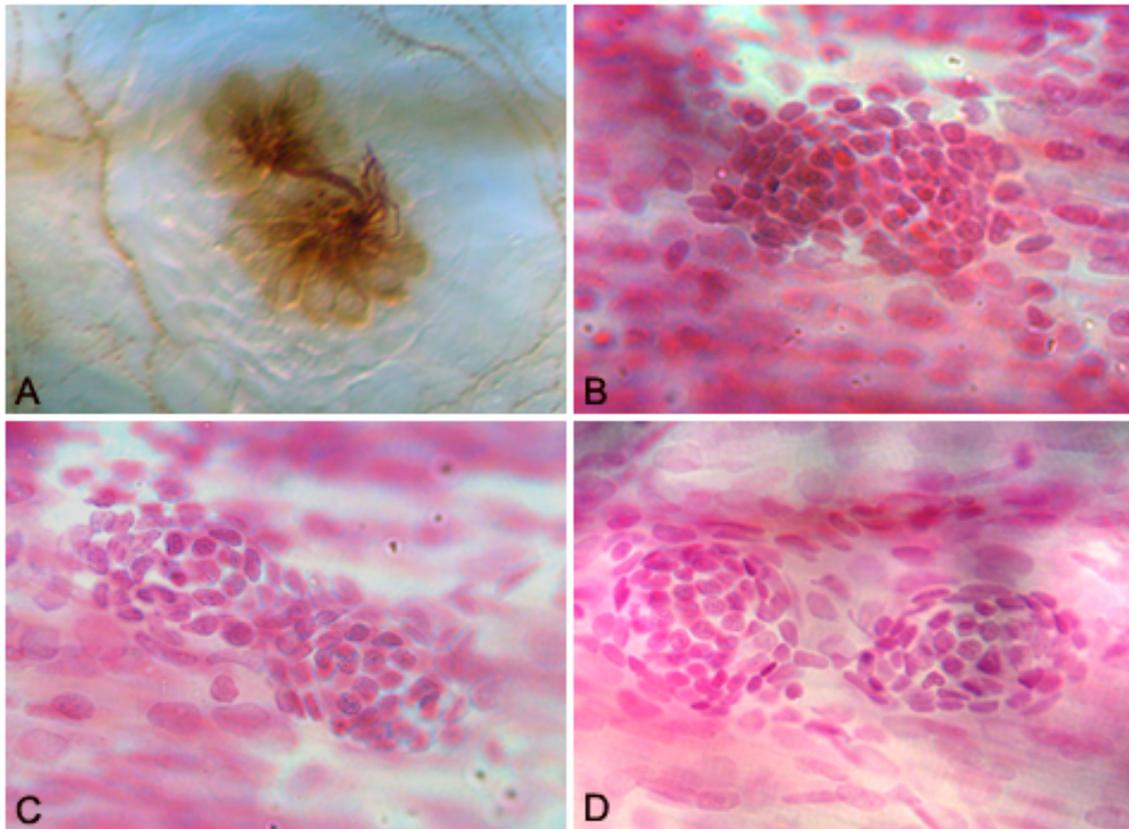


Abb. 3.19: Verdopplung von Neuromasten. **A.** In immunohistochemischen Färbungen gegen acetyliertes Tubulin sind die Haarzellen der Neuromasten sichtbar. Eine Vergrößerung der Zellgruppe führt zu einer Aufteilung in zwei Einzelgruppen. Beide Neuromasten weisen schon vor der Trennung die typische Rosettenform auf und besitzen ausdifferenzierte Haarsinneszellen. Deutlich sichtbar sind die ausgeprägten Cilienbündel der Sinneszellen.

B – D: Fuchsin-Färbungen; Einzelaufnahmen stellen Stationen des Verdopplungsprozesses dar. **B:** Größenzunahme eines Neuromasts; **C:** Abspaltung des neu entstandenen Neuromasts vom Mutterneuromast. **D:** vollständige Trennung beider Neuromasten. Rostral ist links, dorsal ist oben.

In späteren Entwicklungsstadien wurden immer wieder Neuromasten gesichtet, die mittig auf den Myotomen lagen. Demnach konnten wandernde Neuromasten sich auch abseits der Myotomgrenzen bewegen. Ihre endgültige Lage nahmen sie immer an einer Segmentgrenze ein. Zu den von horizontal wandernden Zellgruppen zurückgelegten Entfernungen können keine detaillierten Angaben gemacht werden. Nach einer Einschätzung aus eigenen Beobachtungen handelt es sich jedoch lediglich um kurze Strecken von ein bis zwei Myotomen.

Das Alter eines jungen Neuromasts kann anhand seiner Größe, also der Anzahl der beteiligten Zellen eingeschätzt werden, wie **Abb. 3.20** zeigt.

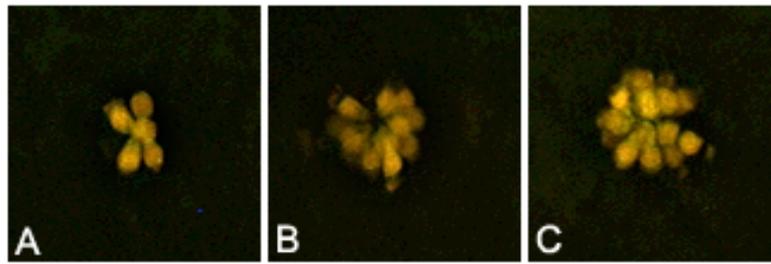


Abb. 3.20: Größenzunahme im Verlauf der Neuromastenentwicklung. Anfärbung der Haarsinneszellen mit DASPEI. **A:** Am zweiten Tag der Entwicklung besitzt ein primärer Neuromast ca. 6 Haarzellen. **B:** am fünften Tag ist die Anzahl der ausdifferenzierten Haarsinneszellen auf ca. 12 angestiegen. **C:** nach zwei weiteren Entwicklungstagen umfasst der Neuromast ca. 18 Haarzellen.

Primäre Neuromasten nehmen innerhalb der ersten zwei Entwicklungstage allmählich an Umfang zu und erreichen nach ca. vier Tagen eine Anzahl von bis zu 60 Zellen. Zeitgleich nimmt auch die Population der Haarsinneszellen zu. Anhand der Anzahl der Sinneszellen eines Neuromasts kann also eine ungefähre Einschätzung über den relativen Zeitpunkt seiner Ablage gemacht werden. Nachdem die ersten drei bis vier sekundären Neuromasten sukzessive in den Zwischenraum des ersten und zweiten primären Neuromasten erscheinen, ist deutlich zu erkennen, dass der am weitesten caudal gelegene sekundäre Neuromast der kleinste, und daher der jüngste ist:

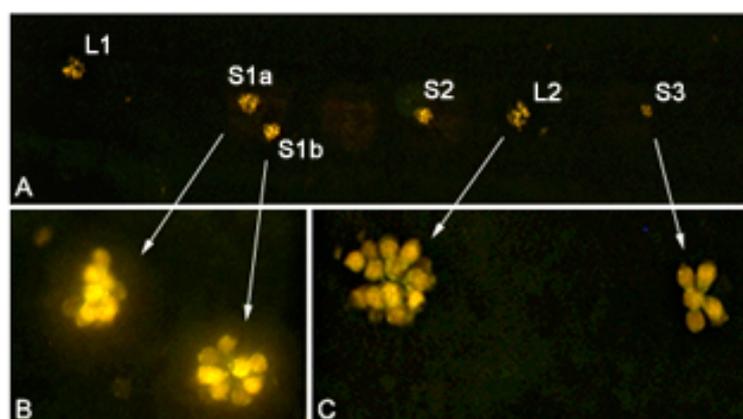


Abb. 3.21: DASPEI-Färbung an einer sechs Tage alten Larve. **A:** Der Bildausschnitt zeigt den vorderen Bereich des Rumpfes (L1 bis S3). Die Pfeile weisen jeweils auf die entsprechenden Strukturen hin, die in **B** und **C** vergrößert dargestellt sind. **B:** Die aus einer Verdopplung

hervorgegangenen Neuromasten besitzen annähernd identische Größen. Der abgespaltene Neuromast S1b liegt noch ventral unterhalb des Mutterneuromasts S1a. C: sekundäre Neuromasten, die aus Primordium2 hervorgehen, sind unmittelbar nach der Ablage noch sehr klein und nehmen erst im Verlauf der folgenden Entwicklungstage an Größe zu. Vergleiche S3 mit S2 bzw. S1a. Rostral ist links, dorsal ist oben.

Anhand dieser Eigenschaft konnte in DASPEI-gefärbten Larven mit relativer Sicherheit entschieden werden, welche der sekundären Neuromasten aus Verdopplungen hervorgegangen sind und welche vom Primordium2 abstammten. Erstere besaßen schon zum Zeitpunkt ihrer Entstehung den Umfang eines ca. 4 Tage alten Sinnesorgans mit bis zu 12 ausdifferenzierten Haarzellen. Letztere umfaßten zum Zeitpunkt ihres Erscheinens maximal 20 Zellen mit 2 bis 4 Haarzellen (siehe **Abb. 3.21**). Dieser Unterschied wird natürlich durch die sukzessive Größenzunahme bald ausgeglichen. In älteren Larven, wenn alle Neuromasten eine ähnliche Größe besitzen, kann daher nicht mehr zwischen beiden Typen unterschieden werden.

Am sechsten Tag der Entwicklung liegen zwischen den primären Neuromasten L1 und L2, die in einem Abstand von fünf Somitengrenzen zueinander stehen, im Schnitt drei sekundäre Neuromasten ($x = 3 \pm 0,7$; $n = 16$). Die zwei noch freien Positionen werden im weiteren Verlauf von Neuromasten besetzt, die aus Verdoppelungen hervorgehen. **Abb. 3.21 A** zeigt, dass ab dem sechsten Tag der Entwicklung beide Prozesse zwar zeitgleich, jedoch nie auf gleicher Höhe entlang der rostro-caudalen Achse stattfinden. So bewegt sich der Prozess der Verdopplung immer hinter dem sekundären Primordium her und wurde in keinem Fall jenseits des Primordiums gesichtet.

3.2.3. Ventrale Verlagerung der Rumpflinie

Nach Fertigstellung des embryonalen Lateralliniensystems kommt es im Verlauf der Larvenentwicklung zu weitreichenden Umgestaltungen: Neben der sukzessiven Ergänzung sekundärer Neuromasten zum bestehenden System findet eine ventrale Verlagerung der differenzierten Sinnesorgane statt. Das ventrale Abwandern von Neuromasten wurde zuerst in den vorderen Rumpffregionen beobachtet, betraf aber nicht den ersten primären Neuromasten L1. Ab dem vierten Tag der Entwicklung setzte bei den rostral gelegenen Neuromasten (S1, S2, S3, L2...) die Verlagerung nach ventral ein, weiter caudal gelegene Neuromasten folgten. Die Sinnesorgane orientierten sich dabei entlang der Myotomgrenzen. Dieser Prozess betraf, mit Ausnahme von L1, im Weiteren alle Neuromasten der Rumpflinie und verlief eindeutig in einer antero-posteriorer Richtung. DASPEI-Färbungen an vierwöchigen Larven zeigen die veränderte Position der Rumpflinie (siehe **Abb.3.13 F** und **Abb. 3.22 C**). Der Neuromast L1 liegt nahe seiner ursprünglichen medialen Position. Die folgenden sechs Neuromasten liegen versetzt zueinander in zunehmend ventraleren Positionen. Sie bilden eine Linie mit schräg nach unten gerichtetem Verlauf. Alle Neuromasten caudal zur Brustflosse liegen gemeinsam entlang einer horizontalen Linie auf der unteren Bauchseite des Fisches.

Bei der Sichtung des Fuchsin-gefärbten Materials fiel auf, dass primäre Neuromasten erst, nachdem sie vom Primordium² passiert wurden, ihre Lage am horizontalen Myoseptum aufgaben und in ventraler Richtung abwanderten (siehe **Abb 3.18 A**). Daher hatten alle Neuromasten, die bereits hinter dem Primordium² lagen, eine nach ventral verschobene Position, wohingegen Neuromasten, die sich noch vor dem Primordium befanden, ihre ursprünglich mittige Lage zeigten.

In diesem Zusammenhang steht die Frage zur Diskussion, ob möglicherweise vom Primordium² eine Signalwirkung ausgeht, durch die die Sinnesorgane zur Positionsveränderung veranlasst bzw. erst befähigt werden. Diese Fragestellung wurde jedoch im Rahmen dieser Arbeit nicht näher untersucht.

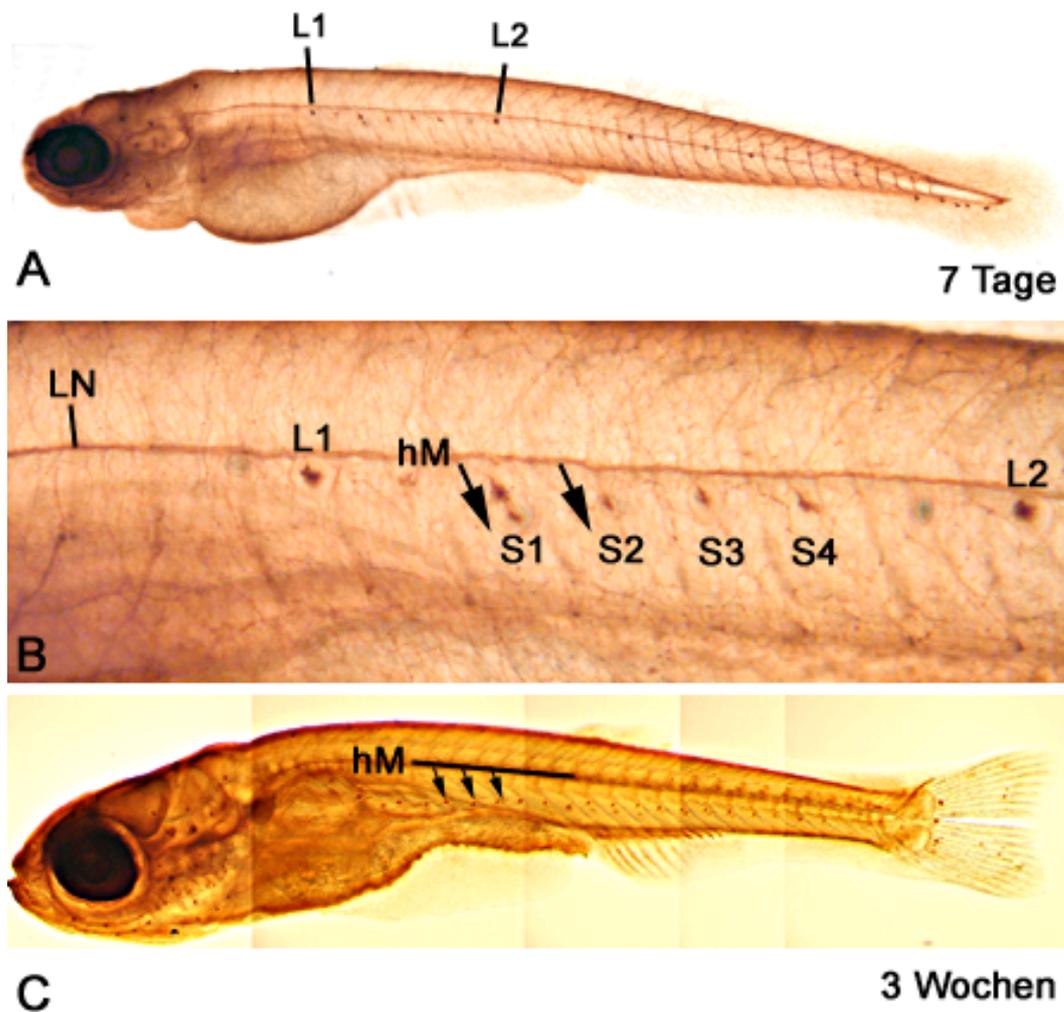


Abb. 3.22: Ventrale Verlagerung von Neuromasten. Immunohistochemische Färbung gegen acetyliertes Tubulin. **A:** In einer siebentägigen Larve kann das Abwandern der Neuromasten aus der ursprünglichen Position nahe des horizontalen Myoseptums (hM) beobachtet werden. **B:** Der Lateralliniennerv (LN) liegt auf Höhe des horizontalen Myoseptums. L1 beteiligt sich nicht an der ventralen Verlagerung. Er wird nahe seiner ursprünglichen Position verbleiben. Die rostral gelegenen Neuromasten S1, S2, S3 und S4 beginnen mit der Abwanderung (Pfeile). **C:** In einer dreiwöchigen Larve liegen die Neuromasten in einem deutlichen Abstand zum horizontalen Myoseptum (Pfeile) entlang einer horizontalen Linie auf der ventralen Bauchseite. Die Abbildung C entstand aus der Überlagerung von fünf Einzelbildern. Rostral ist links, dorsal ist oben.

3.3 Untersuchungen zur Herkunft der Primordien

Zahlreiche experimentelle Studien an Amphibien und Knochenfischen belegen, dass ein bestimmter Bereich des ektodermalen Plakodengewebes, die sogenannte postotische Kopfplakode, sowohl die Neuromasten der Rumpflinie als auch die ihnen zugehörigen Neuronen des Laterallinienganglions hervorbringt (Baker und Bronner-Fraser, 2001, und darin enthaltene Zitate). Der vordere Teil der Plakode formiert sich zum Primordium und wandert ab. Die Plakodenzellen des gegenüberliegenden Pols, nahe dem Ohrbläschen, verweilen in ihrer ursprünglichen postotischen Position und generieren Neuroblasten zur Bildung des postotischen Ganglions (Sahly *et al.*, 1999).

Obwohl die Ohrplakode im Zebrafisch schon in jungen Entwicklungsstadien (ab 6-Somiten, 12 hpf) deutlich als Verdickung hervortritt und in Fuchsinfärbungen eindeutig lokalisiert werden kann, ist die Plakode der posterioren Laterallinie morphologisch nicht von der sie umgebenden Epidermis zu unterscheiden (siehe **Abb 3.25 A**). Erst kurz vor Beginn des Wanderprozesses formieren sich die Zellen des Primordiums zu dem engen Zellverband, den sie auch im weiteren Verlauf beibehalten werden.

Zellmarkierungen mit dem Fluoreszenzfarbstoff RDA innerhalb der postotischen Epidermis sollten Aufschluss über Größe und genaue Lage der Laterallinienplakode im Zebrafischembryo geben. Außerdem sollte untersucht werden, in welcher Weise die Zellen der Plakode an der Bildung der Laterallinie beteiligt sind, welche Zelltypen aus ihnen hervorgehen und inwiefern sie sich an der Bildung der beiden Primordien beteiligen. Ebenfalls sollten Markierungsexperimente klären, ob die Zellen beider Primordien aus gleichen oder aber benachbarten Plakodenbereichen hervorgehen.

3.3.1 *pea3*-Expression in der postotischen Plakode und dem Primordium

Noch im Vorfeld der Markierungsexperimente wurde nach Entwicklungsgenen recherchiert, die in frühen Embryonalstadien in der Anlage der posterioren Laterallinie exprimiert werden. Eine engere Auswahl fiel auf *eyal* (Sahly *et al.*, 1999), *nkx-5* (Adamska *et al.*, 2000) und *pea3* (Münchberg *et al.*, 1999), die alle für Transkriptionsfaktoren kodieren. Zu allen drei Genen wurden aus c-DNA Proben DIG-markierte RNA-Sonden angefertigt. Ausschließlich die *pea3*-Sonde führte jedoch zu brauchbaren in-situ Färbungen mit geringem Hintergrund.

In den folgenden beiden Abbildungen, **Abb. 3.23** und **Abb. 3.24**, ist die *pea3* Expression zu unterschiedlichen Entwicklungszeitpunkten dargestellt.

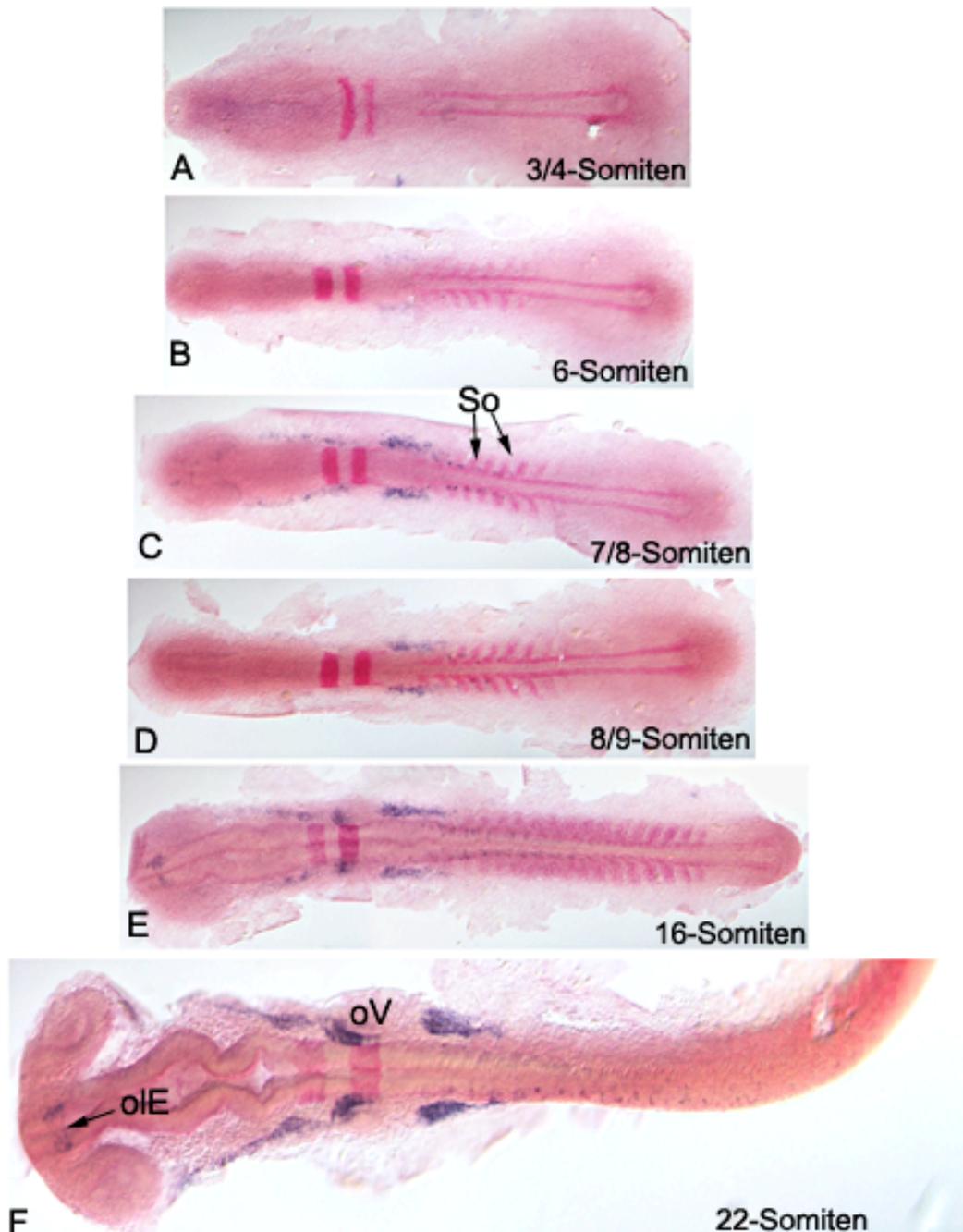


Abb. 3.23: *pea3*-Expression innerhalb der ersten 24 h der Embryonalentwicklung. Als topographische Bezugspunkte dienen die Expressionsdomänen von *Krox20* und *myoD*, beide in rot. *Krox20* markiert die Lage der Rhombomere R3 und R5, *myoD* die Position der Somiten (vergleiche **Abb. 3.24 B**). Siehe Text für genauere Erläuterungen. (oV) otisches Vesikel, (oIE) Riechepithel, (So) Somiten. Anterior ist links.

Transkripte des *pea3* Gens können in Embryonen ab dem 4-Somitenstadium (**Abb.3.23 A**) vereinzelt in ektodermalen Zellen seitlich der Neuralanlage detektiert werden. Bis zum 8-Somitenstadium (**Abb. 3.23 B, C**) nimmt die Anzahl der *pea3* exprimierenden Zellen in dieser Region zu. Sie umfasst dann einen annähernd rechteckigen Bereich mit ca. 8 Zellen in der Breite und 25 Zellen in der Länge (vergleiche **Abb. 3.25 B**). Im weiteren Entwicklungsverlauf (**Abb. 3.23 C, D, E; Abb. 3.24 A**) erscheinen zwei weitere, dazu rostral gelegene Domänen, vermutlich die Anlage der anterioren Laterallinie sowie die des otischen Vesikels. Zusätzlich sind auf Höhe der Somiten innerhalb des Neuroektoderms einzelne *pea3*-exprimierende Zellen erkennbar. Ihre Anzahl nimmt stetig zu. Bei ihnen handelt es sich möglicherweise um postmitotische Neuronen innerhalb des Zentralnervensystems, wie die *Rohon-Beard* Neuronen (Münchberg *et al.*, 1999). Expression zeigen auch die Zellen des Riechepithels ab 13hpf. In Folge der zunehmenden Verlängerung des Keimstreifens erfährt die postotische *pea3*-Domäne eine leichte Streckung, die Anzahl der *pea3*-exprimierenden Zellen bleibt jedoch konstant. In Embryonen älter als 22hpf ist deutlich zu erkennen, dass sowohl die Zellen des Primordium1 als auch die *Schwann*-Zellen, die entlang der sensorischen Axone aufgereiht liegen, *pea3*-positiv sind (**Abb. 3.24 A, B**). Die hier vorgestellten Daten legen die Vermutung nahe, dass *pea3* von Vorläuferzellen der Laterallinie exprimiert wird und der caudale Anteil der untersuchten Expressionsdomäne dem Umfang der postotischen Plakode entspricht, aus der dann das Primordium der posterioren Laterallinie hervorgeht. In den Markierungsexperimenten wurde dieser postotische Anteil der *pea3*-Expression als Orientierungshilfe genutzt (siehe dazu auch Kapitel 2.4.3).

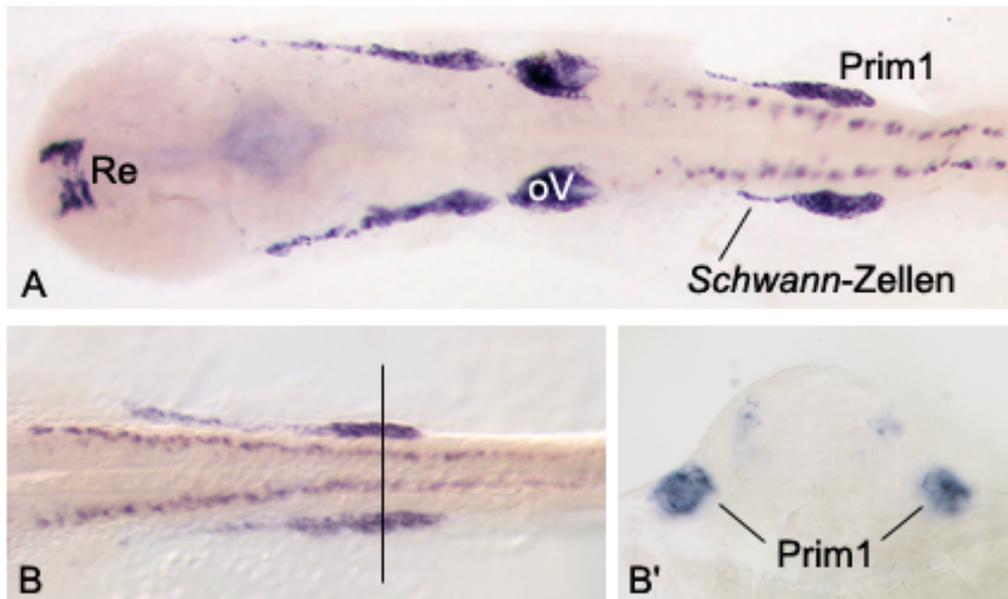


Abb. 3.24: *pea3*-Expression im Primordium. **A:** (25 hpf) Das Primordium1 liegt auf Höhe des siebten Somiten. *pea3*-Transkripte sind in allen Zellen des Primordiums und in den Gliazellen (*Schwann*-Zellen) entlang des Lateralliniennervs zu erkennen. (oV) otisches Vesikel, (Prim1) Primordium1, (RE) Riechepithel. **B + B'**: Ein Transversalschnitt durch das Primordium zeigt, dass sich die *pea3*-exprimierenden Zellen innerhalb des Primordiums (direkt unterhalb der Epidermis und lateral zur Neuralanlage) befinden. **C:** Rostral ist links.

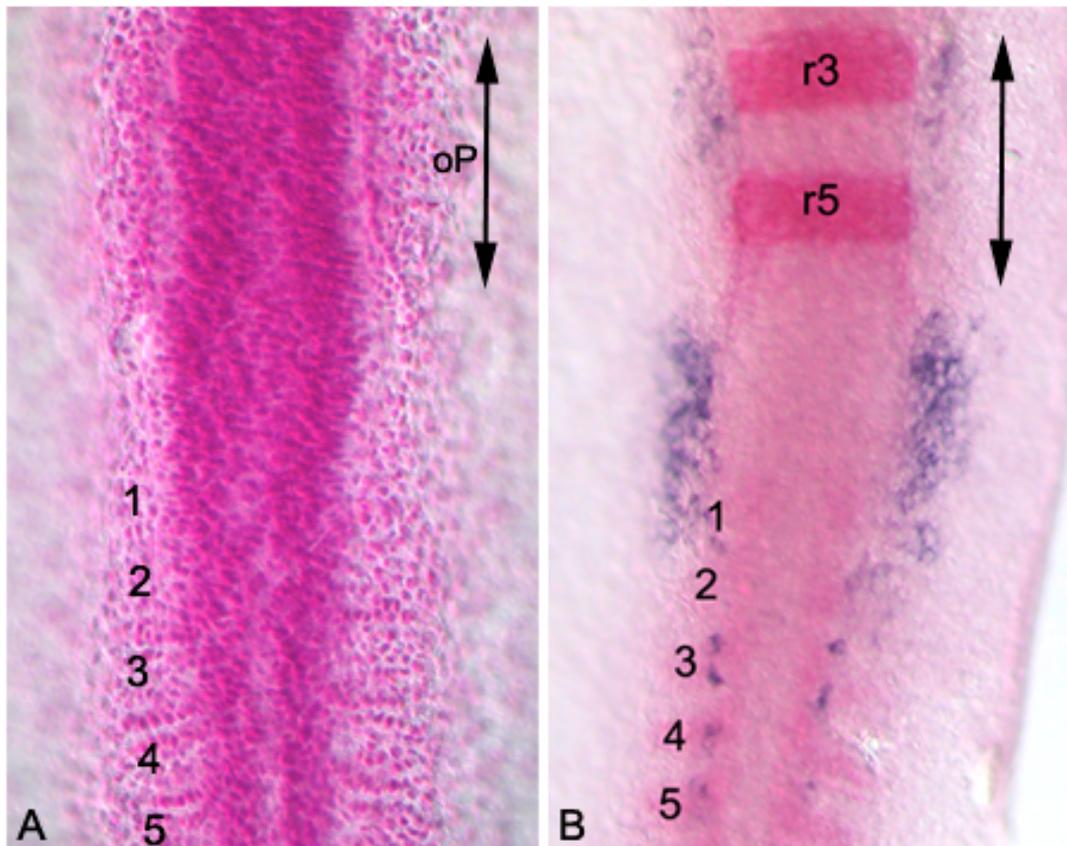


Abb. 3.25: Dorsalansicht der hinteren Kopfplakoden im 8-Somiten Embryo. **A:** In Fuchsin-Färbungen ist die otische Plakode (oP) deutlich als epidermale Verdickung erkennbar. Caudal zur otischen Plakode liegt die sog. postotische Plakode. Zu diesem Zeitpunkt ist sie jedoch morphologisch noch nicht von der sie umgebenden Epidermis zu unterscheiden. **B:** *pea3*-Expression (blau) innerhalb der mutmaßlichen postotischen Plakode. Eine Gegenüberstellung beider Abbildungen lässt vermuten, dass die otische Plakode in ihrer rostro-caudalen Ausdehnung (siehe **A**) direkt an die *pea3*-Expressionsdomäne (siehe **B**) angrenzt und möglicherweise beide Plakoden unmittelbar aufeinander folgen. Markierungsexperimente innerhalb der postotischen *pea3*-Domäne konnten zeigen, dass diese Domäne die Vorläuferzellen der Primordien beinhaltet (siehe Abschnitt 3.3.3.2). Anterior ist oben.

3.3.2 Die Markierungsexperimente

Fluoreszenzinjektionen innerhalb des nicht neuralen Ektoderms brachten in allen drei Injektionsserien Markierungen von Zellen der Laterallinie hervor. Dazu zählten die Haar- und Stützzellen der primären und sekundären Neuromasten, *Schwann*-Zellen des Lateralliniennervs und die sensorischen Neuronen des postotischen Ganglions. Ebenfalls wurden Epidermiszellen, Zellen innerhalb des Ohrbläschens, Pigmentzellen und Mesenchymzellen der Brustflossen (Derivate der Neuralleiste) sowie Neuronen des Zentralnervensystems markiert. Letztere gingen aus Markierungen innerhalb des neuralen Ektoderms hervor.

Die Daten aus den Injektionsserien sind in der folgenden Tabelle zusammengefaßt und werden in den folgenden Kapiteln näher besprochen.

Serie	Primordium		sN	oV	ZNS	Ez	Pz	Bm	Total
	Hz + Sz	Gz							
#1 (2som) Einzellmarkierung	5	3	1	2	24	16	2	5	60
Mehrzellmarkierung	2*								
#2a (5/6som) Plakode	18*		1	4	2	9	2	2	38
#2b (5/6som) Neuralkiel	--	3	0	0	7	3	9	1	23
#3 (8/9som) Plakode	23*		1	5	1	9	2	1	42

Tabelle 3.1: Fluoreszenzmarkierungen innerhalb der Neuralplatte, der Plakoden und des Neuralkiels brachten Nachkommen bestimmter Zelltypen hervor.

(*Markierungen konnten Haarsinneszellen und Stützzellen der Neuromasten sowie Gliazellen beinhalten. Markierungen gingen nicht ausschließlich aus Einzellmarkierungen hervor.)

Bm=Brustflossenmesenchym, Ez=Epidermiszellen, Gz=Gliazellen der Laterallinie (*Schwann*-Zellen), Hz=Haarsinneszellen, oV=otisches Vesikel (Ohrbläschen), Pz=Pigmentzellen, sN=sensorische Neuronen (Zellkörper liegen im postotischen Ganglion), ZNS=Zentrales Nervensystem.

In allen Injektionsserien wurden sowohl Ein- als auch Mehrzellmarkierungen ausgewertet. Während innerhalb der Neuralplatte zwei benachbarte, fluoreszenzmarkierte Zellen eindeutig als zwei Einzelzellen erkannt werden konnten, waren Markierungen dicht nebeneinander liegender Zellen innerhalb der Plakode und des Neuralkiels nicht sicher als Ein- oder Mehrzellmarkierung zu erkennen. So wurde für Serie #1 festgehalten, ob es sich um Einzell- oder Mehrzellmarkierungen handelte. In Serie #2 und Serie #3 wurden Einzellmarkierungen nicht gesondert verzeichnet. Die Daten aus diesen Experimentreihen stehen insofern einer klonalen Analyse nicht zur Verfügung.

An dieser Stelle sollen zwei Begriffe eingeführt werden, die im Weiteren die Darstellung der Ergebnisse vereinfachen sollen: Der Begriff „Zellen des Primordiums“ soll alle Zelltypen umfassen, die aus dem Primordium hervorgebracht werden, d.h. Haar-, Stütz- und *Schwann*-Zellen. Im Unterschied dazu beinhaltet die Bezeichnung „Zellen der Laterallinie“ neben den Haar-, Stütz- und *Schwann*-Zellen auch die sensorischen Neuronen des postotischen Ganglions. Gleiches gilt für die Begriffe „Vorläufer des Primordiums“ bzw. „Vorläufer der Laterallinie“.

Aus Mehrzellinjektionen gingen vorwiegend Markierungen hervor, die sowohl Haarsinneszellen und Stützzellen der Neuromasten als auch Gliazellen der Laterallinie beinhalteten. Da alle drei Zelltypen uneingeschränkt aus allen der untersuchten Bereiche der Plakode hervorgehen konnten, wurden sie in Serie #2a und #3 nicht einzelnen aufgeschlüsselt und in **Tabelle 3.1** als „Zellen des Primordiums“ zusammengefasst. Nach Einzellmarkierungen innerhalb der Serie #1 wurden Zellklone identifiziert, die entweder ausschließlich Gliazellen oder aber Haar- und Stützzellen beinhalteten. Diese Fälle wurden in **Tabelle 3.1** gesondert aufgeführt. Die Nachkommenschaft einzelner Markierungen innerhalb des Neuralkiels der Serie #2b enthielt ausschließlich Gliazellen der Laterallinie, jedoch keine Haar- und Stützzellen der Neuromasten.

3.3.2.1 Die Zelltypen der Laterallinie

Die in den Markierungsexperimenten identifizierten Zellen wurden im Rahmen dieser Arbeit rein morphologisch, nach ihrer Gestalt und Lage, charakterisiert. Da die Zellen aber zu einem sehr frühen Entwicklungsstadium gesichtet wurden, ist zu bedenken, dass sie mit einiger Sicherheit noch nicht vollständig ausdifferenziert vorlagen. Im adulten Tier könnten sie eine völlig andere Morphologie aufweisen.

Die beiden folgenden Abbildungen, **Abb. 3.26 und 3.27**, zeigen eine Zusammenstellung verschiedener Zelltypen, die im Rahmen der Markierungsexperimente identifiziert wurden.

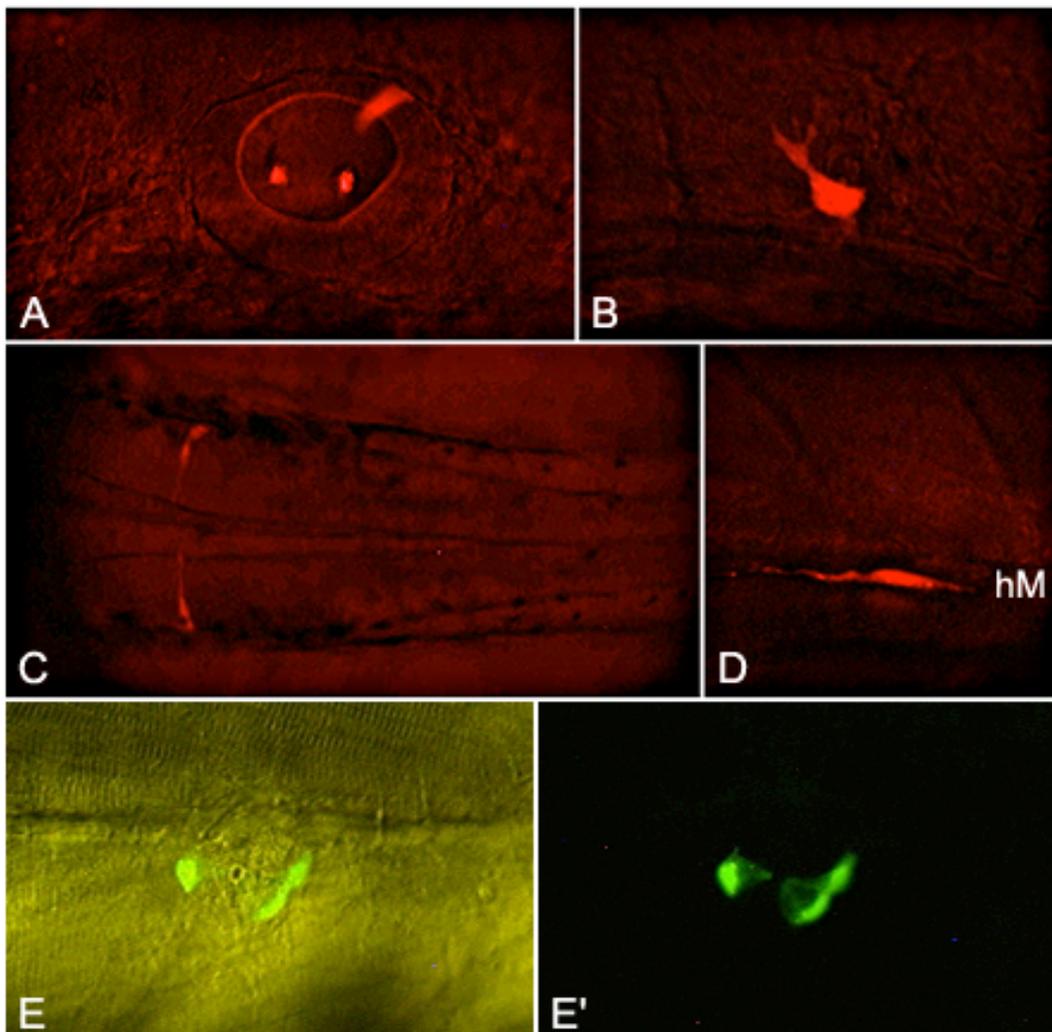


Abb.3.26: Identifizierte Zelltypen. Fluoreszenzaufnahmen. **A:** RDA-Markierung innerhalb des optischen Vesikels. **B:** RDA-markierte Pigmentzelle. **C:** RDA-Markierung innerhalb des Zentralen Nervensystems auf Höhe des Rhombencephalons. (ca. 24 hpf) Die Zellen sind

bilateralsymmetrisch auf die linke und rechte Seite des Neuralrohrs verteilt. **D**: *Schwann-Zelle* (ca. 48 hpf), sie liegt entlang des horizontalen Myoseptums (hM). **E** und **E'**: FDA-Markierung von Stützzellen innerhalb eines Neuromasts.

Zellen innerhalb der wandernden Primordien ließen eine auffallend ähnliche Gestalt erkennen. Im Verlauf der Migrationsbewegung änderten sie zwar kontinuierlich ihre äußere Form, zeigten aber keine erkennbaren Anzeichen hinsichtlich der Differenzierung zu einem bestimmten Zelltyp. Unterschiede wurden erst nach Ablage aus dem Primordium sichtbar. Als einzige Ausnahme zeigten sich die inneren Haarzellen der Sinnesorgane. Sie waren im Verband des Proneuromasts bereits vor der Ablösung aus dem Verband des Primordiums durch die einsetzende Cilienbildung als solche zu erkennen. Haar- und Stützzellen konnten anhand ihrer Lage innerhalb des Neuromasts unterschieden werden. Die Morphologie der Stützzellen konnte nicht eindeutig erkannt werden. Sie zeigten in den frühen Entwicklungsstadien keine auffälligen strukturellen Merkmale. Alle Zellen des äußeren Kreises, der den Kranz der Haarzellen umschließt, waren mitotisch aktiv. In Zeitrafferaufnahmen an H2A.F/Z:GFP Larven wurden ausschließlich in dieser Zone Zellteilungen beobachtet. Die Auswertungen im Rahmen der Injektionsexperimente konnten diese Beobachtung bestätigen. So nahm bei aufeinanderfolgenden Sichtungen die Anzahl markierter Haarzellen nie zu, während es im äußeren Kreis gelegentlich zu einer Zunahme der fluoreszenzmarkierten Zellen kam. Gliazellen wurden ebenfalls anhand ihrer Lage und zusätzlich ihrer klaren und reproduzierbaren Zellmorphologie identifiziert. Sie lagen immer in unmittelbarer Nähe zu den Axonen der sensorischen Neuronen auf der Höhe des horizontalen Myoseptums. Ihre Zellkörper besaßen eine ovale Form und sie bildeten weder axonale noch dendritischen Ausläufer aus. Das Zytoplasma verlängerte sich in zwei seitlichen Fortsätzen, durch die die Zellen eine längliche Gestalt erhielten. Das erst kürzlich von Brösamle und Halpern identifizierte Zebrafisch Ortholog eines Gens, das für das basische Myelin Protein (MBP) kodiert, könnte zur molekularen Charakterisierung des hier als *Schwann-Zelle* charakterisierten Zelltyps herangezogen werden. Die Autoren wiesen bereits in vier Tage alten Zebrafischlarven Transkripte des MBP in Schwannzellen des Lateralliniennervs im Peripheren Nervensystem nach (Brösamle und Halpern, 2002).

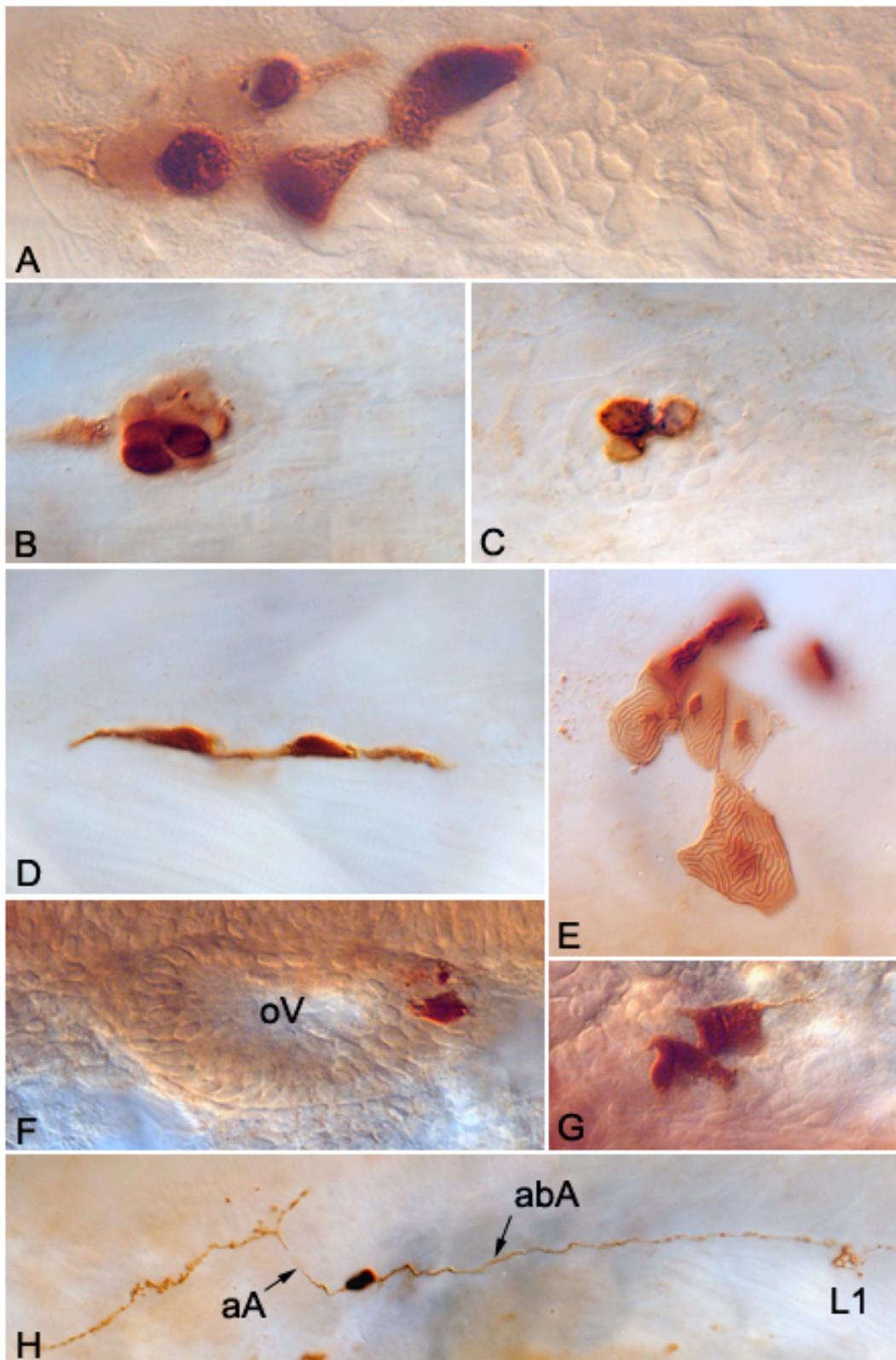


Abb. 3.27: Identifizierte Zelltypen. Immunohistochemische Färbung gegen RDA. **A:** Zellen innerhalb des Primordiums. **B:** Haarsinneszellen (hell) und Stützzellen (dunkel) innerhalb eines Neuromasts. **C:** Haarsinneszellen im inneren Kreis eines juvenilen Neuromasts. **D:** zwei hintereinander liegende *Schwann*-Zellen, ihre Längsachsen liegen parallel zum horizontalen

Myoseptum (hM). **E**: Epidermiszellen. **F**: Zellen innerhalb des otischen Vesikels bei ca. 24 hpf. **G**: Pigmentzellen. **H**: sensorisches Neuron des postotischen Ganglions. Das aufsteigende Axon (aA) projiziert ins Zentralnervensystem, das absteigende Axon (abA) zu den Neuromasten. Am rechten Bildrand sind die Umriss der Haarsinneszellen des primären Neuromasten L1 zu erkennen. Das Axon endet nicht an L1.

Neben den drei beschriebenen Zellentypen, die aus dem Primordium hervorgehen, konnten nach Markierungen innerhalb der Plakode auch sensorische Neuronen des postotischen Ganglions, Zellen innerhalb des otischen Vesikels und Epidermiszellen identifiziert werden. Markierungen innerhalb der Neuralplatte oder des Neuralkiels führten in den häufigsten Fällen zu Neuronen innerhalb des Zentralen Nervensystems oder Pigmentzellen und Mesenchymzellen der Brustflossen.

Andere Zelltypen als die hier beschriebenen wurden nicht näher analysiert. Nicht identifizierbare Markierungen im 24hpf Embryo oder älterer Larven wurden verworfen und kamen nicht zur Auswertung.

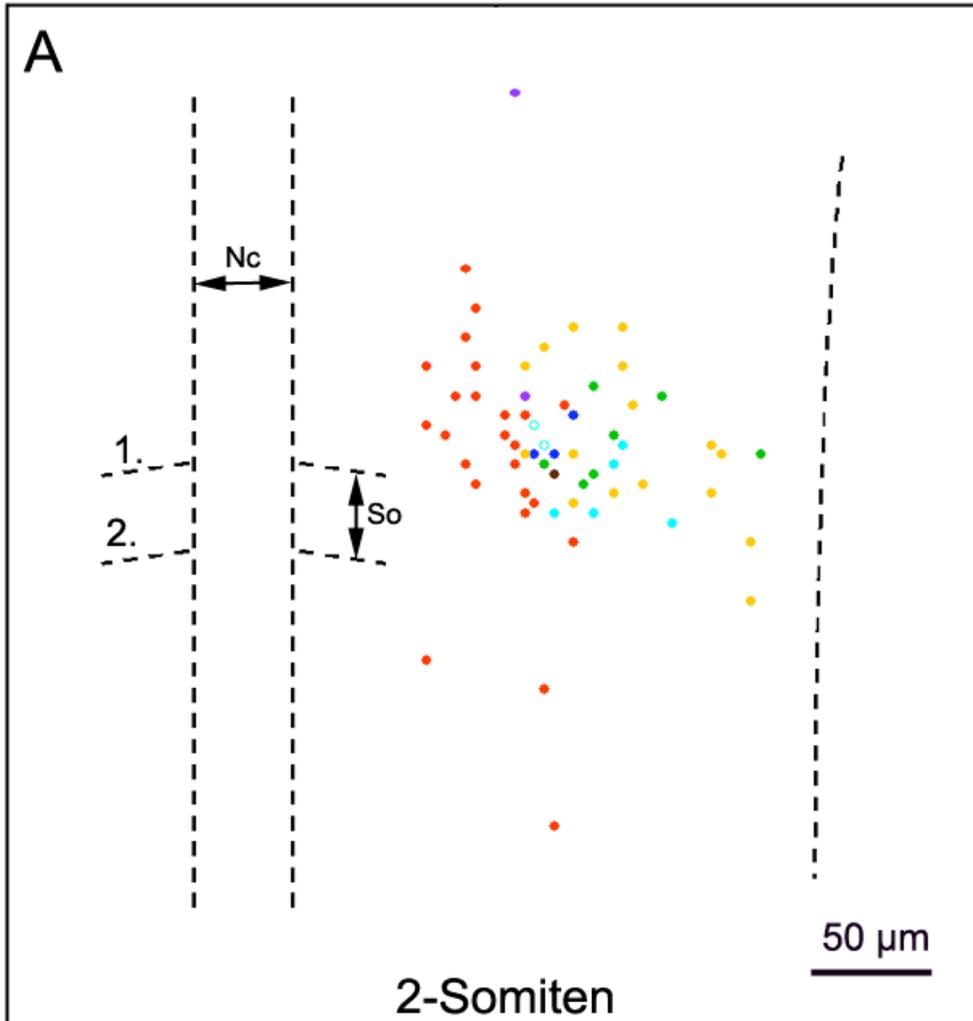
3.3.2.2 Vorläufer des ersten Primordiums liegen im nicht neuralen Ektoderm

Die gesamte Neuralplatte umfasst im 2-Somiten Stadium in medio-lateraler Ausdehnung ca. $300\mu\text{m}$, bzw. 63 Zellen, bei einem gemessenen Zelldurchmesser von $4,75\mu\text{m}$. Die laterale Begrenzung der Neuralplatte lag in diesem Stadium schätzungsweise 25 Zelldurchmesser vom rechten Rand des Notochords entfernt. Allerdings bezieht sich diese Berechnung auf den Bereich der ersten Somitengrenze. In einem weiter anterior gelegenen Abschnitt hat sich die Neuralplatte aufgrund der Keimstreifstreckung schon verschmälert, posterior zur ersten Somitengrenze ist die Neuralplatte noch breiter. Aus dem Injektionsdiagramm **A** geht hervor, dass in posterioren Regionen jenseits der ersten Somitengrenze weit lateral gesetzte Injektionen noch zu Markierungen innerhalb des Zentralen Nervensystems führen.

Markierungen wurden seitlich zur Neuralplatte gesetzt. Die zu untersuchende Region umfasste einen Bereich vom 20. bis zum 50. Zelldurchmesser ausgehend vom rechten Rand des Notochords in medio-lateraler Ausdehnung und 30 Zelldurchmesser anterior zur

ersten Somitengrenze sowie 10 Zelldurchmesser posterior dazu. Es wurde versucht, die Injektionen gleichmäßig über diese Region zu verteilen.

Die Positionen der einzelnen Injektionsfälle sind im folgenden Diagramm dargestellt:



Injektionsdiagramm A

Legende:

- Pigmentzellen
- Brustflossen mesenchym
- Schwann-Zellen
- Primordium
- otisches Vesikel
- ZNS
- sens. Neurone
- Epidermiszellen

zu Injektionsdiagramm A

Die zwei parallel verlaufenden gestrichelten Linien (vertikal) markieren die linke und rechte Begrenzung des Notochords. Die kurzen gestrichelten Linien (leicht schräg) stellen die zwei ersten Somitengrenzen dar. Die gestrichelte Linie am rechten Bildrand markiert den rechten Rand des nicht-neuralen Ektoderms (Dieser Rand entsteht durch die Projektion der Kugeloberfläche auf die plane Zeichenebene in zweidimensionaler Darstellung. Tatsächlich ist der Embryo rund und das Ektoderm der linken und rechten Körperhälfte verschmilzt an der Bauchseite des Embryos). (Nc) Notochord, (1., 2.) Lage des 1. und 2. Somiten.

Die Verteilung der Zellschicksale über das Ektoderm im 2-Somiten Embryo lässt vermuten, dass in diesem Stadium die Vorläuferzellen der Laterallinie und Neuralleiste weitgehend vollständig vom Neuroektoderm getrennt liegen. Einzelne Überschneidungen können durch fehlerhafte Positionsbestimmung der jeweiligen Markierung zustande kommen. Die Ungenauigkeit bei der Bestimmung des Injektionsortes lag bei schätzungsweise drei Zelldurchmessern. Klar definierte Anlagegrenzen konnten unter diesen Gegebenheiten nicht kartiert werden.

Die Anlage der Neuralleiste könnte zu diesem Zeitpunkt bereits klar von der Anlage der Laterallinie getrennt sein und die Vermischung beider Zelltypen (siehe Injektionsdiagramm A) lediglich auf einen Darstellungsfehler zurückzuführen sein.

Vorläuferzellen für Haar-, Stütz- und Gliazellen der Laterallinie konnten nahe der Neuralanlage, aber auch in weit lateral gelegenen Bereichen des Ektoderms lokalisiert werden. Es scheint, als lägen sie weit verstreut über ein großes Areal, vermengt mit den Vorläufern der Epidermis. Zukünftige Neuralleistenzellen (Pigmentzellen und Brustflossenmesenchym) liegen nahe am Rand zur Neuralplatte zwischen den Vorläuferzellen der Laterallinie. Das otische Vesikel wurde in zwei Fällen markiert. Die Zellen, die zu dieser Markierung führten, lagen weit anterior. Der Vorläufer eines identifizierten sensorischen Neurons lag auf Höhe des ersten Somiten in Nachbarschaft zu Vorläuferzellen des Primordiums und der Neuralleiste.

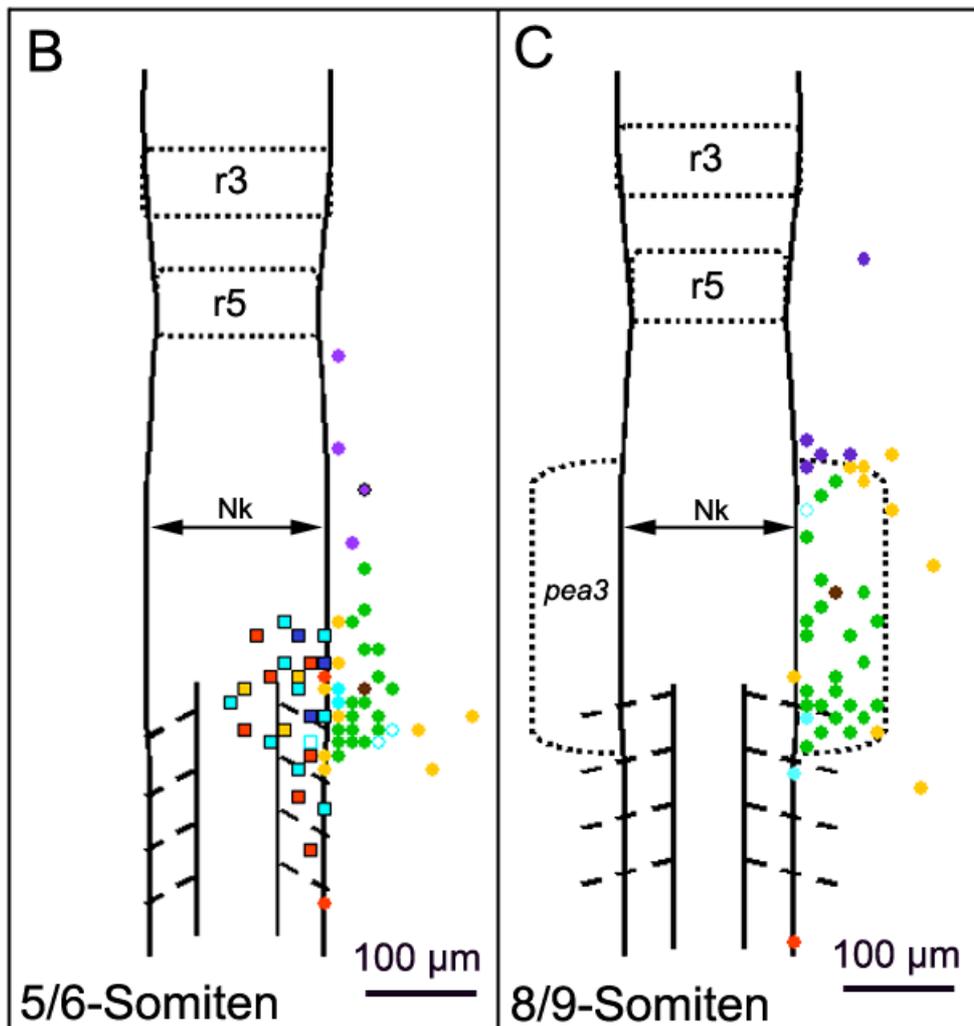
Eine klonale Analyse ist mit den hier vorgestellten Daten kaum möglich, da generell zu wenig Einzellmarkierungen gesammelt werden konnten und nur in sehr wenigen Fällen (10%) Markierungen innerhalb des Primordiums erzielt wurden.

Der Tabelle 3.1 ist zu entnehmen, dass für Serie #1 60 Injektionen zur Auswertung kamen. Zehn dieser Injektionen führten zu Markierungen innerhalb des ersten Primordiums, wovon zwei aus Mehrzellmarkierungen hervorgingen. Die anderen acht Fälle waren Einzellmarkierungen, ihre Nachkommen bildeten einen Zellklon. Fünf dieser Klone enthielten entweder Haar- oder Stützzellen oder beide Zelltypen, aber keine Gliazellen. In drei Fällen enthielten die Klone ausschließlich *Schwann*-Zellen. Die Einzellmarkierungen der *Schwann*-Zellen (blau) sind im Injektionsdiagramm A gesondert verzeichnet. Zellklone bestanden also entweder nur aus Gliazellen, oder aber aus einem der beiden anderen Zelltypen, bzw. einer Mischung von ihnen. Dieser Befund ließe sich erklären, wenn man davon ausgeht, dass Gliazellen der Laterallinie aus einer eigenständigen Zelllinie hervorgehen. Diese Vermutung muß jedoch erst noch mit umfangreichem Datenmaterial belegt werden.

Die Beobachtung, dass Haar- und Stützzellen aus gemeinsamen Vorläuferzellen generiert werden, ist übereinstimmend mit dem Befund, dass in älteren Larvenstadien Haarsinneszellen aus den umliegenden Stützzellen entstehen und dadurch Verluste innerhalb der Haarzellpopulation durch Proliferation der äußeren Zellen ausgeglichen werden (Cole und Ross, 2001).

3.3.2.3 Die Zellen der Laterallinie gehen aus der postotischen Plakode hervor

In Embryonen des 5/6-Somitenstadiums hat sich die Neuralanlage bereits zum Neuralkiel geformt und hebt sich deutlich von der benachbarten Epidermis ab. Injektionen der Serie #2a und #3 wurden ausschließlich in Bereiche lateral zum Kiel gesetzt. Die Region innerhalb der Epidermis, die im Rahmen dieser Markierungsexperimente untersucht wurde, wird von der *pea3*-Expressionsdomäne umschlossen und erstreckt sich entlang der antero-posterioren Achse von der Position des sechsten Rhombomers bis zur zweiten Somitengrenze. In der Breite hat sie eine Ausdehnung von zehn Zelldurchmessern, ausgehend vom rechten Rand des Neuralkiels. Bei der Zellmarkierung innerhalb dieser Region wurde versucht, entlang der antero-posterioren Achse eine möglichst breite Streuung der Injektionen zu erzielen, was jedoch nicht vollkommen gelang. In folgender Abbildung sind die Daten der Injektionsserie #2 a, b sowie #3 schematisch dargestellt. Die Farben codieren für das spätere Zellschicksal der jeweiligen Markierung (siehe Legende auf S.80).



Injektionsdiagramm B und C

Farblgende: siehe Injektionsdiagramm A (S. 80).

* Markierung des zweiten Primordiums.

(r3) und (r5) Rhombomer 3 und 5; (nK) Neuralkiel; (*pea3*) *pea3*-Expressionsdomäne innerhalb der mutmaßlichen postotischen Plakode.

In Diagramm B sind alle Injektionen, die innerhalb des Neuralkiels gesetzt wurden, als Rechtecke dargestellt, um sie von der Serie #2a zu unterscheiden. Die Farbcodierung ist identisch.

Generell führten Markierungen außerhalb der zu untersuchenden Region nicht zu Markierungen innerhalb der Laterallinie. Injektionen entlang des seitlichen Rands des

Neuralkiels führten zu Markierungen im Zentralnervensystem oder Derivaten der Neuralleiste wie Pigmentzellen oder Zellen des Brustflossenmesenchyms. Diese Zellen konnten im 24 h alten Embryo anhand der Lage und ihrer typischen Gestalt identifiziert werden. Innerhalb des Zentralnervensystems führten Markierungen von Zellen der rechten Körperseite häufig zu bilateral verteilten Tochterzellen in der rechten und linken Hirnhälfte. Markierungen von weit lateral gelegenen Zellen des nicht-neuralen Ektoderms führten zur Markierung von Epidermiszellen, die nahe am oder auf dem Dotter zu liegen kamen. Die jeweilige Position der Epidermiszellen entlang der rostro-caudalen Achse korrelierte mit der entsprechenden antero-posterioren Lage der injizierten Zelle. Injektionen von Zellen unmittelbar an der Grenze zwischen Neuralkiel und Plakode konnten ebenfalls Markierungen epidermaler Zellen ergeben.

In 54% der Injektionsfälle konnten Markierungen in Strukturen der Laterallinie identifiziert werden (siehe Tabelle 3.1). Dazu zählten die sensorischen Neuronen des Laterallinienganglions mit ihren aufsteigenden und absteigenden Fasern, Haar- und Stützzellen der Neuromasten sowie Gliazellen, die sich entlang des Lateralliniennervs und der Neuromasten gruppierten. Aus den Injektionsdiagrammen **B** und **C** geht hervor, dass eine gewisse topographische Beziehung zwischen den Zellen der Plakodenregionen und den daraus hervorgehenden Strukturen besteht. Weit rostral gesetzte Injektionen führten zu Markierungen innerhalb des Ohrbläschens. Diese Markierungen lagen am anterioren Rand der untersuchten *pea3*-Domäne. Aus Injektionen nahe der ersten Somitengrenze gingen fluoreszenzmarkierte Zellen innerhalb des Primordiums hervor.

Ein Vergleich der Injektionsdaten aus Serie #2b und #3 zeigt, dass sich nach Markierungen innerhalb des Plakodenektoderms eine ähnliche Verteilung der Zellschicksale ergab. Rund 50% der Markierungen führten zu Nachkommen innerhalb des Primordiums. Andere Schicksale waren jeweils in ähnlicher Weise vertreten. Einige Markierungen, die an den seitlichen Rand des Neuralkiels gesetzt wurden, endeten innerhalb der Neuralanlage (5), als Pigmentzellen (4) oder Zellen des Brustflossenmesenchyms (4). In einem Injektionsfall wurden Vorläufer für sensorische Neuronen getroffen. Am rostralen Rand der untersuchten Region wurden Zellen des zukünftigen Ohrbläschens (5) markiert. Das Brustflossenmesenchym ist ein Derivat der Neuralleiste. Aus dem Injektionsdiagramm **B** geht hervor, dass dieser Zelltyp in zwei Fällen nach der Markierung von lateral liegenden Plakodenzellen gesichtet wurde. Hierbei kann nicht ausgeschlossen werden, dass diese Zellen falsch identifiziert wurden,

und es sich bei ihnen nicht um Mesenchymzellen, sondern um Epidermiszellen auf der Brustflosse des Tieres handelte.

Nachdem in frühen Neuralplattenstadien die zukünftigen Zellen der Laterallinie noch über ein großes Areal des nicht neuralen Ektoderms verstreut lagen und weitläufig von Vorläufern der Epidermiszellen umgeben waren, liegen sie bereits zwei Stunden später zusammengedrückt in einer Region posterior zur otischen Plakode. Die Vorläufer für Haar-, Stütz- und Gliazellen liegen in dieser Region dicht an dicht und werden nur zu den äußeren Seiten der Plakode von den Vorläufern der Epidermis umgeben. Die *pea3*-Domäne umfasst den Bereich der postotischen Plakode und beinhaltet die Vorläufer der Laterallinie. Am anterioren Rand der Plakode grenzen sie direkt an die Zellen der otischen Plakode an.

3.3.2.4 Der Ursprung beider Primordien liegt im Plakodengewebe

Zellmarkierungen innerhalb der Plakode führten in 56% der Fälle zu Markierungen innerhalb des ersten Primordiums. Die Markierung des zweiten Primordiums wurde in einem Fall beobachtet. Sie ging aus der Injektion von zwei benachbarten Zellen hervor, die mittig innerhalb der Plakode lagen. Sie ergab eine gemischte Nachkommenschaft aus Haar-, Stützzellen und Gliazellen.

Generell gingen aus der Injektion von Plakodenzellen nie Markierungen innerhalb beider Primordien hervor. 30 Markierungen führten ausschließlich zu Zellen des ersten Primordiums. In dem Markierungsfall des zweiten Primordiums wurde bei 24 hpf eine Gruppe von vier dicht aufeinanderfolgenden Zellen beobachtet, die direkt unterhalb des horizontalen Myoseptums vor dem ersten Somiten positioniert lag (siehe **Abb.3.28**). Bei der Sichtung am darauffolgenden Tag befand sich die Gruppe der fluoreszenzmarkierten Zellen innerhalb des zweiten Primordiums und wanderte caudalwärts. Einzelne Zellen wurden entlang der Axone abgelegt, wie es auch nach Markierungen des ersten Primordiums zu beobachten war. Ein Teil der markierten Zellen sammelte sich im ersten sekundären Proneuromasten und wurde an der zwölften Somitengrenze abgelegt. Drei Zellen verblieben im zweiten Primordium und setzten die Wanderung fort und konnten später an weiter caudal gelegenen Positionen lokalisiert werden. Interessanterweise wurden neben Zellen des zweiten Primordiums ebenfalls Zellen innerhalb eines dorsal liegenden Neuromasts gesichtet. Diese Beobachtung steht in

Übereinstimmung mit der Vermutung, dass das Primordium der dorsalen Linie aus dem Zellverband des zweiten Primordiums abgespalten wird, unmittelbar bevor beide mit der Wanderung beginnen.

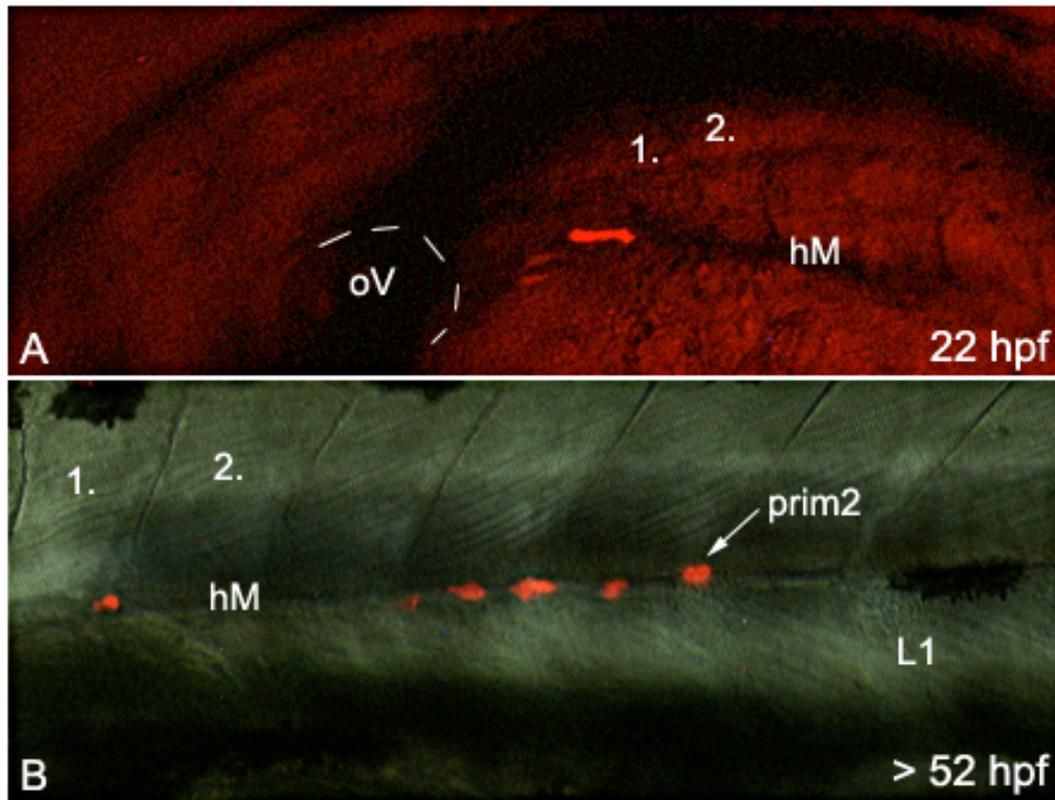


Abb. 3.28: Markierung von Primordium2. **A:** Eine Zellmarkierung innerhalb der postotischen Plakode führte am ersten Tag der Entwicklung zu einer Gruppe von vier dicht hintereinander liegenden Zellen. Sie lagen posterior zum otischen Vesikel (oV) unmittelbar vor dem 1. Somiten (1.) auf Höhe des horizontalen Myoseptums (hM). **B:** Bei einer späteren Sichtung am darauffolgenden Tag (>52hpf) hatten die fluoreszenzmarkierten Zellen ihre vorherige Position verlassen und lagen hintereinander aufgereiht entlang des horizontalen Myoseptums. Zwei Zellen konnten in Primordium2 (Prim2) lokalisiert werden. Das Primordium befand sich noch vor dem ersten primären Neuromasten L1.

3.3.2.5 Mosaikzusammensetzung der Neuromasten

Markierungen von Einzelzellen oder wenigen benachbarten Zellen innerhalb der Neuralplatte bzw. des Plakodenektoderms führten im Primordium zu Zellen, die selten gemeinsam als Gruppe abgelegt wurden, sondern vielfach auf aufeinander folgende Neuromasten verteilt wurden. So konnte sich die Nachkommenschaft einer Plakodenzelle an der Bildung mehrerer Sinnesorgane beteiligen. Jeder Neuromast stellt demnach in seiner Zusammensetzung ein Mosaik aus Zellen verschiedener Vorläufer dar. Folgende Abbildung illustriert die Verteilung einer Markierung auf zwei Sinnesorgane. Mittig zwischen den Neuromasten L3 und L4 liegen zwei *Schwann*-Zellen, frei entlang der sensorischen Axone.

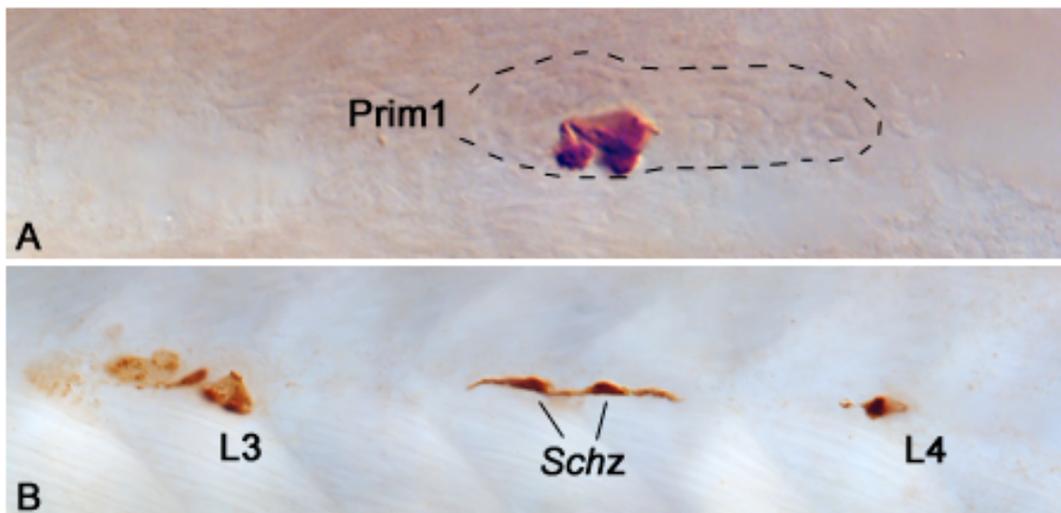


Abb. 3.29: Mosaikartige Zusammensetzung der Neuromasten. **A:** Die Markierung einer Plakodenzelle führte zu einem Klon benachbarter Zellen innerhalb des Primordiums (Prim1). **B:** Im weiteren Verlauf können diese Zellen entlang der rostro-caudalen Achse auf hintereinander liegende Neuromasten verteilt werden (L3 und L4).

Im Verlauf der Ablage konnten markierte Zellen sowohl Positionen im inneren, wie auch im äußeren Kreis des juvenilen Neuromasts einnehmen. Nach mehreren Tagen der Entwicklung zeigte sich, dass diese Zellen im Zentrum des Neuromasts zu Haarsinneszellen ausdifferenzierten. Markierte Zellen, die im Verlauf der Ablage im äußeren Randbereiche zu liegen kamen, blieben hingegen undifferenziert, zeigten keine eindeutige Gestaltänderung und waren weiterhin mitotisch aktiv. Ungeklärt ist, ob die

Zellen schon innerhalb des Primordiums ihre zukünftige Identität besitzen, oder ob diese erst durch die jeweilige Position innerhalb des Neuromasts definiert wird.

Untersuchungen zur Expression proneuraler und neuraler Gene innerhalb des Primordiums weisen darauf hin, dass der Notch-Delta Signalweg an der Differenzierung von Haar- und Stützzellen beteiligt ist, und zukünftige Sinneszellen bereits vor der Ablage eines Proneuromasts aus einem Pool von Vorläuferzellen selektiert werden.

3.3.2.6 Eine Beteiligung der Neuralleistenzellen bei der Generierung von *Schwann-Zellen*

Die Neuralleiste wird vorübergehend von einer Gruppe wandernder Zellen gebildet, die von der dorsalen Region des Neuralrohrs stammen, sich entlang verschiedener Bahnen verteilen und gruppenweise zu bestimmten Orten in der Peripherie wandern. Es ist bekannt, dass sie neben einer Vielzahl von Zelltypen auch die Neuronen der Spinalganglien und Gliazellen des peripheren Nervensystems hervorbringen. Letztere, die sogenannten *Schwann-Zellen*, bilden die Markscheide, um die Axone der sensorischen Neuronen und der Motorneuronen.

Um eine mögliche Beteiligung der Neuralleiste an der Bildung der Laterallinie zu untersuchen, wurden Zellmarkierungen innerhalb des dorsalen Neuralkiels vorgenommen. Für die Markierungsexperimente wurden Embryonen früher Neuralkielstadien (5/6 Somiten) gewählt, da zu diesem Zeitpunkt alle Zellen der Neuralleiste noch prä migratorisch waren und dorsal über dem Neuralkiel direkt unterhalb der Epidermis lagen. Im Injektionsdiagramm B (S. 83) sind alle durchgeführten Injektionen innerhalb des Neuralkiels als Rechtecke gekennzeichnet, die Markierungen innerhalb der Plakode als Kreise. Aus Tabelle 3.1 ist zu entnehmen, dass in 54% der Injektionsfälle Neuralleistenderivate wie Pigmentzellen und Zellen des Brustflossenmesenchyms erhalten wurden. Die Markierungen innerhalb der Epidermis und der Neuralanlage gingen mit großer Sicherheit aus zu oberflächlich bzw. zu tief gesetzten Injektionen hervor. Diese Fehlertrefferquote von 43% ist dadurch zu begründen, dass die Kontrolle ausschließlich darin bestand, die Markierung innerhalb des Neuralkiels zu orten, nicht aber ihre genaue dorso-ventrale Position darin zu bestimmen. In drei Fällen (13%) konnte eine Markierung von *Schwann-Zellen* erzielt werden. Sie sind im Injektionsdiagramm B blau gekennzeichnet. In allen drei Fällen fanden sich die

Nachkommen der injizierten Zellen innerhalb des Primordiums wieder. Erst nach ihrer Ablage konnten sie als Gliazellen erkannt werden. Alle kamen entlang des horizontalen Myoseptums zu liegen und wiesen die für *Schwann*-Zellen charakteristische Gestalt auf, auch wenn die Zellen in einem noch nicht voll ausdifferenzierten Zustand vorlagen. Neben den Gliazellen waren hier weder Haarsinneszellen noch Stützzellen der Neuromasten an der Nachkommenschaft beteiligt.

Injektionen, die innerhalb des Plakodenektoderms in Embryonen gleichen Alters durchgeführt wurden, führten in 48% der Fälle zu Markierungen innerhalb des Primordiums. Aus ihnen gingen neben Haar- und Stützzellen der Neuromasten auch Gliazellen hervor. Ob alle drei Zelltypen aus einer gemeinsamen Zelllinie entstanden, konnte nicht beurteilt werden, da zwischen Einzell- und Mehrzellmarkierungen nicht unterschieden wurde.

Die Daten weisen darauf hin, dass zu einem Zeitpunkt noch vor dem Auswandern der Neuralleistenzellen beide Gewebe unabhängig Gliavorläufer beinhalten. Andererseits können die wenigen positiven Injektionsfälle, aus denen in Serie #2b Gliazellen hervorgingen, auch auf eine fehlerhafte Positionsbestimmung der Markierung innerhalb des Neuralkiels zurückzuführen sein, so dass Zellen die am Rand des Neuralkiels lokalisiert wurden eigentlich schon im Randbereich der Plakode lagen. In weiteren Experimenten soll untersucht werden, inwieweit Neuralleistenzellen tatsächlich an der Bildung von *Schwann*-Zellen beteiligt sind und ob die Erkenntnisse aus dieser Analyse bestätigt werden können.

4. Diskussion

4.1 Allgemeine Betrachtungen

Zahlreiche beschreibende und experimentelle Arbeiten an Amphibien- und Fischlarven beschäftigten sich in der Vergangenheit mit der ontogenetischen Entstehung der Laterallinie, der Entwicklung der assoziierten Sinnesorgane und deren zentralen Projektionen (Stone, 1922; Wright, 1947, 1951; Winkelbauer und Hauser, 1983 a, b, 1989; Raible und Kruse, 2000; Gompel *et al.*, 2001). Übereinstimmend wurden die Anlagen der hinteren Körper- und Schwanzlinien als Primordien beschrieben, die im Verlauf der frühen Embryonalentwicklung die Fähigkeit zur Migration erlangen und entlang ihrer Wanderoute über den Rumpf Sinnesorgane positionieren.

Zwei Primordien konnten im Rahmen dieser Arbeit identifiziert und charakterisiert werden.

Beide Primordien zeigen, trotz eines signifikanten Größenunterschiedes, die Fähigkeit zur Migration und Disposition von Neuromasten. Ihre Wanderouten entlang der Rumpfmittellinie sind identisch. Mikroskopische Untersuchungen beider Anlagen belegen zudem eine vergleichbare Morphologie. Auch Größe, Form und Wanderverhalten der sie konstituierenden Zellen sind vergleichbar. Die Generierung primärer Neuromasten aus einem Primordium wurde am Zebrafisch bereits in mehreren Arbeiten umfassend beschrieben (Sahly *et al.*, 1999; Raible und Kruse, 2000; Gompel *et al.*, 2001). So wird zum Beispiel die Position des Primordium1 entlang der rostro-caudalen Achse des Embryos konventionell schon seit Jahren zur Bestimmung des Entwicklungsalters herangezogen (Kimmel *et al.*, 1995). Über die Erweiterung des embryonalen Systems zur Laterallinie junger Larven und die in diesem Zusammenhang entstehenden zusätzlichen Neuromasten gab es bisher jedoch keine genauen Kenntnisse. Die im ersten Teil dieser Arbeit angewandten mikroskopischen und histologischen Methoden führten zu einer detaillierten Beschreibung des Primordium1. Erkenntnisse aus diesen Untersuchungen standen in direkter Übereinstimmung mit bereits veröffentlichten Daten am Zebrafisch (Gompel *et al.*, 2001). Die gewählten Methoden waren demnach verlässlich und konnten auf die Untersuchungen späterer Prozesse übertragen werden.

4.1.1 Zum Wanderverhalten der Primordien

Das identifizierte zweite Primordium wandert zeitlich versetzt zur ersten Anlage. Erst nachdem das Primordium 1 das caudale Ende des Embryos erreicht hat, setzt sich das zweite aus seiner frühen Position heraus unmittelbar vor dem ersten Somiten in Gang. Seine Wanderung stellt im Grunde eine Wiederholung des vorangegangenen Prozesses dar. Signifikante Unterschiede zwischen beiden Anlagen bestanden sowohl in ihrer Größe als auch in der Geschwindigkeit ihres Vorankommens. Untersuchungen des Wanderverhaltens am konfokalen Mikroskop zeigten eine deutlich reduzierte Wandergeschwindigkeit für das zweite Primordium. Es bewegte sich, bezogen auf den vorderen Rumpfbereich, mit 0,4 Somiten/h um ein Viertel langsamer als das erste Primordium. Die Strecke vom rostralen Ende, posterior zum Ohrbläschen, bis hinunter zur Schwanzspitze wird vom ersten Primordium in einem Zeitraum von 24 h zurückgelegt. Die Auswertungen der Fuchsinfärbungen ergaben, dass die zweite Anlage für diese Entfernung rund drei Wochen benötigt. Beachtet werden muss in diesem Zusammenhang natürlich, dass im Verlauf der späteren Entwicklung die absolute Länge der Larve beträchtlich zunimmt und die vom zweiten Primordium tatsächlich zurückgelegte Entfernung zwischen Ohr und Schwanzende um ein Vielfaches größer ist.

Weiterhin wurde beobachtet, dass sich das Primordium vor der Ablage eines sekundären Proneuromasts verlangsamt und vorübergehend zum Stillstand kam. In diesem Zeitraum konnten vermehrt Zellteilungen beobachtet werden. Zu derartigen Verzögerungen kam es bei der Ablage primärer Neuromasten nie. Es ist anzunehmen, dass die Mitosen einen Grund zur Verzögerung des Wanderverhaltens darstellen. Im Verlauf einer Teilung rundet sich eine Zelle ab und lockert ihre Kontakte zu benachbarten Zellen. Es erscheint höchst unwahrscheinlich, dass eine Zelle in dieser Gestalt zu einem aktiven Wanderverhalten fähig ist. Vielmehr muß angenommen werden, dass ihr Vorankommen während des Zeitraums einer Zellteilung innerhalb des Primordiums passiver Art ist und von umliegenden Zellen mitgetragen wird. Vermutlich können die Verzögerungen von vereinzelt auftretenden Zellteilungen vom ersten Primordium aufgrund seiner Größe kompensiert werden, nicht aber vom zweiten. In dieser kleinen Zellgruppe haben vermehrte Zellteilungen vermutlich einen stärkeren Einfluß auf den Gesamtzellverband, so dass eine Anhäufung von Mitosen die Verlangsamung der Zellgruppe zur Folge haben könnte.

Zu einer zusätzlichen Verlangsamung mag es auch dadurch kommen, dass die zweite Anlage auf ihrer Route entlang des horizontalen Myoseptums jeden einzelnen primären Neuromasten umwandern muss, da zu diesem Zeitpunkt die frühen Sinnesorgane noch auf gleicher Höhe liegen. Die zeitliche Verzögerung, die dem Primordium² durch die Umwanderung des ersten primären Neuromasts entsteht wurde mit 20 Minuten berechnet. Eine Verzögerung von insgesamt 1_ Stunden für die Umwanderung der fünf primären Neuromasten stellt jedoch in Bezug auf den Gesamtprozess keine entscheidende Beeinträchtigung dar.

4.1.2 Zellteilungen innerhalb der Primordien

Die Größe des ersten Primordiums wurde mit ca. 110 Zellen berechnet. Vergleichbare Untersuchungen kamen auf entsprechende Werte (Gompel *et al.*, 2001). Die Anzahl der beteiligten Zellen innerhalb eines Primordiums zeigte sich im zeitlichen Verlauf höchst variabel und änderte sich aufgrund von Zellteilungen und der kontinuierlichen Disposition von Zellgruppen ständig. So können Primordien kurz vor der Ablage eines Proneuromasten bis zu 120 Zellen umfassen und nach seiner Ablage auf eine Größe von 80 Zellen schrumpfen. Eine Größenregulierung des Primordiums findet offensichtlich durch Zellteilungen statt. Das folgende Rechenbeispiel zeigt, dass der Verlust von Zellen, der durch die Ablage von Proneuromasten entsteht, durch anschließende Mitosen nicht vollständig kompensiert werden kann: Innerhalb von 28 h bringt das Primordium¹ sieben Proneuromasten von jeweils durchschnittlich 30 Zellen hervor. Insgesamt werden von ihm also rund 210 Zellen positioniert. Da es aber nur mit einer Anzahl von rund 100 Zellen startet, müsste eine Differenz von rund 110 Zellen durch Zellteilungen im Verlauf der Wanderung generiert werden. Bei einer zuvor ermittelten Teilungsrate von 2,5 Zellteilungen innerhalb des Primordium¹ pro Stunde kommt es in einem Zeitrahmen von 28 h allerdings nur zur Bildung von 70 zusätzlichen Zellen.

Die Generierung primärer Neuromasten mag tatsächlich nicht so präzise ablaufen, wie sie in diesem Rechenbeispiel dargestellt wurde. So besteht möglicherweise innerhalb eines Individuums eine beträchtliche Schwankung zwischen der Zellzahl benachbarter Neuromasten. Anfängliche Größenunterschiede könnten zum Beispiel erst später durch eine individuelle Regulierung der Teilungsaktivität im differenzierenden Sinnesorgan ausgeglichen werden. Die Ablage und Differenzierung von Neuromasten stellt einen

ausgesprochen dynamischen Prozess dar. Zu jeder Zeit finden sowohl im Primordium, in den Proneuromasten, wie auch den reifenden Neuromasten kontinuierlich Zellteilungen statt. Es konnten jedoch weder räumliche noch zeitliche Verteilungsmuster von Mitosen innerhalb dieser Strukturen erkannt werden. Mechanismen, die an der Größenregulierung der Sinnesorgane beteiligt sind, sind im Zebrafisch gänzlich unbekannt. Dagegen konnten Untersuchungen von Winkelbauer und Hauser an triploiden *Xenopus* Embryonen zeigen, dass die Größe der Sinnesorgane nicht über die absolute Zellzahl eines Neuromasts, sondern vielmehr über dessen totale Zellmasse (Volumen) reguliert wird. Triploide Organe sind in ihrer Gesamtgröße (Volumen) unverändert, zeigen aber im Vergleich zu diploiden Neuromasten eine Reduktion in der Anzahl ihrer Zellen (Winkelbauer und Hauser, 1985).

Ein zusätzliches Problem in diesem Zusammenhang stellt die Tatsache dar, dass neben der regelmäßigen Ablage von Neuromasten als Zellgruppen auch Einzelzellen den Zellverband des Primordiums verlassen. Hierbei handelt es sich mit großer Wahrscheinlichkeit um *Schwann*-Zellen, die sich einzeln entlang der mitwandernden Axone aufreihen und an der späteren Faszikulierung des Lateralisnervs beteiligt sind (Gilmour *et al.*, 2002; Brösamle und Halpern, 2002). Sie waren bereits bei 48 hpf anhand ihrer charakteristischen Zellform und Position als solche zu erkennen. Die Auswertung der Injektionsexperimente ergab, dass einzelne fluoreszenzmarkierte Zellen innerhalb des Primordiums häufig zu einer Reihe dicht hintereinanderliegender Gliazellen entlang der Axone führten. Ob es schon während der Wanderung oder aber erst nach Verlassen des Primordiums zu vermehrten Zellteilungen kommt, konnte nicht geklärt werden, da die Ablage der Zellen nicht kontinuierlich verfolgt wurde. So bleibt die Frage offen, in welchem Maß Schwannzellen an der Zusammensetzung des ersten Primordiums beteiligt sind.

Mit einer Größe von durchschnittlich 30 Zellen ist das Primordium₂ auffallend kleiner als das erste Primordium und wird nach Ablage eines sekundären Proneuromasts auf ein Minimum seiner ursprünglichen Größe reduziert. Auch hier stellt sich die Frage, ob das Primordium₂ allein durch Zellteilungen in der Lage ist, seine ursprüngliche Größe wiederzuerlangen. Im Gegensatz zu Primordium₁ liegt hier die Ablage von zwei aufeinander folgenden Neuromasten zwar räumlich näher, aber in einem zeitlich viel größeren Abstand. Zwischen dem dritten und fünften Entwicklungstag werden drei zusätzliche Neuromasten gebildet. So liegen zwischen der Ablage zwei neuer Neuromasten ca. 16 h. Die Zellteilungsrate innerhalb des Primordiums₂ wurde mit 1,3

Mitosen pro Stunde berechnet. Dieser Wert gilt jedoch ausschließlich für den sehr frühen Beobachtungszeitraum des dritten Tages der Entwicklung. Ob es in älteren Larven zu einer Veränderung der Mitosenhäufigkeit kommt, ist nicht untersucht. Bei 1,5 Zellteilungen/h werden in 16h 21 zusätzliche Zellen gebildet. Der Zuwachs an Zellen entspricht also in etwa der Größe eines Proneuromasts. Doch genau wie im Falle des ersten Primordiums entsteht auch hier noch ein zusätzlicher Zellverlust durch die kontinuierliche Ablage von Einzelzellen, der in die obige Berechnung nicht mit eingeht.

Da weder im Rahmen dieser Arbeit, noch in vorangegangenen Untersuchungen am Zebrafisch und anderen Spezies jemals beobachtet wurde, wie Einzelzellen oder Zellgruppen im Verlauf des Wanderprozesses aus umliegenden Regionen vom Primordium in den Zellverband aufgenommen wurden, kann diese Möglichkeit zur Größenregulierung als unwahrscheinlich betrachtet werden.

4.2. Zur Bildung des postembryonalen Lateralliniensystems

Die Beobachtung, dass auch das zweite Primordium nur in unregelmäßigen Intervallen Neuromasten ablegt und Somitengrenzen unbesetzt bleiben, warf die Frage auf, ob an der Vervollständigung der posterioren Laterallinie noch weitere, nachfolgende Primordien beteiligt sind.

Neben den hier beschriebenen konnte im Rahmen der Untersuchungen kein drittes Primordien gesichtet werden. Bei der Auswertung des histologischen Materials wurde vorausgesetzt, dass ein mögliches drittes Primordium in seinen Eigenschaften bezüglich Größe, Gestalt und Wanderverhalten mit den beiden Vorangegangenen vergleichbar sein sollte. In dem hier untersuchten Zeitraum der ersten drei Entwicklungswochen wurde jedoch keine derartige Struktur identifiziert.

Vielmehr wurde beobachtet, dass zusätzliche, sekundäre Neuromasten aus Verdopplungen bereits bestehender Sinnesorgane hervorgehen. Durch Zellteilungen innerhalb des äußeren Kreises der Stützzellen nehmen die Neuromasten kontinuierlich an Umfang zu. Haben sie eine kritische Größe erreicht, teilt sich die Zellgruppe und ein Tochterneuromast wird abgespalten. Während er vom Ort seiner Entstehung in ventraler Richtung abwandert, differenzieren in seiner Mitte die Haarsinneszellen. Dieser Prozess war an allen Positionen entlang der rostro-caudalen Achse im zeitlichen Verlauf der

Larvenentwicklung zu beobachten. Demnach wurden drei Prozesse identifiziert, die an der Generierung von Neuromasten beteiligt sind:

1. Die Ablage primärer Neuromasten aus Primordium1 führt zur Bildung der embryonalen Laterallinie.
2. Die Ablage sekundärer Neuromasten aus Primordium2 entlang der bereits existierenden Linie, und
3. Zweiteilungen primärer und sekundärer Neuromasten führen zur Bildung der postembryonalen Laterallinie.

In diesem Zusammenhang ist zu diskutieren, ob den beiden letzten Prozessen ein unterschiedlicher Stellenwert bei der Generierung sekundärer Neuromasten zukommt.

So könnte das zweite Primordium eine wichtige Rolle bei der Generierung zusätzlicher Sinnesorgane spielen und den Hauptanteil der sekundären Neuromasten hervorbringen. Die Knospung von Neuromasten würde in diesem Zusammenhang einen Mechanismus darstellen, der lediglich frühe Unregelmäßigkeiten ausgleicht und die postembryonale Laterallinie zu einer kontinuierlichen Abfolge von Neuromasten vervollständigt. Vergleicht man jedoch die Anzahl der von ihnen generierten Neuromasten miteinander, so wird offensichtlich, dass beide Prozesse maßgeblich an der Bildung neuer Sinnesorgane beteiligt sind. Zählungen innerhalb des vorderen Abschnitts der Laterallinie ergaben, dass von fünf Neuromasten zwischen L1 und L2 durchschnittlich drei vom Primordium gebildet werden und zwei aus Verdoppelungen hervorgehen. Auf die gesamte Länge bezogen entstehen demnach 15 Neuromasten aus dem Primordium und 10 aus Verdopplungen. Nach vier Wochen der Entwicklung umfasst das System 32 Neuromasten, von denen 7 zu den primären und 25 zu den sekundären Neuromasten zählen.

Es ist nicht auszuschließen, dass dem Primordium2 neben der Generierung von Sinnesorganen noch eine weitere Funktion im Zusammenhang mit der Musterbildung innerhalb des postembryonalen Seitenliniensystems zukommt. So könnte es im Rahmen der ventralen Verlagerung von Neuromasten einen Einfluss auf deren Wanderverhalten nehmen und auf mechanischem oder chemischem Weg die Sinnesorgane zur Positionsveränderung veranlassen.

Die Verdopplung einzelner Sinnesorgane spielt auch in späteren Entwicklungsabschnitten eine Rolle. Nach der Verlagerung der posterioren Linie durch das Abwandern der differenzierten Neuromasten zur Bauchseite des Fisches, beginnt die Bildung sogenannter „stiches“, Serien dicht untereinander liegender Neuromasten in

dorso-lateraler Ausrichtung. Jede dieser Reihen entsteht durch mehrfache Zweiteilung eines einzelnen Neuromasten (Ledent, 2002). Jeder Neuromast der Rumpflinie trennt sich in dieser Form auf. Das Axon des Ursprungsneuromasts bildet dabei Kollaterale aus, die dann die einzelnen Sinnesorgane eines „stiches“ innervieren. Funktionell scheint eine derartige Multiplikation von Neuromasten eine Amplifikation des Sinnessystems darzustellen (Ledent, 2002).

Möglicherweise ist der Unterschied zwischen beiden Typen sekundärer Neuromasten und ihrer alternierenden Abfolge entlang des Rumpfes in einer komplexeren Funktionsweise des adulten Systems zu suchen. Jeder Neuromast, der entweder aus dem ersten oder dem zweiten Primordium hervorgeht, besitzt vermutlich eine eigene Innervierung durch ein spezifisches sensorisches Neuron. Die Anzahl der sensorischen Neuronen innerhalb des postotischen Ganglions wird auf 25 geschätzt. Diesen stehen 7 (+1) Neuromasten aus Primordium1 und rund 15 sekundären Neuromasten aus dem Primordium2 gegenüber. Eine für jeden Neuromasten eigene Innervierung erscheint demnach möglich. Neuromasten dagegen, die aus einer Verdopplung hervorgehen werden über Kollaterale des Mutterneuromasten innerviert (Ledent, 2002). Eine Verteilung von Neuromasten gleicher Innervierung innerhalb eines bestimmten Areals könnte zu einer Vergrößerung einzelner rezeptiver Felder der sensorischen Neuronen führen und eine lokale Verstärkung dort eingehender Sinneseindrücke zur Folge haben.

4.3 Zum Ursprung der Primordien

Nach eigener Beurteilung der Ergebnisse sind an der Entwicklung des postembryonalen Seitenliniensystems im Zebrafisch ausschließlich die Anlagen des ersten und zweiten Primordiums beteiligt. Vorläufer der primordialen Zellen stammen aus dem Bereich der sogenannten postotischen Plakode. Die Plakode zeigt eine Polarisierung in Bezug auf das Entwicklungsschicksal ihrer Zellen (Becker *et al.*, 2001). Nur der posteriore Teil formiert sich zum Primordium, aus dem die Haar- und Sinneszellen der Neuromasten sowie einige der mit dem Lateralliniennerv assoziierten Gliazellen hervorgehen. Der anteriore Pol verbleibt in der Position caudal zum Ohrbläschen. Aus diesen letzten Zellen entstehen die Neuronen des Laterallinienganglions. Die hier durchgeführten Injektionsexperimente konnten für das Neuralkielstadium keine derartige

Regionalisierung der Plakode bestätigen. So beteiligten sich sowohl anterior als auch posterior gelegene Zellen innerhalb der Plakode an der Bildung des ersten Primordiums. Neuronen des postotischen Ganglions konnten nur in einem Injektionsfall angesprochen werden. Die markierte Zelle, aus der das sensorische Neuron hervorging, lag nicht am posterioren Ende der Plakode sondern mittig darin, umgeben von Vorläufern für Haar-, Stütz- und Gliazellen. Es ist denkbar, dass eine Regionalisierung der Plakoden erst gegen Ende des ersten Entwicklungstages erfolgt, und in frühen Somitenstadien die Plakodenzellen in Bezug auf ihre spätere Position noch mosaikartig verteilt sind.

Die Bildung des zweiten Primordiums konnte mit nur einem Injektionsfall aus der Plakode gezeigt werden. Die markierte Zelle lag mittig innerhalb der Plakodenregion, zwischen Vorläuferzellen des ersten Primordiums. In keinem Fall ergaben die Injektionen von Plakodenzellen Fluoreszenzmarkierungen innerhalb beider Primordien. So kann davon ausgegangen werden, dass die Vorläuferzellen der ersten und zweiten Anlage schon voneinander getrennt innerhalb der Plakode liegen. Zum Zeitpunkt der Sichtung bei 45 hpf umfasste das zweite Primordium knapp 15 Zellen nach der Abspaltung einer weiteren Zellgruppe, dem mutmaßlichen Primordium der dorsalen Laterallinie. Bevor es mit der Wanderung nach 50 hpf beginnt, nimmt es durch Zellteilungen noch an Größe zu. Es ist anzunehmen, dass das zweite Primordium aus einer sehr kleinen Anzahl von Vorläufern entsteht. Das würde erklären, warum bei Markierungsexperimenten innerhalb früher Plakodenstadien sich die Wahrscheinlichkeit, eine der Vorläuferzellen zu treffen, als ausgesprochen gering erwies, und die Anlage des Primordiums nur ein einziges Mal getroffen wurde.

An dieser Stelle soll folgendes Modell vorgeschlagen werden:

Der Bereich der Plakode, der die zukünftigen ersten und zweiten Anlagen umfasst, formiert sich zu einem zusammenhängenden Zellverband und beginnt mit der Wanderung. Unmittelbar vor dem somitischen Mesoderm wird eine Zellgruppe abgespalten und zurückgelassen. Aus dieser Zellgruppe geht sowohl das zweite Primordium als auch das Primordium der dorsalen Laterallinie hervor. Letztere wandert zeitgleich mit dem Primordium² und bildet die Neuromasten auf der Rückenseite der Larve. Zu dieser Vermutung führte die Beobachtung, dass aus einer Gruppe von vier hintereinander liegenden fluoreszenzmarkierten Zellen nahe des 1. Somiten sowohl Zellen des zweiten Primordiums als auch Neuromasten der dorsalen Linie hervorgingen. Weiterhin konnten Neuromasten der dorsalen Linie in DASPEI-Färbungen gesichtet und deren sukzessive Entstehung verfolgt werden.

Es konnte gezeigt werden, dass alle Zelltypen der Laterallinie aus ektodermalem Plakodengewebe hervorgehen können. Inwieweit der Umfang der Plakode zur Bildung der posterioren Rumpflinie allein ausreicht, oder ob eine Beteiligung anderer Gewebe, z. B. der Neuralleiste, dabei erforderlich ist, soll im Folgenden diskutiert werden.

4.4 Eine Beteiligung der Neuralleiste an der Bildung der Laterallinie – binäre Herkunft der Gliazellen?

Zahlreiche neuartige Strukturen, die sich auf dem entwicklungsgeschichtlichen Weg zu den Vertebraten herausgebildet haben, entwickeln sich ontogenetisch aus der Neuralleiste oder den Plakoden des Kopfektoderms (Butler, 2000, Shimeld und Holland, 2000). Beide entstehen im frühen Embryo in direkter Nachbarschaft innerhalb des nicht-neuralen Ektoderms seitlich der Neuralanlage, wobei die Neuralleiste als schmaler Zellverband das neurale vom nicht-neuralen Ektoderm abgrenzt. Ihre Lage zueinander lässt vermuten, dass sie während früher Induktionsereignisse aufeinander Einfluss nehmen und an der gegenseitigen Entstehung beteiligt sind.

Studien an Amphibien und verschiedenen Teleostspezies konnten hinlänglich belegen, dass Neuromasten der Kopf- und Rumpflinien aus cranialen Plakoden hervorgehen (Winkelbauer und Hauser, 1993, 1995). Mehrere experimentelle Arbeiten beschäftigten sich mit der Frage, in welchem Umfang Neuralleistenzellen an der Bildung der Laterallinie beteiligt sind. Es war bekannt, dass zur Entstehung der cranialen Ganglien neben der Neuralleiste auch sensorische Plakoden beitragen. Eine entsprechende doppelte Herkunft wurde auch für Gliazellen im Seitenliniensystem der Amphibien und in der Ohranlage bei Vögeln und Säugern bestätigt (Collazo *et al.*, 1994; und darin enthaltene Zitate). Fluoreszenzmarkierungsexperimente an *Danio rerio*, *Betta splendens* und *Xenopus* zeigten im Rahmen einer Studie, dass auch Neuromasten aus Plakodengewebe und Teilen der Kopf- sowie Rumpfneuralleiste hervorgehen (Collazo *et al.*, 1994). Im Zebrafisch lag jedoch zwischen dem Erscheinen der Neuromasten, die aus Plakoden, bzw. denen, die aus Neuralleistenzellen hervorgingen, eine beträchtliche Zeitspanne. So differenzierten die Neuromasten der Plakoden innerhalb der ersten Tage der Embryonalentwicklung. Letztere wurden teilweise erst 23 Tage nach der Fluoreszenzmarkierung entlang der Laterallinie sichtbar.

Vergleichbare Erkenntnisse konnten im Rahmen dieser Arbeit nicht gewonnen werden. Die Daten suggerieren, dass Neuralleistenzellen an der Generierung von Gliazellen innerhalb der Laterallinie beteiligt sind. Injektionen von dorsalen Neuralkielzellen führten nie zu Markierungen von Haar- und Stützzellen innerhalb der Neuromasten. Da sich allerdings der Untersuchungszeitraum ausschließlich auf die ersten vier Tage der Entwicklung beschränkte, kann nicht ausgeschlossen werden, dass markierte Zellen erst zu einem viel späteren Zeitpunkt an der Zusammensetzung von Neuromasten beteiligt sind. Ebenfalls umfasste die untersuchte Region innerhalb des Neuralkiels nur einen beschränkten Abschnitt auf Höhe der postotischen Plakode, so dass die Beteiligung der gesamten Rumpfneuralleiste nicht untersucht wurde.

Die Ergebnisse der Injektionsserien legen nahe, dass Neuralleiste und postotische Plakode gleichermaßen Vorläufer für *Schwann*-Gliazellen beinhalten. Unklar ist jedoch, ob es sich bei diesen um getrennt voneinander entstandene Populationen handelt, oder ob sie aus einer gemeinsamen Gruppe von Vorläufern hervorgingen. So könnten sie innerhalb des frühen Ektoderms aus einem gemeinsamen Verband entstehen, der dann im Verlauf der frühen Regionalisierung des Ektoderms sowohl auf die zukünftige Neuralleiste wie auch auf Plakodengewebe aufgeteilt wird. Dies würde voraussetzen, dass die Gliazellen schon zu diesem sehr frühen Entwicklungszeitpunkt als eigenständige Zelllinie etabliert wären, was sehr unwahrscheinlich ist. Aus den hier durchgeführten Zellmarkierungen in jungen Somitenstadien konnte kein genaues Bild einer Anlagekarte für das laterale Ektoderm gezeichnet werden. Ein gemeinsamer Entstehungsort für Gliazellen konnte nicht lokalisiert werden. Jedoch lassen die Daten aus Einzellmarkierungen vermuten, dass Gliazellen eventuell aus einer eigenen Zelllinie hervorgehen.

Andererseits könnte eine Verteilung der Gliavorläufer auch erst viel später, im Zuge der Wanderung von Neuralleistenzellen geschehen. So würden die ausschließlich aus der Neuralleiste hervorgehenden Gliavorläufer ihre dorsalen Positionen innerhalb des Neuralrohres verlassen, und, abhängig von ihrer rostro-caudalen Lage, in die einzelnen Plakoden einwandern. Eigene Untersuchungen weisen darauf hin, dass Neuralleistenzellen an der Bildung der *Schwann*-Zellen beteiligt sind. Fluoreszenzmarkierte Neuralleistenzellen fanden sich 10 Stunden nach der Injektion innerhalb des Primordiums wieder. Im weiteren Verlauf der Wanderung wurden sie vom Primordium abgelegt und entlang der Axone sensorischer Neuronen abgelegt. Allerdings handelt es sich hier lediglich um drei Fälle. Eine fehlerhafte Lokalisation

dieser Injektionen ist nicht auszuschließen. Zur Klärung dieser Fragestellung sollten in folgenden Experimenten umfangreichere Daten gesammelt und statistisch ausgewertet werden.

Daten aus den Untersuchungen von Collazo *et al.*, 1994 lassen vermuten, dass Neuralleistenzellen jedoch auch ohne Integration in die Plakode zur Bildung von Neuromasten und Gliazellen führen.

Im Widerspruch dazu stehen Untersuchungen zur Expression des Transkriptionsfaktors *fkf6*. Zebrafisch *fkf6* dient als Marker für prä-migratorische Neuralleistenzellen (Odenthal und Nüsslein-Volhard, 1998). Die Beobachtung, dass zum späteren Zeitpunkt auch *Schwann*-Zellen der Laterallinie und Satellitenzellen der prä- und postotischen Ganglien *fkf6* exprimieren, führte zu der Vermutung, dass die gesamte Gliazellpopulation der Laterallinie aus der Neuralleiste hervorgeht (Kelsh, *et al.*, 2000). Es muss jedoch angemerkt werden, dass frühe und späte *fkf6*-Expression nicht unbedingt in einem Zusammenhang stehen müssen und die Expression in späteren Entwicklungsabschnitten möglicherweise eine andere Zellpopulation betrifft.

5. Literatur

Abdelhak, S., Kalatzis, V., Heilig, R., Compain, S., Samson, D., Vincent, C., Weil, D., Cruaud C., Sahly, I., Leibovici, M., Bitner-Glindzicz, M., Francis, M., Lacombe, D., Vigneron, J., Charachon, R., Boven, K., Bedbeder, P., Van Regemorter, N., Weissenbach, J., Petit, C. (1997) A human homologue of the *Drosophila eyes absent* gene underlies Branchio-Oto-Renal (BOR) syndrome and identifies a novel gene family. *Nat. Genet.* 15, 157 - 164.

Adamska, M., Léger, S., Brand, M., Hadrys, T., Braun, T. und Bober, E. (2000) Inner ear and lateral line expression of a zebrafish *Nkx5-1* gene and its downregulation in the ears of FGF8 mutant, *ace*. *Mech Dev* 97, 161 - 165.

Alexandre, D. und Ghysen, A. (1999) Somatotopy of the lateral line projection in larval Zebrafish. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96, 7558 – 7562.

Baker, C.V.H. und Bronner-Fraser, M. (2001) Review: Vertebrate cranial placodes I embryonic induction. *Dev Biol* 232, 1 – 61.

Becker, T., Becker, C.G., Schachner, M. und Bernhardt, R.R. (2001) Antibody to the HNK-1 glycoepitope affects fasciculation and axonal pathfinding in the developing posterior lateral line nerve of embryonic zebrafish. *Mech Dev* 109, 37 – 49.

Bierkamp, C. und Campos-Ortega, J.A. (1993) A zebrafish homologue of the *Drosophila* neurogenic gene *Notch* and its pattern of transcription during early embryogenesis. *Mechanisms of Development* 43, 87 - 100.

Blaxter, J.H.S. (1987) Structure and development of the lateral line. *Biol Rev.* 62, 471 – 515.

- Brantley, R.K. und Bass, A.H. (1988) Cholinergic neurons in the brain of a teleost fish (*Porichthys notatus*) located with a monoclonal antibody to choline acetyltransferase. *J Comp Neurol* 275, 87 - 105.
- Bricaud, O., Chaar, V., Dambly-Chaudière, C. und Ghysen, A. (2001) Early efferent Innervation of the zebrafish lateral line. *J Comp Neurol* 434, 253 – 261.
- Brösamle, C. und Halpern, M.E. (2002) Characterization of myelination in developing zebrafish. *Glia* 39, 47 - 57.
- Budelmann, B.U. (1989) Hydrodynamic receptor systems in invertebrates. in Coombs *et al.* 1989, 607 - 631. Butler, A.B. (2000) Sensory system evolution at the origin of craniates. *Phil. Trans. R. Soc. Lond.* 355, 1309 - 1313.
- Cepko, C.L., Golden, J.A., Szele, F.G. und Lin, J.C. (1997) Lineage analysis in the vertebrate central nervous system. In „Molecular and Cellular Approaches to Neural Development“. Oxford University Press.
- Chisholm, A. und Tessier-Lavigne, M. (1999) Conservation and divergence of axon guidance mechanisms. *Curr Opin Neurobiol* 9, 603 - 615.
- Claass, B. und Münz, H. (1980) Bonyfish lateral line efferent neurons identified by retrograde axonal transport of horseradish peroxidase (HRP). *Brain Res* 193, 249 - 253.
- Cole, G.J. und Schachner, M. (1987) Localization of the L2 monoclonal antibody binding site on chicken NCAM and evidence for its role in NCAM-mediated adhesion. *Neurosci. Lett.* 78, 227 - 232.
- Cole, L.K. und Ross, L.S. (2001) Apoptosis in the Developing Zebrafish Embryo. *Dev Biol* 432, 1 - 20.
- Collazo, A., Fraser, S.E. und Mabee, P.M. (1994) A Dual Embryonic Origin for Vertebrate Mechanoreceptors. *Science* 264, 426 - 430.

- Coombs, S., Görner, P. und Münz, H. (Hrg) (1989) *The Mechanosensory Lateral Line*. Springer Verlag, Berlin Heidelberg New York.
- Cooper, M.S., D'Amico, A. und Henry, C.A.. *Analysing Morphogenetic Cell Behaviors in Vially-Stained Zebrafish Embryos*. Department of Zoology, University of Washington, Seattle, WA 98195 – 1800.
- Corwin, J.T. und Warchol, M.E. (1991) *Auditory Hair Cells: Structure, Function, Development, and Regeneration*. *Annu. Rev. Neurosci.* 14, 301 - 333.
- Crawford, A.C. und Fettiplace, R. (1985) *The mechanical properties of ciliary bundles of turtle cochlea hair cells*. *J. Physiol.* 364, 359 - 379.
- Czihak, G., Langer, H., Ziegler, H. (Hrsg.) *Biologie*, 4. Auflage, 1990 Springer-Verlag 497 - 501.
- David, R., Ahrens, K., Wedlich, D. und Schlosser, G. (2001) *Xenopus Eyal* demarcates all neurogenic placodes as well as migrating hypaxial muscle precursors. *Mech Dev* 103, 189 - 192.
- Driever, W., Solnica-Krezel, L., Schier, A.F., Neuhauss, S.C.F., Malicki, J., Stemple, D.L., Strainier, D.Y.R., Zwartkruis, F., Abdelilah, S., Rangini, Z., Belak, J. und Boggs, C. (1996) *A genetic screen for mutations affecting embryogenesis in zebrafish*. *Development* 123, 37 - 46.
- Dutton, K.A., Pauliny, A., Lopes, S.S., Elworthy, S., Carney, T.J., Rauch, J., Geisler, R., Haffter, P. und Kelsh, R.N. (2001) *Zebrafish colourless* encodes *sox10* and specifies non-ectomesenchymal neural crest fates. *Development* 128, 4113 – 4125.
- Eyal-Giladi, H. (1997) *Establishment of the axis in chordates: facts and speculations*. *Development* 124, 2285 – 2296.

- Flock, A. und Streliaoff, D. (1984) Graded and nonlinear mechanical properties of sensory hairs in the mammalian hearing organ. *Nature* 310, 597 - 599.
- Fritzsche, B. (1981) The pattern of lateral-line afferents in urodeles. *Cell Tissue Res.* 218, 581 - 594.
- Gilmour, D.T., Maischein, H.-M. und Nüsslein-Volhard, C. (2002) Migration and Function of a Glial Subtype in the Vertebrate Peripheral Nervous System. *Neuron* 34, 577 - 588.
- Gimlich, R.L. und Braun, J. (1985) Improved fluorescent compounds for cell lineage. *Dev Biol* 109, 509 - 514.
- Gompel, N., Cubedo, N., Thisse C., Thisse, B., Dambly-Chaudière, C. und Ghysen, A. (2001) Pattern formation in the lateral line of zebrafish. *Mech. Dev.* 105, 69 – 77.
- Gompel, N., Dambly-Chaudière, C. und Ghysen, A. (2001) Neuronal differences prefigure somatotopy in the zebrafish lateral line. *Development* 128, 387 - 393.
- Graham, A. und Begbie, J. (2000) Neurogenic placodes: a common front. *TINS* 23 (7), 313 - 316.
- Haddon, C., Jiang, Y.-J., Smithers, L. und Lewis, J. (1998) Delta-Notch signalling and the patterning of sensory cell differentiation in the zebrafish ear: evidence from the *mind bomb* mutant. *Development* 125, 4637 – 4644.
- Haffter, P., Granato, M., Brand, M., Mullins, M.C., Hammerschmidt, M., Kane, D.A., Odenthal, J., van Eeden, F.J.M., Jiang, Y.J., Heisenberg, C.P., Kelsh, R.N., Furutani Seiki, M., Vogelsang, E., Beuchle, D., Schach, U., Fabian, C. und Nüsslein-Volhard, C. (1996) The identification of genes with unique and essential functions in the development of the zebrafish, *Danio rerio*. *Development* 123, 1 - 36.

- Harrison, R.G. (1904) Experimentelle Untersuchungen über die Entwicklung der Sinnesorgane der Seitenlinie bei den Amphibien. Arch Mikrosk Anat Entwicklunsmech 63, 25 - 149.
- Hatta, K., Takahashi, Y. (1996) Secondary axis induction by heterospecific organizer in zebrafish. Dev. Dyn. 205, 183 - 195.
- Helde, K.A., Wilson, E.T., Cretekos, C.J., Grunwald, D.J. (1994) Contribution of early cells to the fate map of the zebrafish gastrula. Science 265, 517 - 520.
- Hisoaka, K.K. und Battle, H.I. (1958) The normal developmental stages of the zebrafish *Brachydanio rerio* (Hamilton-Buchanan). J.Morph. 102, 311 - 328.
- Itoh, M. und Chitnis, A.B. (2001) Expression of proneural and neurogenic genes in the zebrafish lateral line primordium correlates with selection of hair cell fate in neuromasts. Mech Dev 102, 263 - 266.
- Jørgensen, J.M. (1989) Evolution of octavolateralis sensory cells. in Coombs *et al.* 1989, 115 - 145.
- Kalmijn, A. (1974) The detection of electric fields from inanimate and animate sources other than electric organs. In "Handbook of Sensory Physiology" (Fessard, A., Hrsg.) Springer Verlag, New York Vol III/3 147 - 200.
- Kelsh, R.N., Dutton, K., Medlin, J. und Eisen, J.S. (2000) Expression of zebrafish *fkdb* in neural crest-derived glia. Mech Dev 93, 161 - 164.
- Kelsh, R.N. und Eisen, J.S (2000) The zebrafish *colourless* gene regulates development of non-ectomesenchymal neural crest derivatives. Development 127, 515 - 525.
- Kimmel, C.B., Ballard, W.W., Kimmel, S.R., Ullmann, B., Schilling, T.F. (1995) Stages of embryonic development of the zebrafish. Dev Dyn 203(3), 253 - 310.

- Kimmel, C.B. (1993) Patterning the brain of the zebrafish embryo. *Annu. Rev. Neurosci.* 16, 707 - 732.
- Kimmel, C.B., Warga, R.M., Schilling, T.F. (1990) Origin and organisation of the zebrafish fate map. *Development* 108, 581 - 594.
- Kimmel, C.B., Sepich, D.S., Trevarrow, B. (1988) Development of segmentation in zebrafish. *Development* 104(Suppl.), 197 - 207.
- Lanford, P.J., Lan, Y., Jiang, R., Lindsell, C., Weinmaster, G., Gridley, T. und Kelly, M.K. (1999) Notch signalling pathway mediates hair cell development in mammalian cochlea. *Nature genetics* 21, 289 - 292.
- Lee, J.-S., Ray, R. und Chien, C.-B. (2001) Cloning and expression of three zebrafish roundabout homologs suggest roles in axon guidance and cell migration. *Dev Dyn* 221, 216 - 230.
- Ledent, V. (2002) Postembryonic development of the posterior lateral line in zebrafish. *Development* 129, 597 - 604.
- Metcalfe, W.K. (1985) Sensory neuron growth cones comigrate with posterior lateral line primordial cells in zebrafish. *J. Comp. Neurol.* 238, 218 - 224.
- Meredith, G.E. und Roberts, B.L. (1987) Distribution and morphological characteristics of efferent neurons innervating end organs in the ear and lateral line in the European eel. *J Comp Neurol* 265, 494 - 506.
- Metcalfe, W.K., Kimmel, C.B. und Schabtach, E. (1985) Anatomy of the posterior lateral line system in young larvae of the Zebrafish. *J. Comp. Neurol.* 233, 377 - 389.
- Mowbray, C., Hammerschmidt, M. und Whitfield, T.T. (2001) Expression of BMP signalling pathway in the developing zebrafish inner ear and lateral line. *Mech Dev* 108, 179 - 184.

- Müller, M., Weizsäcker, v. E. und Campos-Ortega, J.A. (1996) transcription of a zebrafish gene of the *hairy-Enhancer of split* family delineates the midbrain anlage in the neural plate. *Dev Genes Evol*, 206, 153-160.
- Münchberg, S.R., Ober, EA. und Steinbeisser, H. (1999) Expression of the Ets transcription factors *erm* and *pea3* in early zebrafish development. *Mech Dev* 88, 233 - 236.
- New, J.G. und Singh, S. (1994) Central topography of anterior lateral line nerve projections in the channel catfish, *Ictalurus punctatus*. *Brain Behav Evol* 43, 34 - 50.
- Nieto, M.A. (2001) The early steps of neural crest development. *Mech Dev* 105, 27 – 35.
- Northcutt, R.G. (1986) Electoreception in nonteleost bony fishes. in “Electoreception” (Bullock, T.H. und Heiligenberg, W., Hrsg.) Wiley, New York 257 - 285.
- Northcutt, R.G., Brändle, K. und Fritsch, B. (1994) Electoreceptors and Mechanosensory Lateral Line Organs Arise from Single Placodes in Axolotls. *Dev Biol* 168, 358 - 373.
- Odenthal, J. und Nüsslein-Volhard, C. (1998) *fork head* domain genes in zebrafish. *Dev Genes Evol* 208, 245 – 258.
- Ornitz, D.M. und Itoh, N. (2001) Fibroblast growth factors. *Genom Biol.* 2, 3005.
- Papan, C. und Campos-Ortega, J.A. (1994) On the formation of the neural keel and neural tube in the zebrafish *Danio (Brachydanio) rerio*. *Roux Arch Dev Biol* 203, 178 - 186.

- Park, H.C., Kim, C.H., Bae, Y.K., Yeo, S.Y., Kim, S.H., Hong, S.K., Shin, J., Yoo, K.W., Hibi, M., Hirano, T., Miki, N., Chitnis, A.B., Huh, T.L. (2000) Analysis of upstream elements in the HuC promoter leads to the establishment of transgenic zebrafish with fluorescent neurons. *Dev Biol* 227, 279 – 293.
- Pauls, S., Geldmacher-Voss, B. und 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 – 610.
- Raible, D.W. und Kruse, G. J. (2000) Organization of the Lateral Line System in embryonic Zebrafish. *J Comp Neurol* 421, 189 – 198.
- Raible, F. und Brandt, M. (2001) Tight transcriptional control of the ETS domain factors *Erm* and *Pea3* by Fgf signaling during early zebrafish development. *Mech Dev* 107, 105 - 117.
- Riley, B.B., Chiang, M.-Y., Farmer, L. und Heck, R. (1999) The *deltaA* gene of zebrafish mediates lateral inhibition of hair cells in the inner ear and is regulated by *pax2.1*. *Development* 126, 5669 - 5678.
- Roehl, H. und Nüsslein-Volhard, C. (2001) Zebrafish *pea3* and *erm* are general targets of FGF8 signaling. *Curr Biol* 11, 503 - 507.
- Rose, J. (1960) in *Neural Mechanisms of the Auditory and Vestibular Systems*, (Hrsg.) Rasmussen, G. und Windle, W. (Thomas, Springfield, IL) 116 - 136.
- Sahly, I., Andermann, P. und Petit, C. (1999) The zebrafish *eyal* gene and its expression pattern during embryogenesis. *Dev Genes Evol* 209, 399 - 410.
- Sapède, D., Gompel, N., Dambly-Chaudière, C. und Ghysen, A. (2002) Cell migration in the postembryonic development of the fish lateral line. *Development* 129, 605 – 615.

- Schmitz, B, Papan, C. und Campos-Ortega, J.A. (1993) Neurulation in the anterior trunk region of the zebrafish, *Brachydanio rerio*. Roux Arch Dev Biol 202, 250 - 259.
- Seeger, M., Tear, G., Ferres-Marco, D., Goodman, C.S. (1993) Mutations affecting growth cone guidance in *Drosophila*: genes necessary for guidance toward or away from the midline. Neuron 10, 409 - 426.
- Shimeld, S.M. und Holland, W.H. (2000) Vertebrate innovations. PNAS 97, 4449 - 4452.
- Shoji, W., Yee, C.S. und Kuwada, J.Y. (1998) Zebrafish semaphorin Z1a collapses specific growth cones and alters their pathway in vivo. Development 125, 1275 - 1283.
- Smith, S.C., Lannoo, M.J. und Armstrong, J.B (1988) Lateral-line neuromast development in *Ambystoma mexicanum* and a comparison with *Rana pipiens*. J. Morphol. 198, 367 - 379.
- Smith, S.C., Lannoo, M.J. und Armstrong, J.B. (1990) Development of the mechanoreceptive lateral-line system in the axolotl: placode specification, guidance of migration, and the origin of neuromast polarity. Anat Embryol 182, 171 - 180.
- Solnica-Krezel, L., Stemple, D.L. und Driever, W. (1995) Transparent things: cell fates and cell movements during early embryogenesis of zebrafish. BioEssays 17(11), 931 - 939.
- Stone, L.S. (1922) Experiments on the development of the cranial ganglia and the lateral line sense organs in *Amblystoma punctatum*. J. Exp. Zool. 35, 421 - 496.
- Strehlow, D. und Gilbert, W. (1993) A fate map for the first cleavages of the zebrafish. Nature 361, 451 - 453.

- Wagner, T. und Schwartz, E. (1996) Efferent neurons of the lateral line system and their innervation of lateral line branches in a euteleost and an osteoglossomorph. *Anat Embryol (Berl)* 194, 271 - 278.
- Warga, R.M. und Kimmel, C.B. (1990) Cell movements during epiboly and gastrulation in zebrafish. *Development* 108, 569 - 580.
- Warga, R.M. und Kimmel, C.B. (1990) Stages of early development of the zebrafish. Universität von Oregon, Eugene, OR.
- Weisblat, D.A., Sawyer, R.T. und Stent, G.S. (1978) Cell lineage analysis by intracellular injection of a tracer. (*Science* Washington D.C.) 202, 1295 – 1298.
- Westerfield, M. (1994) *The Zebrafish Book - A guide for the laboratory use of zebrafish (Brachydanio rerio)*. University of Oregon Press; Edition 2.1.
- Whitfield, T.T., Granato, M., van Eeden, F.J.M., Schach, U., Brand, M., Fufutani-Seiki, M., Haffter, P., Hammerschmidt, M., Heisenberg, C.-P., Jiang, Y.-J., Kane, D.A., Kelsh, R.N., Mullins, M.C., Odenthal, J. und Nüsslein-Volhard, C. (1996) Mutations affecting development of the zebrafish inner ear and lateral line. *Development* 123, 241 – 254.
- Winkelbauer, R. und Hauser, P. (1983) Development of the lateral line system in *Xenopus laevis*. I. Normal development and cell movement in the supraorbital system. *J. Embryol. Exp. Morph.* 76, 265 - 281.
- Winkelbauer, R. und Hauser, P. (1983) Development of the lateral line system in *Xenopus laevis*. II. Cell multiplication and organ formation in the supraorbital system. *J. Embryol. Exp. Morph.* 76, 283 - 296.
- Winkelbauer, R. (1989) Development of the lateral line system in *Xenopus*. *Progress in Neurobiology* 32, 181 - 206.

- Williams, J.A. und Holder, N. (2000) Cell turnover in neuromasts of zebrafish larvae. *Hear. Res.* 143, 171 - 181.
- Wilson, E.T., Cretekos, C.J. und Helde, K.A. (1995) Cell mixing during early epiboly in the zebrafish embryo. *Dev Genetics* 17, 6 - 15.
- Wright, M.R. (1947) Regeneration and degeneration experiments on lateral line nerves and sense organs in anurans. *J. exp. Zool.* 105, 221 - 257.
- Wright, M.R. (1951) The lateral line system of sense organs. *Q Rev Biol* 26, 264 - 280.
- Woo, K. und Fraser, S.E. (1995) Order and coherence in the fate map of the zebrafish nervous system. *Development* 121, 2595 - 2609.
- Xu, P.X., Adams, J., Peters, H., Brown, M.C., Heaney, S., Maas, R. (1999) *Eyal* deficient mice lack ears and kidneys and show abnormal apoptosis of organ primordia. *Nat. Genet.* 23, 113 - 117.
- Zakon, H. (1988) The electroreceptors: Diversity in structure and function. In "Sensory Biology of Aquatic Animals". (Atema, J, Fay, R.R., Popper, A.N., und Tavolga, W.N., Hrsg.) Springer Verlag 813 - 850.
- Zottoli, S.J. und Van Horne, C. (1983) Posterior lateral line afferent and efferent pathways within the central nervous system of the goldfish with special reference to the Mauthner cell. *J Comp Neurol* 219, 100 - 111.

Anhang

6. Anhang

I. Verteilung der primären Neuromasten (L1 - L5) entlang der rostro-caudalen Achse

Neuromast	Position (intersomitische Grenze)	Anzahl
L1	3/4	2
	4/5	15
	5/6	45
	6/7	10
	7/8	3
		Total = 75
L2	7/8	6
	8/9	2
	9/10	8
	10/11	20
	11/12	14
	12/13	16
	13/14	3
		Total = 69
L3	10/11	1
	11/12	1
	12/13	3
	13/14	8
	14/15	27
	15/16	12
	16/17	16
	17/18	4
	18/19	3
		Total = 75
L4	13/14	1
	15/16	1
	16/17	1
	17/18	5
	18/19	17
	19/20	16
	20/21	21
	21/22	8
	22/23	2
	23/24	2
	Total = 74	
L5	21/22	2
	22/23	7
	23/24	14
	24/25	18
	25/26	18
	26/27	10
	27/28	1
	Total = 70	

Anhang

II. Zählung der Mitosen und Apoptosen in 30 hpf und 45 hpf Embryonen

WT	30 hpf	anti-phospho Histon-Färbung (H3) Anzahl mitotisch aktiver Zellen in jeweiliger Struktur				
#		Neuromast	Proneuromast	Primordium	gesamt	Prim II
1		--	--	--	--	n. gesichtet
2		--	--	--	--	n. gesichtet
3		--	--	--	--	n. gesichtet
4		--	2	--	2	n. gesichtet
5		1	--	--	1	n. gesichtet
6		1	--	1	2	n. gesichtet

WT	45 hpf	anti-phospho Histon-Färbung (H3) Anzahl mitotisch aktiver Zellen in jeweiliger Struktur				
#		Neuromast	Proneuromast	Primordium	gesamt	Prim II
1		1; 3	1	--	5	n. gesichtet
2		1; 1	--	--	2	n. gesichtet
3		--	--	4	4	n. gesichtet
4		1; 1	--	2	4	n. gesichtet
5		1	--	1	2	n. gesichtet
6		1; 1; 1; 2	--	--	5	n. gesichtet

WT	32 hpf	Tunel-Färbung Anzahl apoptotischer Zellen in jeweiliger Struktur				
#		Neuromast	Proneuromast	Prim I	gesamt	Prim II
1		4	--	--	4	1 (0/1)
2		3	--	--	3	2 (0)
3		5	--	--	5	n. gesichtet
4		3	--	--	3	n. gesichtet
5		3	--	--	3	n. gesichtet
6		1	--	--	1	n. gesichtet

WT	45 hpf	Tunel-Färbung Anzahl apoptotischer Zellen in jeweiliger Struktur				
#		Neuromast	Proneuromast	Prim I	gesamt	Prim II
1		2	--	-- (30/31)	2	n. gesichtet
2		2; 4; 1	--	-- (26/27)	7	n. gesichtet
3		2; 2; 1	--	-- (31/32)	5	-- (2/3)
4		1; 2; 1	--	-- (33/34)	4	-- (2/3)
5		3; 4; 6; 3	--	-- (32/33)	16	-- (2)
6		1; 1; 1; 2	--	-- (32/33)	5	-- (2)
7		2; 1; 2; 2; 2	--	-- (33/34)	9	-- (1/2)
8		3; 1; 1; 3	--	-- (31/32)	8	n. gesichtet

Anhang

III. Zählung der Neuromasten, gesamt vom 2. bis 8. Tag der Entwicklung

2 dpf		3 dpf		4 dpf		5 dpf		6 dpf		7 dpf		8 dpf	
L	R	L	R	L	R	L	R	L	R	L	R	L	R
4	3	6	8	10	10	10	11	11	10	14	13	12	9
2	2	6	6	11	9	10	10	10	11	11	12	12	12
1	2	7	6	11	10	10	10	8	8	11	9	13	13
3	2	6	7	10	10	11	10	9	11	11	10	13	15
77	5	8	7	11	11	10	9	13	11	13	13	12	11
2	3	7	7	10	10	12	12	10	12	12	13	15	13
1	1	6	7	9	10	11	11	10	10	11	12	11	11
2	2	7	6	9	9	11	9	12	10	13	13	13	12
3	4	7	8	9	9	10	10	10	9	12	11	13	16
2	3	7	9	8	9	11	12	11	13	11	11	10	12
3	3	8	8	10	10	9	10	12	12	11	11	11	11
4	5	7	8	9	11	11	8	12	11	9	11	14	12
4	5	8	7	10	9	10	9	11	9	9	9	13	12
5	5	6	6	10	10	9	9	11	11	9	11	12	10
6	5	8	8	9	10	9	9	13	13	10	10	11	10
4	5	7	7	8	8	9	9	11	13	12	10	12	9
5	6	9	9	9	9	9	9	10	10	13	11	13	11
6	4	7	8	9	9	10	9	10	11	13	12	13	12
3	3	8	9	11	10	11	12	13	12	10	12	11	11
7	5	8	9	9	8	12	8	10	10	12	13	11	12
4	5	9	9							12	12		
4	4									11	12		
										10	9		
										10	9		
										12	13		
										n = 50			
										_ = 564			
										x = 11,3 ±			
										1,4			
												n = 40	
												_ = 480	
												x = 12 ± 1,5	
n = 44 _ = 164 x = 3,73 ± 1,56		n = 42 _ = 311 x = 7,4 ± 1,01		n = 40 _ = 383 x = 9,6 ± 0,87		n = 40 _ = 399 x = 9,97 ± 1,07		n = 40 _ = 434 x = 10,85 ± 1,35		n = 50 _ = 564 x = 11,3 ± 1,4		n = 40 _ = 480 x = 12 ± 1,5	

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
Mean	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
SD	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
n	2	2	3	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Mean	2.4	± 0.1	± 0.0	± 0.5	± 0.6	± 0.5	± 0.1	± 0.4	± 0.8	± 0.4	± 0.5	± 0.4	± 0.4
SD	0.4	0.1	0.0	0.6	0.5	0.1	0.4	0.8	0.4	0.5	0.4	0.4	0.4
n	2	1	1	3	1	1	1	1	1	1	1	1	7
Mean	3.0	± 0.7	± 0.6	± 0.7	± 0.6	± 0.5	± 0.7	± 0.8	± 0.7	± 0.8	± 0.7	± 0.8	± 0.7
SD	0.4	0.2	0.2	0.2	0.1	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2
n	3	1	1	6	1	1	1	1	1	1	1	1	4
Mean	4.0	± 0.9	± 0.6	± 0.8	± 0.6	± 0.5	± 0.6	± 0.8	± 0.7	± 0.8	± 0.7	± 0.8	± 0.7
SD	0.2	0.6	0.4	0.4	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2
n	4	1	1	9	1	1	1	1	1	1	1	1	5
Mean	5.0	± 1.0	± 0.6	± 0.8	± 0.6	± 0.5	± 0.6	± 0.8	± 0.7	± 0.8	± 0.7	± 0.8	± 0.7
SD	0.2	0.6	0.4	0.4	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2
n	4	1	1	9	1	1	1	1	1	1	1	1	8
Mean	6.0	± 1.0	± 0.6	± 0.8	± 0.6	± 0.5	± 0.6	± 0.8	± 0.7	± 0.8	± 0.7	± 0.8	± 0.7
SD	0.2	0.6	0.4	0.4	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2
n	4	1	1	9	1	1	1	1	1	1	1	1	5
Mean	7.0	± 1.0	± 0.6	± 0.8	± 0.6	± 0.5	± 0.6	± 0.8	± 0.7	± 0.8	± 0.7	± 0.8	± 0.7
SD	0.2	0.6	0.4	0.4	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2
n	4	1	1	9	1	1	1	1	1	1	1	1	9
Mean	8.0	± 1.0	± 0.6	± 0.8	± 0.6	± 0.5	± 0.6	± 0.8	± 0.7	± 0.8	± 0.7	± 0.8	± 0.7
SD	0.2	0.6	0.4	0.4	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2
n	4	1	1	9	1	1	1	1	1	1	1	1	4
Mean	9.0	± 1.0	± 0.6	± 0.8	± 0.6	± 0.5	± 0.6	± 0.8	± 0.7	± 0.8	± 0.7	± 0.8	± 0.7
SD	0.2	0.6	0.4	0.4	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2
n	4	1	1	9	1	1	1	1	1	1	1	1	6
Mean	10.0	± 1.0	± 0.6	± 0.8	± 0.6	± 0.5	± 0.6	± 0.8	± 0.7	± 0.8	± 0.7	± 0.8	± 0.7
SD	0.2	0.6	0.4	0.4	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2

**IV. DASPEI-Färbungen - Zählung der Haarsinneszellen
(Mittelwerte +Standartabweichung)**

Anhang

V. Lage des Primordium2 entlang der rostro-caudalen Körperachse

3 dpf	5 dpf	9 dpf	12 dpf (Somit)
12	15	16	20
13	16	17	20
11	18	17	19
11	17	17	21
12	16	16	18
12	16	16	20
12	15	15	19
12	16	16	18
12	14	18	18
12	13	18	18
12	15	16	19
11	15	17	17
12	16	17	$\bar{x} = 227$ $n = 12$ $x = 18,9 \pm 1,2$
12	16	17	
11	15	17	
12	14	16	
12	14	14	
13	14	14	
13	$\bar{x} = 275$ $n = 18$ $x = 15,3 \pm 1,2$	16	
12		17	
12		18	
$\bar{x} = 251$ $n = 21$ $x = 11,95 \pm 0,6$		17	
		17	
		18	
		18	
		17	
		15	
		17	
	16		
15			
16			
		$\bar{x} = 511$ $n = 31$ $x = 16,5 \pm 1,09$	

Anhang

VI. Injektionskoordinaten der zur Auswertung gekommenen Embryonen der #1 Experimentserie: Neuralplattenstadien (2.Somiten)

#	Alter (s o m m)	#	Positi on		Flu	Primord ium				Epd/ andere
			R/ C - M/ L	L / R		N m H z	N m S z	Sc h Z	s N	
# 1	2	2	35 / +1 0	R	R D A					Epd, Dotter
# 2	2	2	46 / ± 0	R	R D A					Epd, dorsal < 1.S
# 3	2	1	50 / - 16	R	R D A					Epd, Dotter , aH 3.S
# 4	2	3	45 / -4	R	R D A					Epd, aH 1.S
# 5	2	1	50 / - 10	R	R D A					Epd, aH 6.S
# 6	2	1	30 / -4	R	R D A					NR, l+r, dorsal , 1.S- otv
# 7	2	1	50 / ± 0	R	R D A	+	+			
# 8	2	1	34 / ± 0	R	R D A					NR, d, 1.s- otv
# 9	2	1	35 / +1 4	R	R D A					< otv, obfl.
# 10	2	2	28 / - 40	R	R D A					NR, aH 7.S
# 11	2	7	18- / 22 8/ 13- 18	R	R D A					NR, aH 3.- 4.S
# 12	2	2	28 / - 25	R	R D A					NR, r+l (4Z) dorsal

Anhang

									aH 7./8.S
# 1 3	2	2	15 /- 22	R	R D A				NR, l+r, aH 5.S (~5Z)
# 1 4	2	2	30 /- 10	R	R D A				NR, r, (3Z)
# 1 5	2	1	36 /+5	R	R D A				Epd, dorsal
# 1 6	2	2	35 /± 0	R	R D A				Z + Axon (Brust flosse ninner vierun g?)
# 1 7	2	2	34 /± 0	R	R D A				Wie oben, Z unterh alb horiz. Myos. , am Rand z. Dotter
# 1 8	2	1	34 /-4	R	R D A				Epd, Dotter
# 1 9	2	2	24 / +1	R	R D A				NR, aH 1.S, pallisa denart . Klön (4 Z)
# 2 0	2	3	26 /-5	R	R D A				NR aH 3.S
# 2 1	2	2	32 /-6	R	R D A				Brustf lossen saum
# 2 2	2	2	34 /-5	R	R D A				NR aH 1.S pallisa denart . Klön (4 Z)
#	2	2	40	R	R				Brustf

Anhang

2 3		/ -7		D A					lossen saum
# 2 4	2	1 15 / +1 0	R	R D A					NR, dorsal , r, Rhom b. (2 Z)
# 2 5	2	1 28 / ± 0	R	R D A			+		
# 2 6	2	1 22 / +5	R	R D A					NR, dorsal , Rhom b., nahe otv.
# 2 7	2	3 20 / +8	R	R D A					NR, dorsal , Rhom b., r, (3 Z)
# 2 8	2	3 20 / +1 0	R	R D A					NR, dorsal , Rhom b., l+r hinter otv., (4 Z)
# 2 9	2	2 18 / ± 0	R	R D A					NR, Rhom b., r, (1 Z)
# 3 0	2	2 16 / +3	R	R D A					NR, Rhom b.
# 3 1	2	2 24 / ± 0	R	R D A					NR, Rhom b., < 1.S, l+r
# 3 2	2	1 35 / ± 0	R	R D A				+ Ax on e h M	
# 3 3	2	1 32 / +8	R	R D A	+	+			
# 3 4	2	1 25 / +4	R	R D A					Pigme ntzelle

Anhang

# 3 5	2	1 26 / -6	R	R D A					Brustf losse, Epd.
# 3 6	2	3 34 / ± 0	R	R D A					Epd., Dotter , aH 1.S
# 3 7	2	1 30 / +6	R	R D A					NR, dorsal , Rhom b., l+r
# 3 8	2	2 38 / -3	R	R D A					Epd., aH 1.S- otv., dorsal +Dott er
# 3 9	2	1 45 / ± 0	R	R D A					Epd., aH 1.S, Brustf losse
# 4 0	2	2 27 / ± 0	R	R D A					Pigme ntzelle n (2) auf Rhom b., + Brustf losse
# 4 1	2	1 20 / -2	R	R D A					NR, dorsal , aH 1.S, l+r,
# 4 2	2	1 25 / -7	R	R D A					NR, aH 2.S, r, (4 Z)
# 4 4	2	1 30 / ± 0	R	R D A					Epd., aH 1.s- otv.
# 4 5	2	1 24 / +4 0	R	R D A					Otv, ant/ve ntr
# 4 6 a, b	2	1 35 / +1 1 35 / ± 0 40 / /	R	R D A	+	+	+		

Anhang

			+6						
# 4 7	2	1	16 / +4	R	R D A				NR, r
# 4 8	2	1	20 /+1 6	R	R D A				NR, Rhom b., r (1 Z)
# 4 9	2	1	27 /+1 2	R	R D A	+	+		pIIP (3Z)
# 5 0	2	1	30/ -5	R	R D A				Epid. aH 2.som, dorsal
# 5 1	2	1	30/ +5	R	R D A	+	+		pIIP + Epid.
# 5 2	2/ 3	2	25/ +1 0	R	R D A				Epid. Zw otv-1- som, Dotter
# 5 3	2	1	22/ +2	R	R D A				ZNS, (2Z) + Axone , + 2 dorsal e Nm
# 5 4	2	1	18/ +7	R	R D A				ZNS, L+R, zw otv- 1.som
# 5 5	2	1	30/ +1 4	R	R D A				Epid.
# 5 6	2	1	24/ +6	R	R D A				otves (2Z)
# 5 7	2	1	28/ +1 2	R	R D A				Epid. (2 Z), postot isch
# 5 8	2	1	32/ -3	R	R D A			+	pIIP (1Z)
# 5 9	2	1	28 / ± 0	R	R D A			+	
# 6 0	2	1	24 / ± 0	R	R D A				Epid. postot isch, + Dotter

Zusammenfassung

Die posteriore Rumpflinie des Seitenliniensystems im Zebrafisch besteht im frühen Embryonalstadium aus einer geringen Anzahl von Sinnesorganen, die entlang der Flanken des Tieres in regelmäßigen Abständen positioniert liegen. Untersuchungen an Amphibien und verschiedenen Fischarten haben übereinstimmend ergeben, dass die frühen Sinnesorgane aus einem entlang der Rumpfmittellinie wandernden Primordium entstehen, das seinen Ursprung im Plakodengewebe des Kopfektoderms hat.

Eine transgene Linie (H2A/F.Z:GFP) ermöglichte eine detaillierte und anschauliche Darstellung des sehr dynamischen Prozesses auf zellulärer Ebene, der zur Bildung der primären Sinnesorgane führt. Weiterführende Untersuchungen konzentrierten sich auf den Ausbau des frühen embryonalen Systems zur postembryonalen Laterallinie. Es konnte gezeigt werden, dass in jungen Larvenstadien die Anzahl der Sinnesorgane schnell zunimmt und sekundäre Neuromasten in einem von anterior nach posterior gerichteten Prozess zu der bestehenden Linie addiert werden. Mit Hilfe der gleichen Beobachtungstechnik wurde ein weiteres Primordium identifiziert und charakterisiert, das sekundäre Neuromasten in die Zwischenräume der primären Sinnesorgane ablegt. Die Verdopplung primärer und sekundärer Neuromasten scheint ebenfalls an der Bildung neuer Sinnesorgane innerhalb der untersuchten Rumpflinie beteiligt zu sein.

Zellmarkierungsexperimente mit dem Fluoreszenzfarbstoff RDA sollten Aufschluss über die ontogenetische Herkunft beider Primordien und der Beteiligung unterschiedlicher Zelltypen an der Bildung der Laterallinie geben. Zellen des Primordiums konnten drei unterschiedliche Zelltypen hervorbringen: Haarsinneszellen und Stützzellen der Neuromasten sowie *Schwann*-Zellen, ein Gliazelltyp, der die Myelinscheiden des posterioren Lateralliniennervs bildet. Die Untersuchungen legen nahe, dass Haar- und Stützzellen der Neuromasten aus gemeinsamen Vorläuferzellen hervorgehen, Gliazellen des Seitenliniensystems dagegen aus eigenen Vorläuferzellen gebildet werden. Der Ursprung des Primordiums konnte innerhalb der postotischen Plakode lokalisiert werden, die vermutlich auch die Vorläuferzellen des zweiten Primordiums umfasst. Weiterhin werfen die gewonnenen Daten die Frage auf, ob Neuralleistenzellen ebenfalls an der Bildung von *Schwann*-Zellen beteiligt sind.

Abstract

The main trunk line of the zebrafish embryonic posterior lateral line system is comprised of a small number of single sense organs that are arranged in a defined pattern on the surface of the body. Earlier investigations on amphibians and several fish species agree in their observations, that a migrating primordium gives rise to the primary neuromasts of the body line. Its origin lies in the head placodes and moves along each flank of the fish towards the tip of the tail.

With the help of the H2A/F.Z:GFP transgenic line, we could demonstrate the dynamic processes which lead to the establishment of the embryonic lateral line system on a cellular level. DASPEI vital stainings allowed us to observe the generation of additional sense organs in between the primary neuromasts. Furthermore, we could identify and characterize a second primordium that gives rise to the secondary neuromasts in H2A/F.Z:GFP larvae. Additional organs apparently evolve through duplications of already existing neuromasts.

Cell labelling experiments were performed to clarify the origin of both primordia and to detect a possible clonal relationship between different cell types within the lateral line. This revealed that the primordium generates three specific cell types: sensory haircells and supporting cells of the neuromasts and *Schwann* cells, glia cells which lie close to the lateral line nerve and produce myelin sheets.

The data suggest that hair and supporting cells develop from a common progenitor, while glia cells seem to emerge from a separate cell line. The question of the involvement of neural crest cells in the generation of *Schwann* cells, however, remains unclear. The origin of the first primordium lies within a defined region of the postotic ectoderm and may also comprise the progenitor cells of the second primordium.

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 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 José Campos-Ortega betreut worden.

Lebenslauf

Name: Anne Groth

Geburtsdatum/ -ort: 16.06.1971 in Osterode am Harz

Schulbildung:

1977 - 1981 Grundschule Astfeld
1981 - 1983 Orientierungsstufe Langelsheim
1983 - 1987 Realschule Goslar
1987 Mittlere Hochschulreife
1987 - 1988 Christian-von-Dohm Gymnasium Goslar
1988 – 1989 Auslandsaufenthalt in Rochester, New Hampshire, USA
1989 - 1992 Christian-von-Dohm Gymnasium Goslar
1992 Abitur

Studium:

1992 – 1994 Grundstudium der Biologie an der Albert-Ludwigs-Universität Freiburg (i.Brg.)
1994 Vordiplom
1994 – 1996 Hauptstudium der Biologie an der Albert-Ludwigs-Universität Freiburg
1996 Studienplatzwechsel von Freiburg nach Köln
1996 – 1997 Hauptstudium der Biologie an der Universität zu Köln
1997 – 1998 Diplomarbeit unter Betreuung von Prof. Dr. J. A. Campos-Ortega am Institut für Entwicklungsbiologie der Universität zu Köln mit dem Titel: „Morphologische Untersuchungen zur Augenentwicklung beim Zebrafisch (*Danio rerio*): Kartierung der Augenanlage“

Promotion:

1998 – 2002 Anfertigung der vorliegenden Dissertation unter Betreuung von Prof. Dr. J. A. Campos-Ortega am Institut für Entwicklungsbiologie der Universität zu Köln

Berufliche Tätigkeit:

1994 – 1995 Wissenschaftliche Hilfskraft am Institut für Biologie 2 (Botanik) der Albert-Ludwigs-Universität Freiburg
1997 – 1998 Studentische Hilfskraft am Institut für Entwicklungsbiologie der Universität zu Köln
1998 – 1999 Wissenschaftliche Hilfskraft am Institut für Entwicklungsbiologie der Universität zu Köln
seit 1999 wissenschaftliche Mitarbeiterin am Institut für Entwicklungsbiologie der Universität zu Köln

Köln, November 2002

Danksagung

Diese Arbeit wurde am Institut für Entwicklungsbiologie der Universität zu Köln angefertigt. Ich danke meinem Doktorvater, Herrn Prof. Dr. José A. Campos-Ortega, für die Überlassung des Themas und die Bereitstellung des Arbeitsplatzes. Seine stete Diskussionsbereitschaft, die zahlreichen und wertvollen Anregungen sowie die kritische Auseinandersetzung im Praktischen und Theoretischen waren mir eine angenehme und hilfreiche Unterstützung.

Danken möchte ich auch Herrn Prof. Dr. Siegfried Roth für die Übernahme des Zweitgutachtens.

Ein besonderer Dank geht an Isa, die mich mit viel Geduld und ruhiger Hand in die Kunst des Injizierens und in die Grundlagen der Neurogenese eingeführt hat.

Ich danke Christel für alle histologischen Färbungen und Flachpräparationen, ohne die diese Arbeit nicht zustande gekommen wäre.

Ganz besonders danken möchte ich Iris, deren tatkräftige Hilfestellungen und wertvolle Tipps mir nicht nur bei der Lösung molekularbiologischer Fragen weitergeholfen haben. André und Benedikt waren einfach unersetzlich bei der immer hilfsbereiten Beantwortung unzähliger FAQs im Bereich Technik, Computer & Optik.

Unvergesslich bleiben wohl die anregenden Labordiskussionen mit Stefan und Benedikt, Marcs vorweihnachtliche Christstollen, Stefans` „Traumküsse“, Nicos grausam vorgetragene Kinderlieder, Klausens Pilzgeschichten und die geselligen Mensarunden.

Ich danke meinen derzeitigen und ehemaligen Kollegen für die außergewöhnlich freundschaftliche Arbeitsatmosphäre.

Ich danke Hilary und Sylke, Markus, Paul und Katrin für ihren Rat und die konstruktive Kritik zu dieser Arbeit und für die erlebnisreichen und fröhlichen Stunden, die ich mit ihnen bisher verbringen durfte und die mir über so manche Durststrecke hinweghelfen konnten.

Mein allergrößter Dank jedoch gilt meinen Eltern, die mir die Biologie schon vor langer Zeit anvertraut haben. Mit großer Freude und erstaunlicher Ausdauer waren sie bereit, nicht enden wollende Fragen zu beantworten. Ihr Interesse und ihre vielfältige Unterstützung über die Jahre hinweg sind für mich von unschätzbarem Wert.