

Gliogenese

Entwicklung embryonaler Gliazellen in *Drosophila*

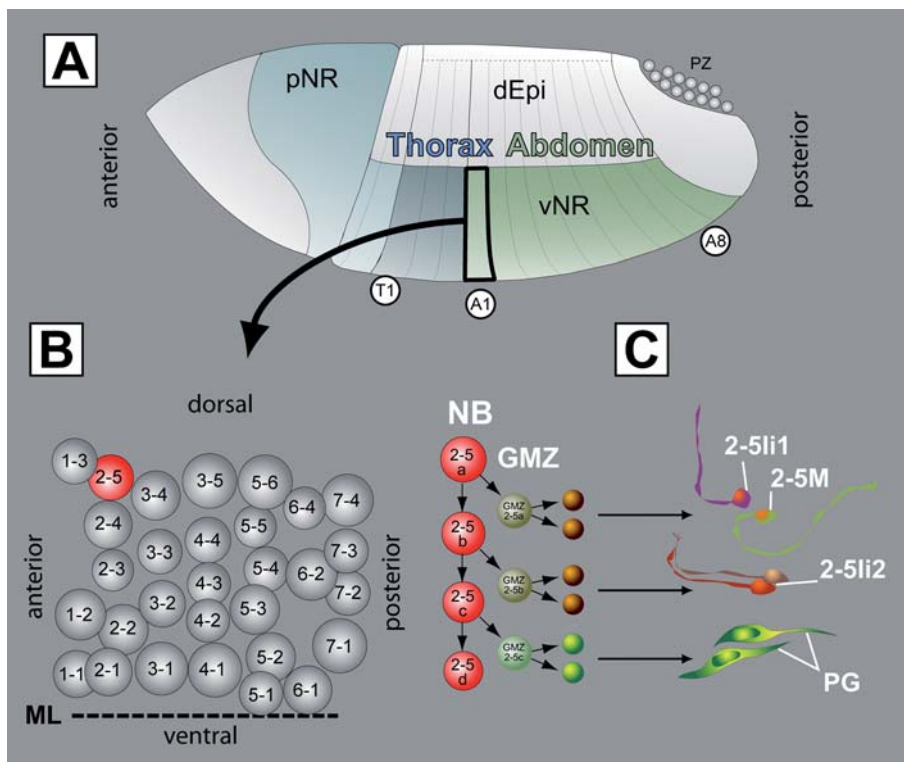
BENJAMIN ALTENHEIN UND GERHARD TECHNAU
 INSTITUT FÜR GENETIK, JOHANNES GUTENBERG-UNIVERSITÄT, MAINZ

Die Nervensysteme der Wirbeltiere und wirbelloser Tiere wie etwa der Insekten bestehen aus reizleitenden Neuronen und den sie umhüllenden Gliazellen. Die Klärung der Entstehung der enormen Vielfalt an neuronalen und glialen Zelltypen und ihrer präzisen räumlichen Anordnung im Nervensystem stellt eine große Herausforderung an die Neuroentwicklungsbiologie dar. Obwohl bereits um 1850 von Rudolf Virchow als unabhängige Elemente im Nervensystem beschrieben, wurden Gliazellen über geraume Zeit in der Neurobiologie wenig beachtet. Erst seit einigen Jahrzehnten rücken Gliazellen mehr und mehr in den Fokus der Forschung, sodass das Wissen sowohl um die Entwicklung als auch die vielfältigen Funktionen von Gliazellen stetig wächst. Das Modellsystem *Drosophila melanogaster* bietet ideale Voraussetzungen, die genetischen und molekularen Grundlagen glialer Entwicklungsprozesse (Spezifizierung, Differenzierung, Wanderung) auf der Ebene identifizierter Zellen zu untersuchen.

■ Im *Drosophila*-Embryo delaminieren im Anschluss an die Gastrulation pro thorakalem bzw. abdominalem Hemisegment ca. 30 neurale Vorläuferzellen, die Neuroblasten (NBs), aus dem ventralen Neuroektoderm ins Innere des Embryos (**Abb. 1**). Positionelle Information sowohl entlang der anterior-posterioren als auch der dorso-ventralen Achse des Neuroektoderms determiniert die Identität jedes einzelnen NB^[1, 2] und legt damit den Zellstammbaum fest, den dieser produzieren wird^[3, 4]. Die meisten NBs bringen ausschließlich Neurone hervor. Sieben NBs generieren gemischte Zellklone aus Neuronen und Gliazellen, und nur ein NB bildet einen rein glialen Zellklon. Neben den NBs gibt es neuronale und gliale Vorläuferzellen der Mittellinie des Zentralen Nervensystems, die besondere Eigenschaften besitzen und hier nicht weiter erwähnt werden.

Gliale Gene

Es wird allgemein angenommen, dass bei der Fruchtfliege das Grundschicksal einer Zelle im sich entwickelnden Nervensystem neuronal ist. Dieses Schicksal kann durch Expression eines „Schaltergens“ in gliales Schick-



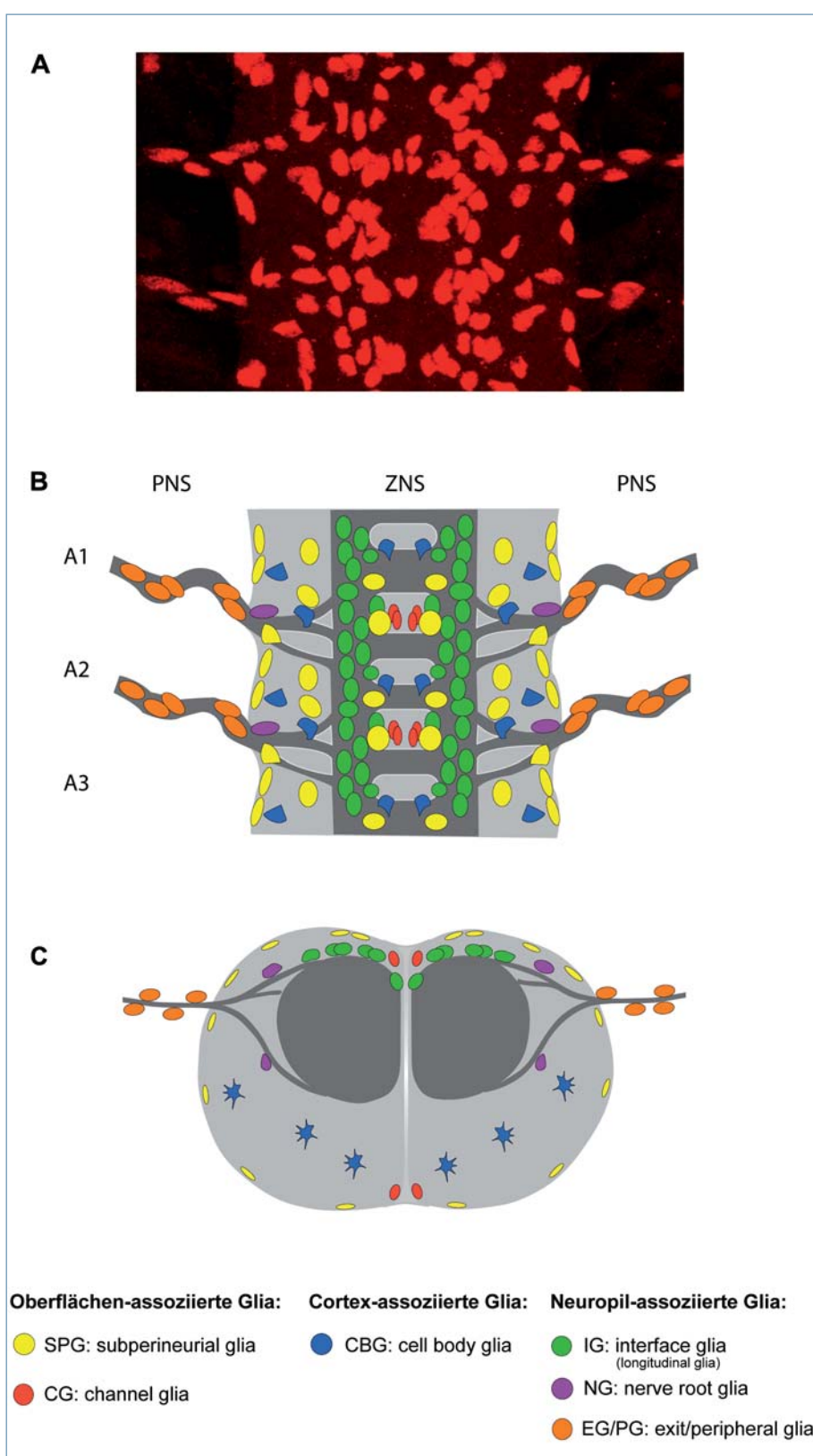
◀ **Abb. 1:** Entstehung und Teilung neuraler Stammzellen im *Drosophila*-Embryo. **A,** Anlagenskizze des frühen Gastrulastadiums, neurogene Regionen des Ektoderms farblich hervorgehoben. Nach der Gastrulation delaminieren aus der ventralen neurogenen Region (vNR) neurale Stammzellen, aus denen das spätere Bauchmark entsteht. **B,** Diese Neuroblasten (NB) erhalten bereits im Neuroektoderm über ihre Position entlang der anterior-posterioren sowie der dorso-ventralen Achse eine individuelle Identität. **C,** Jeder NB (hier NB 2-5) generiert einen für ihn typischen Zellstammbaum. Mittels asymmetrischer Teilungen produziert er eine Reihe von Gangliemutterzellen (GMZ), die sich wiederum teilen und individuelle Neurone (2-5li1, 2-5M etc.) und/oder Gliazellen (PG) generieren. Mit wenigen Ausnahmen sind die generierten Zellstammbäume seriell homologer NBs in den thorakalen und abdominalen Segmenten gleich.

sal umgewandelt werden. Im Embryo stellt das Gen *glial cells missing (gcm)* ein solches Schaltergen dar^[5, 6]. *gcm* wird in allen embryonalen Gliazellen außer den Mittellinien-Glia exprimiert. Es konnte gezeigt werden, dass die Kontrolle der Expression von *gcm* auf dem Niveau einzelner Stammzellen erfolgt und somit in ähnlicher Weise reguliert wird wie die Identität der Stammzelle selbst^[7, 8]. *gcm* kodiert für einen Transkriptionsfaktor, der die Expression eines weiteren pan-glialen Transkriptionsfaktors, *Reversed polarity (Repo)*, aktiviert. Repo ist involviert in die Kontrolle glialer Differenzierungsprozesse^[9]. Es sind weitere Gene bekannt, die von Gcm und Repo aktiviert werden, jedoch sind die genauen molekularen Mechanismen der Spezifizierung und Differenzierung innerhalb der Gliazellpopulation bislang noch weitgehend unklar.

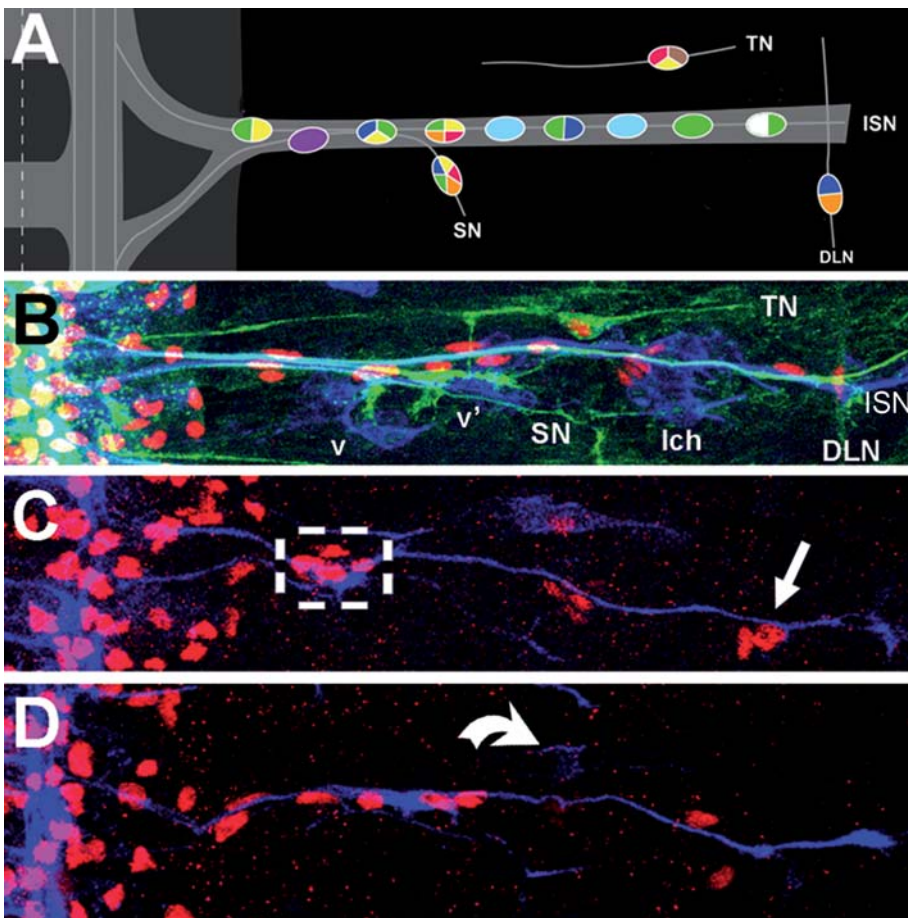
In den letzten Jahren wurden drei Versuche unternommen, mithilfe der Mikroarray-Technologie sowie bioinformatischer Methoden weitere von Gcm regulierte Faktoren zu identifizieren, die im Verlaufe der Gliogenese exprimiert werden^[10-12]. Alle Ansätze haben eine größere Zahl von Zielgenen hervorgebracht, deren spezifische Funktionen bei der glialen Entwicklung nun zu klären sind. Es stellte sich heraus, dass die Mehrzahl der gliaspezifischen Gene nicht in allen Gliazellen zur Expression kommt, sondern nur in Subpopulationen von Zellen. Darüber hinaus wird die Mehrzahl dieser Faktoren erst relativ spät während der Embryonalentwicklung aktiviert; sie spielen daher vermutlich keine Rolle bei der glialen Spezifizierung oder frühen Differenzierung. Derartige Faktoren können beispielsweise zur korrekten Funktionalität der entsprechenden Subpopulation beitragen, wie am Gen *moody* gezeigt werden konnte^[13]. *moody* kodiert für einen G-Protein gekoppelten Rezeptor, welcher in einer Subpopulation, den Oberflächen-assoziierten (subperineurialen) Gliazellen, exprimiert wird und in diesen für die korrekte Bildung der Blut-Hirn- bzw. Blut-Nerven-Schranke verantwortlich ist.

Klassifizierung der *Drosophila*-Glia

Warum werden die meisten dieser Gene nur in Subpopulationen glialer Zellen exprimiert? Die geschilderten Ergebnisse lassen den Schluss zu, dass Gliazellen im Nervensystem von Insekten verschiedene Klassen umfassen, die unterschiedliche Funktionen ausüben. Es ist bislang gänzlich ungeklärt, wie diese Subpopulationen spezifiziert werden



▲ **Abb. 2:** Gliazellen im embryonalen Nervensystem. **A,** Mithilfe eines gegen den glia-spezifischen Transkriptionsfaktor Repo gerichteten Antikörpers lassen sich die Zellkerne aller lateralen Gliazellen des zentralen und peripheren Nervensystems (ZNS und PNS) im *Drosophila*-Embryo sichtbar machen. Aufgrund ihrer Position und Morphologie werden die Zellen in Subgruppen unterteilt. **B,** horizontale Ansicht zweier Neuromere des Bauchmarks. **C,** frontale Ansicht. Mit unterschiedlichen molekularen Markern lassen sich sowohl die Subtypen als auch die einzelnen Gliazellen voneinander unterscheiden.

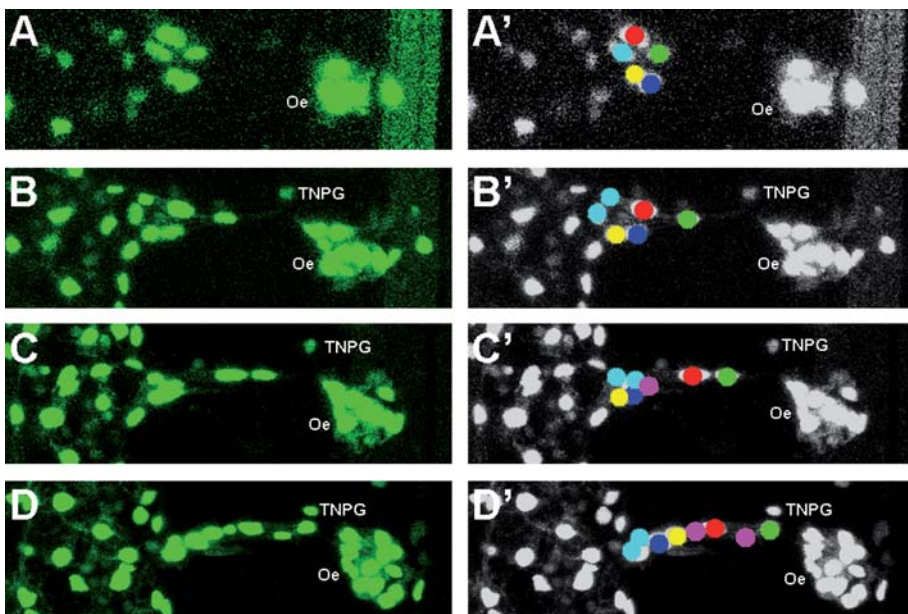


▲ **Abb. 3:** Die Gliazellen des peripheren Nervensystems. **A,** Die peripheren Gliazellen können aufgrund unterschiedlicher Expression von Markergenen (Farbcode) individuell identifiziert werden (bislang unveröffentlichte Daten). **B,** abdominales Hemisegment des Wildtyps. Die peripheren Gliazellen (rote Zellkernfärbung) sind deutlich mit den verschiedenen peripheren Nerven assoziiert: Sinnesorgane und sensorische Neurone (blau), Axone von Motorneuronen (grün). Mutanten mit Defekten im Muster der peripheren Glia: **C,** Wanderungsdefekte ventraler (gestrichelt) und dorsaler peripherer Glia (Pfeil). **D,** Fehlen der mit dem Transversalnerv assoziierten Glia (Pfeil). DLN: Dorsolateralnerv, ISN: Intersegmentalnerv, Ich: laterales Chordotonalorgan, SN: Segmentalnerv, TN: Transversalnerv, v und v': ventrale Cluster sensorischer Neurone

und ob es sich hierbei im Vergleich zu den unterschiedlichen Gliazelltypen im Nervensystem der Wirbeltiere um homologe oder analoge Zellen handelt. Aufgrund morphologischer und positioneller Kriterien lassen sich die Gliazellen in *Drosophila* drei übergeordneten Klassen zuordnen (**Abb. 2**): Oberflächen-assoziierte Glia, Kortex-assoziierte Glia und Neuropil-assoziierte Glia^[14]. Gibt es für eine solche Einteilung eine molekulare Grundlage? Wir konnten mithilfe einer größeren Zahl an zellspezifischen molekularen Markern sämtliche Gliazellen des *Drosophila*-Embryos eindeutig unterscheiden und anhand der Expressionsmuster dieser Marker die oben beschriebene Klassifizierung der Gliazellen molekular bestätigen (unveröffentlichte Daten). Diese Marker repräsentieren sowohl potenzielle, in der Gliogenese involvierte Kandidatengene als auch wichtige Werkzeuge, um bei der phänotypischen Analyse von Mutanten und Missexpressions-Experimenten z. B. den Einfluss bestimmter Musterbildungsgene auf die Spezifizierung glialer Subtypen untersuchen zu können.

Periphere Glia

Einer weiteren Subpopulation von Gliazellen in *Drosophila* lässt sich die periphere Glia (PG) zuordnen, die sich entlang der motorischen und sensorischen Nervenfasern im peripheren Nervensystem befinden und diese umschließen (**Abb. 3A, B**). Die PGs sind allerdings nicht nur für die Isolation der peripheren Nerven verantwortlich, sondern dienen unter anderem während der Entwicklung als Leitstrukturen für die Wachstumskegel sensorischer Neurone^[15]. Die Mehrzahl dieser PGs entstammt zentralen NBS, deren Identitäten mittels Analyse individueller Zellstammbäume bestimmt werden konnte^[3]. Während der Entwicklung des Embryos müs-



◀ **Abb. 4:** Die Wanderung der peripheren Glia verläuft stereotyp. Mit GFP unter der Kontrolle eines zellspezifischen Enhancers lässt sich die Wanderung der peripheren Gliazellen *in vivo* verfolgen. Neben einigen Gliazellen exprimieren auch die lateral positionierten Oenozyten (Oe) das GFP. Die Wanderung der Zellen aus dem ZNS (links im Bild) in die Peripherie (hier in einem abdominalen Hemisegment) wurde am konfokalen Mikroskop über eine Zeitspanne von etwa sieben Stunden verfolgt (bislang unveröffentlichte Daten). In **A-D** sind die verschiedenen peripheren Gliazellen farblich gekennzeichnet. TNPG: mit Transversalnerv assoziierte periphere Glia.

sen diese PGs das Zentrale Nervensystem verlassen und teilweise über weite Strecken zu ihren Zielorten wandern. Da gegen Ende der Embryonalentwicklung immer die gleiche Zahl von PGs an etwa immer den gleichen Positionen im peripheren Nervensystem zu finden sind, müssen diese Zellen nicht nur im Hinblick auf ihre Identität als PG, sondern zusätzlich auch auf Richtung und Ziel ihrer Wanderung spezifiziert werden. Wir haben mithilfe des Gal4-UAS-Systems ein Transgen, das grün fluoreszierende Protein (GFP), in Gliazellen zur Expression gebracht, um im lebenden Fliegen-Embryo das Wanderungsverhalten der Zellen studieren zu können (Abb. 4, unveröffentlichte Daten). Es zeigte sich, dass nicht nur die endgültige Position der einzelnen Zellen reproduzierbar ist, sondern auch ihre Wanderung stereotyp verläuft. Es sind immer die gleichen Zellen, die als Pionierzellen aus dem ZNS auswandern, während andere ihnen zu folgen scheinen. Auch die Assoziation einzelner Zellen mit bestimmten Nervenfasern ist reproduzierbar und offensichtlich abhängig von der Identität dieser Zellen. Mit gezielter Ablation von Zellen soll in weiteren Arbeiten geprüft werden, ob das beobachtete Verhalten zellautonom gesteuert wird, oder ob die Zellen untereinander oder mit anderen Geweben in Kontakt stehen und z. B. Positionsinformationen austauschen.

Die oben beschriebenen transgenen Fliegen haben wir ferner als Ausgangsstamm für eine chemische Mutagenese verwendet, um Mutanten mit Defekten in der Wanderung der PGs zu erzeugen^[16]. Aus etwa 2.500 letalen Mutationen zeigten 2 % eine phänotypische Veränderung der PGs (beispielhaft in Abb. 3 C und D gezeigt). Bei einer der Mutanten, die ein verändertes Wanderungsverhalten der Zellen gegenüber dem Wildtyp zeigten, konnte eine Mutation im *numb*-Gen identifiziert werden. *Numb* spielt unter anderem eine Rol-

le bei der Regulation der Signaltransduktion über den Transmembran-Rezeptor Notch. In Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe von Christian Klämbt (Universität Münster) konnten wir zeigen, dass Zell-Zell-Kommunikation über den Notch-Signalweg für die normale Wanderung der PGs notwendig ist^[17]. Die Ergebnisse legen jedoch den Schluss nahe, dass diese Signalübertragung nicht alleine für die korrekte Wanderung der PGs verantwortlich ist, sondern dass noch weitere Signale beteiligt sind.

Die bislang gewonnenen Erkenntnisse deuten darauf hin, dass selbst im relativ überschaubaren embryonalen Nervensystem der Fruchtfliege die Spezifizierung, Differenzierung und Wanderung der zentralen und peripheren Gliazellen einer komplexen genetischen Kontrolle unterliegt. Innerhalb einer initial als „Glia“ determinierten Population von Zellen werden einzelne Zell-Identitäten spezifiziert, die sich in Verhalten und Funktion unterscheiden. Viele potenziell in diese Prozesse involvierten Kandidatengene sind über genetische Screens identifiziert worden. Zusammen mit den detaillierten Beschreibungen der sich entwickelnden Glia auf der zellulären Ebene und den effizienten methodischen Werkzeugen bietet sich somit in *Drosophila* eine gute Ausgangsposition für eine weit reichende Entschlüsselung der molekularen Mechanismen der Gliogenese auf dem Niveau individuell identifizierter Zellen. ■

Literatur

- [1] Bhat, K. M. (1999): Segment polarity genes in neuroblast formation and identity specification during *Drosophila* neurogenesis. *Bioessays* 21: 472–85.
- [2] Skeath, J. B. (1999): At the nexus between pattern formation and cell-type specification: the generation of individual neuroblast fates in the *Drosophila* embryonic central nervous system. *Bioessays* 21: 922–931.
- [3] Schmidt, H., Rickert, C., Bossing, T., Vef, O., Urban, J., Technau, G. M. (1997): The embryonic central nervous system lineages of *Drosophila melanogaster*. II. Neuroblast line-

ges derived from the dorsal part of the neuroectoderm. *Dev. Biol.* 189: 186–204.

- [4] Bossing, T., Udolph, G., Doe, C. Q., Technau, G. M. (1996): The embryonic central nervous system lineages of *Drosophila melanogaster*. I. Neuroblast lineages derived from the ventral half of the neuroectoderm. *Dev. Biol.* 179: 41–64.
- [5] Jones, B. W., Fetter, R. D., Tear, G., Goodman, C. S. (1995): Glial cells missing: a genetic switch that controls glial versus neuronal fate. *Cell* 82: 1013–1023.
- [6] Vincent, S., Vonesch, J. L., Giangrande, A. (1996): Glial fate commitment and cell fate switch between neurons and glia. *Development* 122: 131–139.
- [7] Ragone, G., Van De Bor, V., Sorrentino, S., Kammerer, M., Galy, A., Schenck, A., Bernardoni, R., Miller, A. A., Roy, N., Giangrande, A. (2003): Transcriptional regulation of glial cell specification. *Dev. Biol.* 255: 138–150.
- [8] Jones, B.W. (2005): Transcriptional control of glial cell development in *Drosophila*. *Dev. Biol.* 278: 265–273.
- [9] Halter, D. A., Urban, J., Rickert, C., Ner, S. S., Ito, K., Travers, A. A., Technau, G. M. (1995): The homeobox gene *repo* is required for the differentiation and maintenance of glia function in the embryonic nervous system of *Drosophila melanogaster*. *Development* 121: 317–332.
- [10] Altenhein, B., Becker, A., Busold, C., Beckmann, B., Hoheisel, J. D., Technau, G. M. (2006): Expression profiling of glial genes during *Drosophila* embryogenesis. *Dev. Biol.* 296: 545–560.
- [11] Egger, B., Leemans, R., Loop, T., Kammermeier, L., Fan, Y., Radimerski, T., Strahm, M. C., Certa, U., Reichert, H. (2002): Gliogenesis in *Drosophila*: genome-wide analysis of downstream genes of glial cells missing in the embryonic nervous system. *Development* 129: 3295–3309.
- [12] Freeman, M. R., Delrow, J., Kim, J., Johnson, E., Doe, C. Q. (2003): Unwrapping glial biology: *Gcm* target genes regulating glial development, diversification, and function. *Neuron* 38: 567–580.
- [13] Schwabe, T., Bainton, R. J., Fetter, R. D., Heberlein, U., Gaul, U. (2005): GPCR signaling is required for blood-brain barrier formation in *Drosophila*. *Cell* 123: 133–144.
- [14] Ito, K., Urban, J., Technau, G. (1995): Distribution, classification, and development of *Drosophila* glial cells in the late embryonic and early larval ventral nerve cord. *Roux's Arch. Dev. Biol.* 204: 284–307.
- [15] Sepp, K. J., Schulte, J., Auld, V. J. (2001): Peripheral glia direct axon guidance across the CNS/PNS transition zone. *Dev. Biol.* 238: 47–63.
- [16] Vef, O., Cleppien, D., Löffler, T., Altenhein, B., Technau, G. M. (2006): A new strategy for efficient in vivo screening of mutagenized *Drosophila* embryos. *Dev. Genes Evol.* 216: 105–108.
- [17] Edenfeld, G., Altenhein, B., Zierau, A., Cleppien, D., Krukkert, K., Technau, G., Klämbt, C. (2007): Notch and *Numb* are required for normal migration of peripheral glia in *Drosophila*. *Dev. Biol.* 301: 27–37.

Korrespondenzadresse:

Dr. Benjamin Altenhein
Prof. Dr. Gerhard M. Technau
Institut für Genetik
Universität Mainz
Saarstraße 21
D-55099 Mainz
Tel.: 06131-3925341
Fax: 06131-3925845
balt@uni-mainz.de
technau@uni-mainz.de

AUTOREN



Benjamin Altenhein

Jahrgang 1970, Biologiestudium an der WWU Münster und der Johannes Gutenberg-Universität Mainz. 1997–2000 Promotion bei Prof. Markl am Institut für Zoologie in Mainz. Seit 2001 wissenschaftlicher Assistent am Institut für Genetik der Universität Mainz mit dem Forschungsschwerpunkt „Entwicklung und Spezifizierung von Gliazellen im *Drosophila* Embryo“.



Gerhard Technau

Studium der Biologie und Chemie (Universität Kiel und Würzburg). 1982 Promotion an der Universität Würzburg. 1987 Habilitation an der Universität Köln. 1988–1989 Heisenberg-Stipendiat (UCSF, USA). Seit 1989 Professor am Institut für Genetik, Universität Mainz.