

**Identifizierung und Charakterisierung glialer Gene
im embryonalen zentralen Nervensystem von
*Drosophila melanogaster***

Dissertation zur Erlangung des Grades
Doktor der Naturwissenschaften

**Am Fachbereich Biologie
der Johannes Gutenberg Universität Mainz**

Angela Becker
geboren am 08. August 1975 in Bad Kreuznach

Mainz, Juli 2006

Dekan:

1. Berichterstatter:

2. Berichterstatter:

Tag der mündlichen Prüfung:

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1. Embryonale Neurogenese bei <i>Drosophila</i>	2
1.2. Das gliale Zellschicksal.....	7
1.3. Klassifizierung von Gliazellen	10
1.4. Funktion von Gliazellen.....	14
1.5. Ziel dieser Arbeit	15
2. Material und Methoden	18
2.1. Modellorganismus <i>Drosophila melanogaster</i>	18
2.1.1. Fliegenzucht.....	18
2.1.2. Fliegenstämme	18
2.1.3. Verwendung von Balancer-Chromosomen	19
2.1.4. Kreuzungen.....	19
2.1.5. Das UAS/Gal4 System	20
2.1.6. Apfelagar-Röhrchen zur Eiablage.....	21
2.1.7. Eiablage	21
2.1.8. Massen-Eiablagen	22
2.1.9. Automatisiertes Sortieren von Embryonen.....	23
2.1.10. Herstellung von Doppel-und Tripelmutanten.....	25
2.2. Microarray-Technologie (DNA-Chips)	27
2.2.1. Der FlyArray.....	28
2.2.2. RNA-Präparation	29
2.2.3. Ethanolische Fällung.....	29
2.2.4. RNA-Gelelektrophorese	30
2.2.5. Northern Blot	30
2.2.6. poly-A ⁺ -Präparation	32
2.2.7. Indirekte Markierungsmethode.....	32
2.2.8. Microarray-Hybridisierung.....	36
2.2.9. Scannen der Microarrays und Bildbearbeitung	38
2.2.10. Benutzung der M-CHiPS-Software.....	39
2.3. Antikörperfärbung	42
2.3.1. Färbung mit Fluoreszenzfarbstoffen	44
2.3.2. Färbung mit alkalischer Phosphatase	44
2.3.3. Färbung mit Meerrettich-Peroxidase.....	45

2.4.	<i>In situ</i> Hybridisierung	46
2.4.1.	Präparation von Plasmid-DNA	47
2.4.2.	Restriktionsverdau.....	48
2.4.3.	DNA-Gelelektrophorese	48
2.4.4.	<i>in vitro</i> Transkription.....	49
2.4.5.	Hybridisierung	50
2.4.6.	„Whole-mount“-Präparate	52
2.4.7.	Filetpräparation	52
2.5.	Geräte und Materialien.....	53
2.5.1.	Lösungen und Puffer	53
2.5.2.	Computer und Software.....	53
3.	Ergebnisse	54
3.1.	Microarray-Screen	54
3.1.1.	Microarray-Kontrollen	54
3.1.2.	Der Gal4-Treiber <i>Mz1060</i>	57
3.1.3.	Ektopische Expression von <i>gcm</i> im Vergleich zum Wildtyp	59
3.1.4.	Automatisiertes Sortieren der <i>gcm</i> -mutanten Embryonen	60
3.1.5.	M-CHiPS-Analyse	63
3.1.6.	Manuelles Filtern der Gen-Listen	65
3.1.7.	Analyse der GOF	66
3.1.8.	Analyse der LOF.....	71
3.1.9.	Antagonistisch regulierte Gene.....	76
3.1.10.	Abhängigkeit der positiven Kandidatengene von <i>gcm</i>	77
3.1.11.	GO-Annotation	82
3.1.12.	Microarray-Daten bekannter Zielgene	83
3.1.13.	Zusammenfassung des Microarray-Screens	84
3.2.	Analyse von Kandidatengen	86
3.2.1.	Zelluläre Charakterisierung	87
3.2.2.	Charakterisierung der GOF-Kandidaten.....	88
3.2.3.	Charakterisierung der LOF-Kandidaten.....	95
3.2.4.	Charakterisierung der Antagonisten.....	101
3.2.5.	Abhängigkeiten der ausgesuchten Kandidaten von <i>gcm</i>	109
3.2.6.	Abhängigkeit der Kandidaten von bekannten glialen Genen	110
3.2.7.	Gcm-Bindestellen (GBS) Suche	112

4. Diskussion	117
4.1. Die Microarray-Analyse.....	117
4.2. Vergleich zu den bereits veröffentlichten Microarray-Analysen	121
4.3. Neue <i>gcm</i> -Zielgene	123
4.4. Funktionelle Annotierung der neuen glialen Gene.....	125
4.5. Analyse ausgewählter Kandidatengene.....	127
4.6. Spezifizierung von Gliazellen	130
4.7. Weiterführende Analysen und Experimente	132
5. Zusammenfassung	134
6. Literaturverzeichnis	136
7. Anhang	143

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1.1	Die Entstehung des ZNS von <i>Drosophila</i>	2
Abbildung 1.2	Entwicklung des ventralen Nervensystems	3
Abbildung 1.3	Segregationswellen der Neuroblasten	5
Abbildung 1.4	Unterscheidung neuraler Vorläuferzellen.....	6
Abbildung 1.5	Binäre Entscheidung des Zellschicksals	7
Abbildung 1.6	Der <i>gcm</i> Locus	8
Abbildung 1.7	Cis-regulatorische DNA-Elemente von <i>gcm</i>	10
Abbildung 1.8	Klassifizierung der Gliazellen.....	12
Abbildung 1.9	Zellstammbäume mit Gliazellen	13
Abbildung 1.10	Stadienübersicht des Microarray-Experimentes.....	17
Abbildung 2.1	Das UAS/Gal4 System nach Brand und Perrimon 1993	21
Abbildung 2.2	Automatisiertes Sortieren von mutanten Embryonen.....	24
Abbildung 2.3	Herstellung der Doppelmutanten.....	26
Abbildung 2.4	Microarray-Technik.....	28
Abbildung 2.5	Indirekte Markierungsmethode	33
Abbildung 2.6	Genepix Bildbearbeitung	39
Abbildung 2.7	MinMax-Filter.....	41
Abbildung 2.8	Darstellung der Korrespondenzanalyse	42
Abbildung 3.1	Expression von <i>Mz1060</i> mit Repo-Doppelfärbung.....	58
Abbildung 3.2	Ektopische Expression von <i>gcm</i> mit <i>Mz1060</i>	59
Abbildung 3.3	Kreuzungsschema der GFP-balancierten Mutanten	61
Abbildung 3.4	Automatisiertes Sortieren von Embryonen.....	62
Abbildung 3.5	Expression der positiv getesteten GOF-Kandidaten.....	70
Abbildung 3.6	Expression der positiv getesteten LOF-Kandidaten	75
Abbildung 3.7	Antagonistisch-regulierte Kandidatengene	76
Abbildung 3.8	Expression der gegensätzlich regulierten Antagonisten	77
Abbildung 3.9	Expression der GOF-Kandidaten in <i>gcm</i> -mutanten Embryonen.....	80
Abbildung 3.10	Expression der LOF-Kandidaten in <i>gcm</i> -mutanten Embryonen.....	81
Abbildung 3.11	Antagonistisch regulierte Kandidaten in <i>gcm</i> -Mutanten	82
Abbildung 3.12	Funktionelle Kategorisierung	83
Abbildung 3.13	Wildtypisches Glia-Schema	88
Abbildung 3.14	Expressionsprofile der GOF-Kandidaten.....	89
Abbildung 3.15	Expression von CG4322	90

Abbildung 3.16	Glia-Schema CG4322.....	91
Abbildung 3.17	Expression von CG15860.....	92
Abbildung 3.18	Glia-Schema CG15860.....	92
Abbildung 3.19	Expression von CG3168.....	93
Abbildung 3.20	Glia-Schema CG3168.....	93
Abbildung 3.21	Expression von CG7433.....	94
Abbildung 3.22	Glia-Schema CG7433.....	94
Abbildung 3.23	Expressionsprofile der LOF-Kandidaten.....	95
Abbildung 3.24	Expression von CG16876.....	96
Abbildung 3.25	Glia-Schema CG16876.....	97
Abbildung 3.26	Expression von CG5080.....	98
Abbildung 3.27	Glia-Schema CG5080.....	98
Abbildung 3.28	Expression von CG11910.....	99
Abbildung 3.29	Glia-Schema CG11910.....	99
Abbildung 3.30	Expression von CG8965.....	100
Abbildung 3.31	Glia-Schema CG8965.....	100
Abbildung 3.32	Expressionsprofile der Antagonisten.....	101
Abbildung 3.33	Expression von CG6218.....	103
Abbildung 3.34	Glia-Schema CG6218.....	103
Abbildung 3.35	Expression von CG6783.....	104
Abbildung 3.36	Glia-Schema CG6783.....	105
Abbildung 3.37	Expression von CG9336.....	106
Abbildung 3.38	Glia-Schema CG9336.....	107
Abbildung 3.39	Expression von CG2893.....	108
Abbildung 3.40	Glia-Schema CG2893.....	108
Abbildung 3.41	Abhängigkeit der Kandidaten von <i>gcm</i>	110
Abbildung 3.42	Abhängigkeit von CG5080.....	112
Abbildung 3.43	GBS-Suche im 5' Bereich von <i>repo</i>	113
Abbildung 3.44	GBS-Suche im CG4322 Locus.....	115
Abbildung 3.45	GBS-Suche im CG16876 Locus.....	115
Abbildung 3.46	GBS-Suche im CG5080 Locus.....	116

Tabellenverzeichnis

Tabelle 2.1	Verwendete Fliegenstämme.....	18
Tabelle 2.2	Temperaturabhängige Entwicklungszeiten.....	22
Tabelle 2.3	Inkubationszeiten der Stundenablagen.....	23
Tabelle 2.4	Verwendete Antikörper	46
Tabelle 3.1	Wildtyp-Kontrollen.....	56
Tabelle 3.2	Statistische Analyse der GOF	64
Tabelle 3.3	Statistische Analyse der LOF	64
Tabelle 3.4	Positive Kandidaten der GOF	68
Tabelle 3.5	Positive Kandidaten der LOF	72
Tabelle 3.6	Gegensätzlich, antagonistisch regulierte Kandidaten.....	77
Tabelle 3.7	<i>In vivo</i> Abhängigkeit der positiven Kandidaten-Gene	78
Tabelle 3.8	Zusammenfassende Statistik.....	85
Tabelle 3.9	Abhängigkeit der Kandidaten von glialen Genen.....	111
Tabelle 3.10	GBS der Kandidatengene	114
Tabelle 7.1	Verwendete Geräte.....	145
Tabelle 7.2	Alle getesteten GOF-Kandidaten	146
Tabelle 7.3	Alle getesteten LOF-Kandidaten	149
Tabelle 7.4	Funktionelle Annotierung aller positiven GOF und LOF Kandidaten.....	153

1. Einleitung

Eine der größten Herausforderungen der Biologie ist die Beantwortung der Frage, wie aus omnipotenten neuralen Stammzellen eine zelluläre Diversität entsteht, die ein solch komplexes Netzwerk wie das Nervensystem ausbildet. Das Nervensystem verarbeitet als höchstes Schaltorgan die von den Sinnesorganen eingehenden Informationen und kontrolliert grundlegende Vorgänge wie Bewegung, Homöostase, Denken und Handeln. Die Verschaltung einer ungeheuren Anzahl von Zellen ließ im Laufe der Evolution eine Komplexität entstehen, wie sie in keinem anderen Organ oder Gewebe vorliegt. Der Aufbau des Nervensystems wird im Wesentlichen durch zwei Zelltypen bestimmt: Neurone und Gliazellen. Neurone standen jahrelang im Mittelpunkt der Forschung und sind sehr gut charakterisiert. Es werden drei Klassen von Neuronen unterschieden: 1) sensorische Neurone empfangen physikalische und chemische Reize und leiten sie weiter, 2) Motoneurone innervieren das Muskelsystem und kontrollieren so die Bewegung und 3) Interneurone stellen die Verbindung zwischen den Nervenzellen her. Die Kontakte zwischen den Neuronen werden über chemische oder elektrische Synapsen hergestellt. Die Impulse (Aktionspotentiale) werden über lange Fortsätze, sogenannte Axone, und durch zahlreiche Verzweigungen, den Dendriten, übertragen. Gliazellen hingegen sind erst in den letzten Jahren genauer untersucht worden. Sie sind unter anderem für die Versorgung der Neurone mit Nährstoffen verantwortlich, umhüllen den Zellkörper und die Axone wie eine Isolationsschicht und sorgen für ein gerichtetes Auswachsen der Axone.

In der Wissenschaft werden zur Erforschung komplexer Mechanismen verschiedene Modellsysteme verwendet. Durch zahlreiche molekulargenetische Methoden, die einfache genetische Manipulierbarkeit des Organismus und die kurze Generationszeit, um nur einige Vorteile zu nennen, hat sich *Drosophila melanogaster* zu einem der wichtigsten Modellorganismen in der Wissenschaft etabliert. Im Laufe der letzten hundert Jahre wurde die Fruchtfliege präzise morphologisch beschrieben und Einsicht in die Entwicklung vieler Organe gewonnen. Die Erforschung von homologen Genen und Entwicklungswegen zeigt, daß grundlegende Entwicklungswege zwischen *Drosophila* und höheren Organismen ähnlich sind, und so besteht die Möglichkeit, Vorgänge und Mechanismen der Entwicklung zu übertragen. Diese Übertragbarkeit gilt neben vielen Forschungsgebieten auch für die Neurobiologie (Arendt und Nubler-Jung, 1999). Dadurch können am

Nervensystem von *Drosophila* erforschte Mechanismen Anhaltspunkte für die Neurogenese in Vertebraten liefern. Im Folgenden wird ein kurzer Einblick in die Entwicklung des Nervensystems im Modellorganismus *Drosophila* geben.

1.1. Embryonale Neurogenese bei *Drosophila*

Die zur Klasse der Arthropoden gehörende Fruchtfliege zeichnet sich durch den Besitz eines Strickleiternnervensystems aus. Das Nervensystem besteht, wie bei allen höheren Tieren, aus einem zentralen Nervensystem (ZNS) und einem peripheren Nervensystem (PNS), das die Gesamtheit aller Nerven umfaßt. Im Gegensatz zu Vertebraten besitzen Invertebraten ein ventral verlaufendes Bauchmark (ventrales Nervensystem (vNS)), das zusammen mit dem Gehirn das ZNS bildet. Das ventrale Bauchmark eines Embryos setzt sich aus vierzehn bilateral symmetrischen Ganglien, den Neuromeren, zusammen. Entsprechend der Körperregionen werden die Neuomere in 3 gnathale (G1-3), 3 thorakale (T1-3) und 8 abdominale Segmente (A1-8) untergliedert. Die Neuomere werden durch die aus dem Mesektoderm abstammende Mittellinie getrennt (ML). Die schematische Anlagenkarte eines Embryos während der Gastrulation ist in Abbildung 1.1 Bild A gezeigt. Das Gehirn geht aus der procephalen neurogenen Region (pNR) hervor, während das vNS aus der ventralen neurogenen Region des Ektoderms (vNR) entsteht (zusammengefaßt in (Campos-Ortega, 1997)). Bild B zeigt eine laterale Ansicht des ZNS eines Embryos im Entwicklungsstadium 17. Der Aufbau des typischen Strickleiternnervensystems wird deutlich in Bild C. Die paarigen Ganglien des Bauchmarks werden durch eine anteriore (ac) und eine posteriore (pc) Kommissur pro Segment miteinander verbunden. Die Verbindung zu den Ganglien der anderen Segmente wird über parallel longitudinal angeordnete Konnektive (c) hergestellt.



Abbildung 1.1 Die Entstehung des ZNS von *Drosophila*

Bild A zeigt das Schema eines Embryos während der Gastrulation. Das Gehirn geht aus der procephalen neurogenen Region (pNR) hervor, während das ventrale Nervensystem aus der ventralen neurogenen Region (vNR) entsteht. Bild B zeigt eine laterale Ansicht auf das Bauchmark und Gehirn eines Embryos in Stadium 17, sichtbar hervorgehoben durch eine neuronale Färbung gegen den monoklonalen Antikörper BP102. Diese Färbung zeigt auch deutlich den Aufbau des Strickleiter-Nervensystems in Bild C, das eine Filetpräparation eines Embryos in Stadium 16 darstellt. Über eine anteriore (ac) und eine posteriore (pc) Kommissur werden die paarigen Ganglien in einem Segment verbunden. Parallel verlaufende Konnektive (c) verbinden die Segmente untereinander. Anterior ist bei allen Abbildungen links.

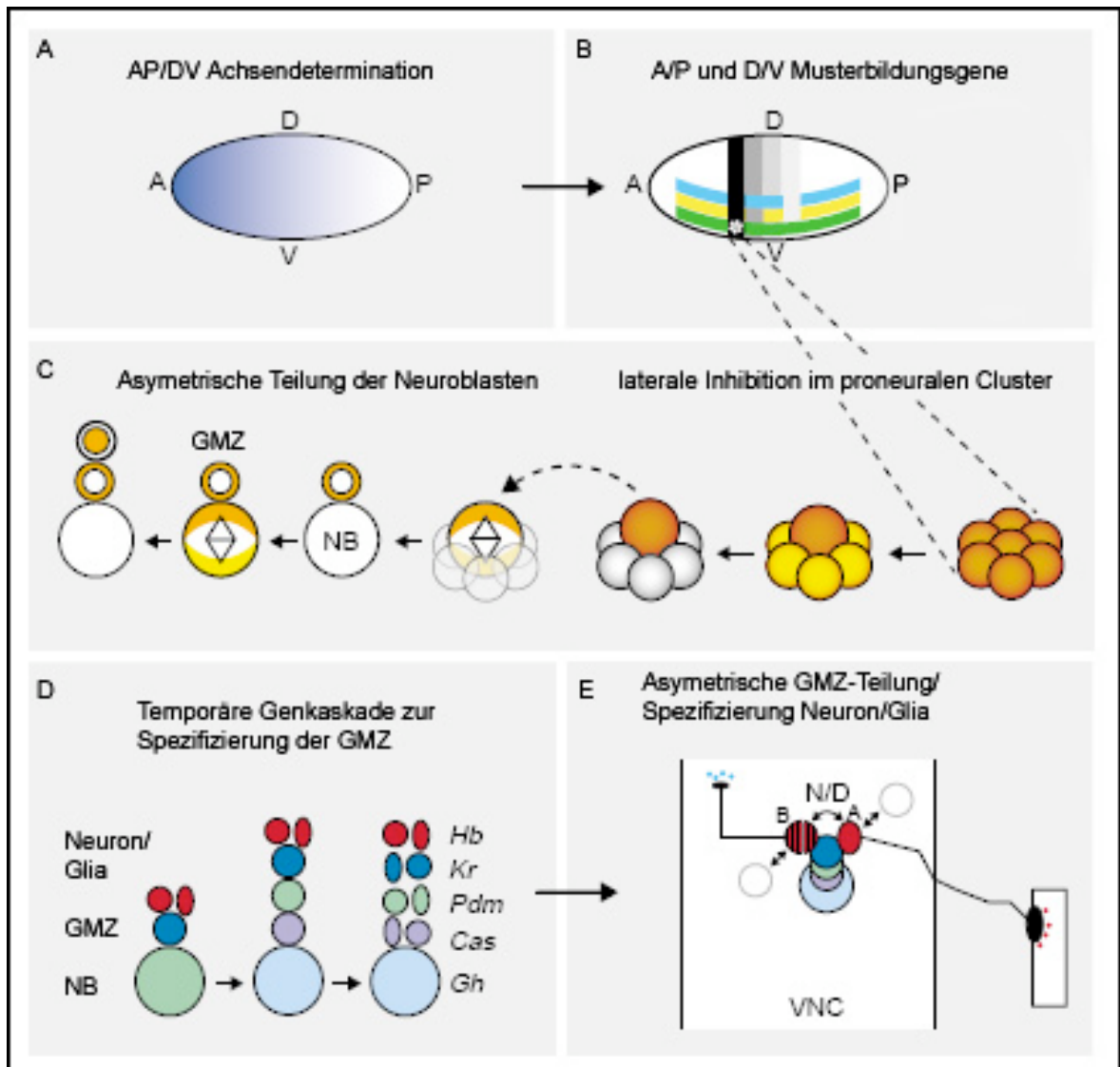


Abbildung 1.2 Entwicklung des ventralen Nervensystems

A) Im Embryo werden früh die anterior-posteriore (A/P) und dorsoventrale (D/V) Hauptachse durch Gradienten von komplexen Genkaskaden festgelegt. B) Dies führt entlang der A/P Achse zur Expression von A/P- (schwarze und graue Streifen) und D/V-Musterbildungsgenen (farbige Streifen), die das Neuroektoderm in distinkte Bereiche mit neuralen Domänen (weißer Stern) einteilen. C) In solch einem proneuralen Cluster wird durch den Vorgang der lateralen Inhibition eine neurale Vorläuferzelle ausgesondert. Dieser sogenannte Neuroblast (NB) erzeugt durch asymmetrische Zellteilungen einen spezifischen Zellstammbaum. Hierbei wird durch die ungleiche Verteilung von Proteinen zur basalen (gelb) und apikalen (braun) Seite der Zelle neben einem NB eine kleinere Gangliengliemutterzelle (GMZ) abgeschnürt. D) Die temporale Expression der Gene *hunchback* (*hb*, rot), *Krüppel* (*Kr*, blau), *Pdm* (grün), *castor* (*cas*, violett) und *grainyhead* (*gh*, hellblau) spezifiziert das Schicksal der GMZ, die von jedem NB gebildet werden. E) Die asymmetrische Teilung der GMZ produziert Neurone und/oder Gliazellen. Dargestellt ist die antagonistische Wirkung der Gene *Notch* und *numb*. Umliegende Zellen (hellgraue Kreise) übertragen über den Notch-Signalweg an beide Geschwisterzellen das „A-Zellschicksal“. Die asymmetrische Verteilung von *Numb* (graue Box) an eine Zelle blockiert *Notch* und fördert so das „B-Schicksal“ in dieser Zelle, während die andere zur A-Zelle wird. Auf diese Weise entstehen spezifische Neurone mit unterschiedlichen Neurotransmittern (rote und blaue Punkte). Abbildung nach (Skeath und Thor, 2003)

Die obere Abbildung (1.2) zeigt die wichtigsten Schritte der Neurogenese in *Drosophila*. Zu Beginn der Embryogenese legen Morphogen-Gradienten von maternalen Effektgenen die anterior-posteriore und dorsoventrale Hauptachse fest (Abb.1.2, Bild A). Sie kontrollieren zygotische Musterbildungsgene, die entlang der A/P und D/V Achse

exprimiert werden. Dadurch wird das einschichtige vNR in Domänen von äquivalenten neuronalen Zellen in Form eines kartesischen Koordinatensystems unterteilt. Eine solche Domäne, die als proneurales Cluster (Abb.1.2, Bild B weißer Stern) bezeichnet wird, besteht aus 4-6 Zellen. Eine dieser Zellen wird durch Zell-Zell Interaktionen als sogenannter Neuroblast (NB) ausgesondert. Die Entstehung der NBs wird durch proneurale (Campuzano und Modolell, 1992; Romani *et al.*, 1987) und neurogene Gene (Bourouis *et al.*, 1989; Lehmann, 1981) reguliert. Dieser als laterale Inhibition bezeichnete Vorgang wird von den neurogenen Genen Delta und Notch bestimmt (Abb.1.2, Bild C). Notch kodiert für einen membranständigen Rezeptor und Delta fungiert als dessen spezifischer Ligand. Anfänglich besitzen alle Zellen des proneuralen Clusters eine ausgewogene Aktivität dieser beiden Gene. Durch eine Verschiebung dieses Gleichgewichtes führt die erhöhte Delta-Expression in einer Zelle, dem späteren NB, zu einer verstärkten Notch-Aktivität in den verbliebenen Zellen des Clusters, wodurch proneurale Gene und schließlich neurales Schicksal unterdrückt wird. Diese Interaktionen bewirken, daß nur eine Zelle als neurale Vorläuferzelle ausgesondert wird, während in allen anderen Zellen dieses Schicksal unterdrückt wird und sie sich zu Epidermoblasten entwickeln.

Jedes Hemineuromer wird aus ca. 30 solcher Neuroblasten gebildet. Während der Gastrulation delaminieren die NBs in 5 aufeinanderfolgenden Segregationswellen (S1-S5) in das Innere des Embryos. Die Delamination geschieht in einem zeitlichen und räumlichen Muster, wodurch ein segmental reproduzierbares Muster an NBs entsteht. Jeder NB kann aufgrund des Zeitpunktes der Delamination, seiner Position im Hemineuromer, die die Bezeichnung des NB nach Reihe (horizontal) und Spalte (vertikal) liefert, sowie der Expression spezifischer Markerkombinationen eindeutig identifiziert werden (Bhat, 1998; Bhat, 1999; Doe, 1992; Skeath, 1999), was in der folgenden Abbildung 1.3 schematisch zusammengefaßt ist.

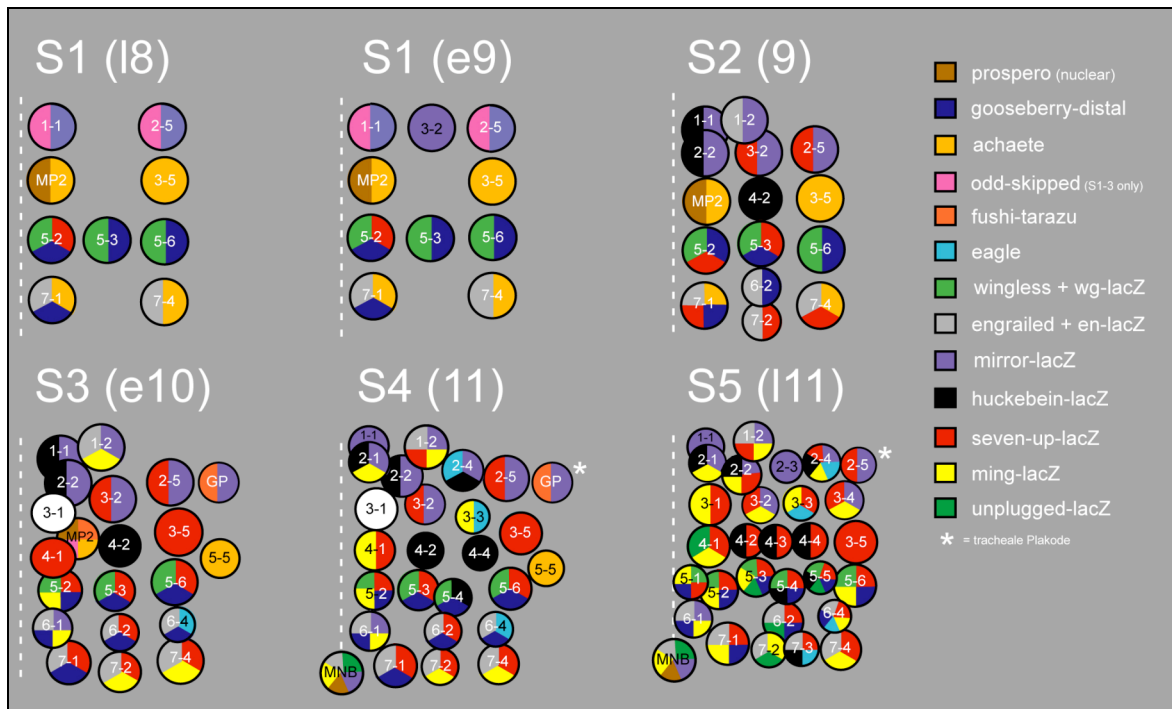


Abbildung 1.3 Segregationswellen der Neuroblasten

In dieser Karte ist die dynamische Genexpression der Neuroblasten (NB) während der einzelnen Segregationswellen (S1-S5) wiedergegeben. Jeder NB kann anhand des Delaminationszeitpunktes, der Position im Hemineuromer und anhand der Expression verschiedener Marker-Gene eindeutig identifiziert werden. In der Legende rechts ist der Farbcode der exprimierten Markergene aufgelistet. Dargestellt ist jeweils ein Hemineuromer; Anterior ist oben; die gestrichelte Linie deutet die Mittellinie, der Stern die tracheale Plakode an. Abbildung nach Doe (1992) und Broadus und Doe (1995).

Im Anschluß an die Delamination generiert jede neurale Vorläuferzelle einen für sie charakteristischen Zellstammbaum. Die NBs teilen sich in einem Stammzellmodus, wobei eine selbsterneuerte Vorläuferzelle und eine Gangliemutterzelle (GMZ) abgeschnürt werden. Zwar variiert die Anzahl der Teilungen je nach NB, der Vorgang dieser asymmetrischen Teilungen zeichnet sich jedoch durch die gleichen molekularen Grundlagen aus (Abbildung 1.2, Bild C). Eine Schlüsselfunktion spielt hierbei der Transkriptionsfaktor Prospero. Die basale Verankerung (orange) und die Ausrichtung des Spindelapparates im mitotischen NB führen dazu, daß Prospero exklusiv in die GMZ gelangt und dort im Nukleus Zellzyklus-regulierende Gene abschaltet (Hirata *et al.*, 1995; Kaltschmidt *et al.*, 2000; Spana und Doe, 1995). Aus dieser GMZ entstehen dann aus einer Teilung Neurone und /oder Gliazellen, die sich ausdifferenzieren. In den letzten Jahren konnte herausgefunden werden, daß eine temporale Achse die Identität der GMZ beeinflusst (Abb.1.2, Bild D). Diese wird durch sequentiell im Neuroblasten exprimierte Gene bestimmt, deren Expression in der GMZ aufrecht erhalten wird und auch an die Nachkommenzellen weitergegeben wird. Dazu gehören die für die Zinkfinger-Transkriptionsfaktoren kodierenden Gene *hunchback* (*hb*) und *Krüppel* (*Kr*), das Gen für das POU-Domänenprotein-1 und -2 (*pdm-1* und *pdm-2*), *castor* (*cas*) und schließlich das

für ein Helix-Loop-Helix Protein kodierende Gen *grainyhead* (*gh*) (Brody und Odenwald, 2005; Brody *et al.*, 2002; Isshiki *et al.*, 2001; Kambadur *et al.*, 1998; Novotny *et al.*, 2002). Durch das sequentielle Anschalten dieser Faktoren über einen bestimmten Zeitraum wird sichergestellt, daß jede GMZ, die zu unterschiedlichen Zeitpunkten geboren wird, eine eigene Identität besitzt. Dies ermöglicht eine Unterscheidung der früh oder spät geborenen GMZ sowie der Nachkommenzellen, die aus einem NB hervorgehen. Für die Entstehung spezifischer Zellschicksale ist in Abbildung 1.2 in Bild E das Beispiel der antagonistisch-wirkenden Gene *Notch* und *numb* dargestellt. Benachbarte Zellen leiten über den Notch-Signalweg an beide Geschwisterzellen das „A-Zellschicksal“ weiter. Die asymmetrische Verteilung von Numb blockiert in einer der Zellen den Notch-Signalweg, woraus das „B-Schicksal“ in dieser Zelle eingeschlagen wird, während die andere zur A-Zelle wird (Spana und Doe, 1996).

Bisher wurden alle neuronalen Vorläuferzellen der Einfachheit halber allgemein als Neuroblasten bezeichnet. Eine genauere Bezeichnung gliedert die NBs in drei Klassen, basierend darauf, welche Nachkommenzellen produziert werden. Die nachfolgende Abbildung 1.4 zeigt schematisch die Unterschiede der drei verschiedenen NB-Klassen. Der Neuroblast bringt nur Neurone hervor, während der Neuroglioblast (NGB) eine gemischte Zell-Linie aus Neuronen und Gliazellen generiert. Durch die Teilung des Glioblasten (GB) entstehen nur Gliazellen.

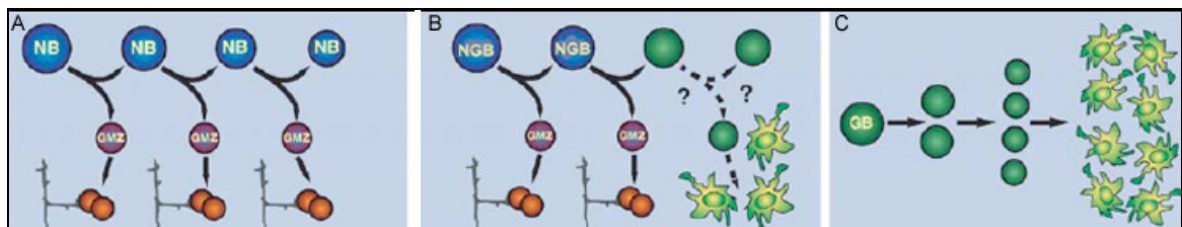


Abbildung 1.4 Unterscheidung neuraler Vorläuferzellen

Basierend auf den Nachkommenzellen werden die neuronalen Vorläuferzellen in Neuroblasten (NB, Bild A), die nur Neurone produzieren, Neuroglioblasten (NGB, Bild B), die eine gemischte Zell-Linie hervorbringen, und Glioblasten (GB, Bild C), aus denen nur Gliazellen hervorgehen, eingeteilt.

Insgesamt werden im Laufe der embryonalen Neurogenese etwa 350 Neurone und ca. 35 Gliazellen pro Hemineuromer gebildet. Während die meisten NBs mitotisch später nicht mehr aktiv werden, durchlaufen andere während der Larvalphase eine Ruhepause. Die Nachkommenzellen dieser NBs sind später am Aufbau des adulten Nervensystems beteiligt (Prokop und Technau, 1991).

1.2. Das gliale Zellschicksal

In *Drosophila* wird gliales Zellschicksal durch das Gen *glial cells missing/ glial cells deficient* (*gcm/glide*) induziert, das im Folgenden als *gcm* bezeichnet wird. *gcm* codiert für einen Transkriptionsfaktor und wird in allen Gliazellen, mit Ausnahme der mesektodermalen Mittellinien-Glia, exprimiert. Es konnte gezeigt werden, daß in *gcm* Funktionsverlust-Mutanten nahezu alle Gliazellen fehlen. Weiterhin werden durch eine ektopische Expression von *gcm* im gesamten ZNS mehr Gliazellen auf Kosten von Neuronen produziert (Akiyama-Oda *et al.*, 1998; Hosoya *et al.*, 1995; Jones *et al.*, 1995; Vincent *et al.*, 1996). Somit fungiert *gcm* als Schaltergen zwischen neuronalem und glialem Zellschicksal, wobei *gcm*-positive Zellen gliales Schicksal und *gcm*-negative Zellen neuronales Schicksal annehmen. Diese von *gcm* induzierte binäre Zellschicksalsentscheidung ist in der nächsten Abbildung 1.5 schematisch dargestellt.

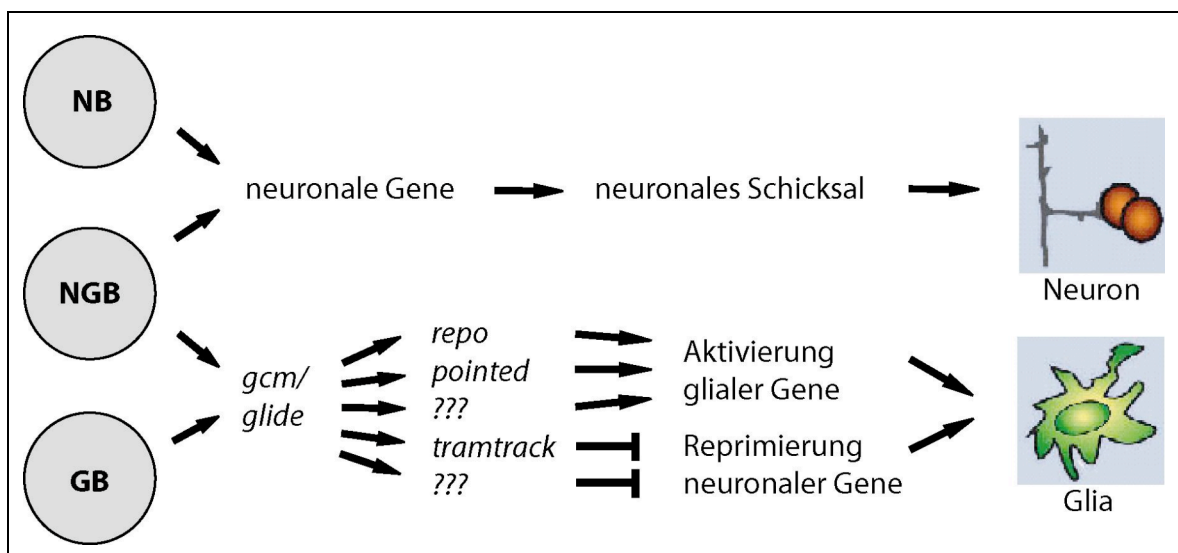


Abbildung 1.5 Binäre Entscheidung des Zellschicksals

Die Expression neuronaler Gene im NB oder NGB aktiviert neuronales Schicksal. Durch den Transkriptionsfaktor Gcm im NGB oder GB werden bekannte Zielgene, wie *repo* oder *pointed* angeschaltet, wodurch zum einen das gliale Schicksal aufrecht erhalten wird und zum anderen neuronale Gene unterdrückt werden. Somit dient *gcm* als Schaltergen und induziert gliales Schicksal. Die Entdeckung weiterer glialer Gene, hier als Fragezeichen dargestellt, stellen die Zielsetzung dieser Arbeit dar.

Die Expression von *gcm* beginnt im embryonalen Stadium 10 und die mRNA kann bis Stadium 14 detektiert werden. Ein abgeschwächtes und zeitlich verspätetes Expressionsmuster zeigt das aus Gen-Duplikation entstandene *gcm*-Paralog *gcm2* (Kammerer und Giangrande, 2001). Auch die ektopische Expression von *gcm2* kann gliales Schicksal induzieren, jedoch hat der Verlust der *gcm2*-Funktion nur eine schwache Auswirkung auf die Entwicklung der Gliazellen. Somit gilt *gcm* als Hauptfaktor für gliales Schicksal, wobei zu beachten ist, daß nur in Embryonen der Funktionsverlust-Mutanten

Def(2L)200, eine Defizienz in der beide Gene betroffen sind, eine vollständige Eliminierung aller lateralen Gliazellen festgestellt werden konnte (Kammerer und Giangrande, 2001). Beide Gene liegen in entgegengesetzter Orientierung in einem 30kb langen chromosomalen Abschnitt (Abbildung 1.6, A), der insgesamt 10 regulatorische *gcm*-Bindestellen (GBS, schwarze Ellipsen) besitzt. Es wurde gezeigt, daß sich beide Gene mit Hilfe dieser GBS sowohl selbst als auch gegenseitig regulieren (Akiyama *et al.*, 1996; Miller *et al.*, 1998; Schreiber *et al.*, 1997).

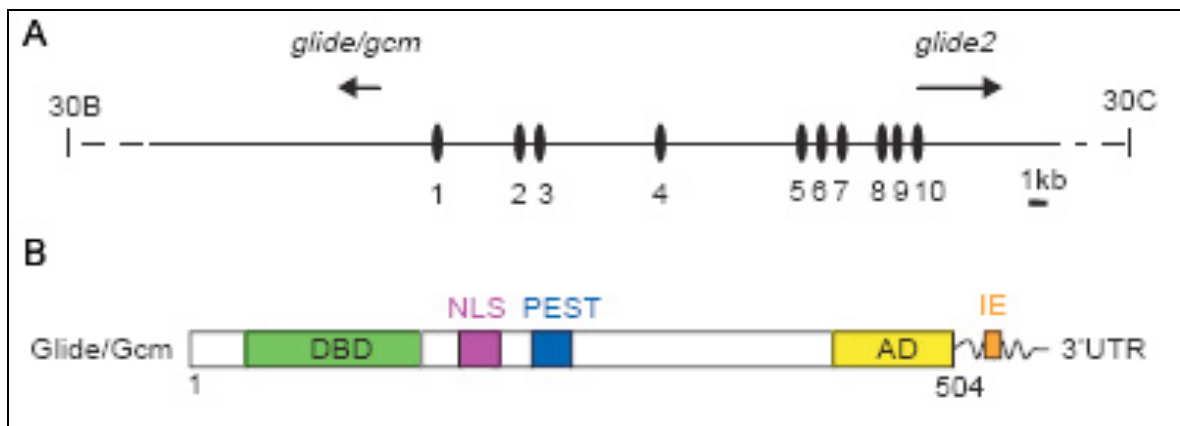


Abbildung 1.6 Der *gcm* Locus

Bild A zeigt den Gen-Locus der zwei 27kb voneinander entfernten *gcm*-Gene, die in entgegengesetzter Orientierung positioniert sind. Die von 1-10 nummerierten Ellipsen stellen die GBS-Seiten dar, durch die sich die zwei Gene selbst und gegenseitig regulieren. Der Aufbau des Gcm Proteins ist in Bild B zu sehen. Neben einer DNA-bindenden Domäne (DBD), einem Kern-Lokalisierungssignal (NLS) und einer Aktivierungsdomäne (AD), besitzt das aus 504 Aminosäuren bestehende GCM Protein eine PEST-Domäne, die zum schnellen Abbau des Proteins beiträgt. Abbildung entnommen aus Van de Bor und Giangrande (2002)

Während die bisherigen Veröffentlichungen *gcm* als gliales Gen darstellten, haben aktuelle Untersuchungen eine neue Funktion für den "glialen Master-Regulator" nachgewiesen. Chotard *et al.*, 2005 konnten erstmals eine Beteiligung von *gcm*, wie auch *gcm2*, in der Differenzierung beider Zelltypen, Neuronen und Gliazellen, in den optischen Anlagen von Larven des dritten Entwicklungsstadiums aufzeigen.

Neben der glialen Expression werden *gcm* und *gcm2* ab dem embryonalen Entwicklungsstadium 5 in den Vorläuferzellen von Blutzellen, den sogenannten Hämozyten, exprimiert (Bernardoni *et al.*, 1997; Kammerer und Giangrande, 2001). Aus diesen in der Kopffregion lokalisierten mesodermalen Vorläuferzellen entwickeln sich zwei verschiedene Arten von Immunzellen. Die eine Gruppe, die Plasmatozyten, entwickeln sich zu Makrophagen und migrieren später in der Hämolymphe durch den gesamten Embryo. Ihre Hauptfunktion ist die Entfernung apoptotischer Zellfragmente durch Endocytose. Die zweite Gruppe der Kristall Zellen verbleibt in der Kopffregion und ist an dem Prozeß der Melanisierung beteiligt, die dem Abtöten von Pathogenen dient (Meister,

2004; Meister und Lagueux, 2003). In der hämatopoetischen Zell-Linie fördert *gcm*, vergleichbar mit der Funktion im ZNS, einerseits die Differenzierung von Hämozyten zu Plasmatozyten, während es gleichzeitig die Entwicklung von Kristall-Zellen unterdrückt (Bataille *et al.*, 2005; Evans *et al.*, 2003). Weiterhin wird *gcm* auch ab Mitte Stadium 12 bis zum Ende der Embryogenese in epidermalen Zellen exprimiert, den sogenannten „segment border tendon cells“, die im weiteren Verlauf als „tendon cells“ bezeichnet werden. Diese Zellen stellen die Verbindung der Muskeln zu dem cuticulären Exoskelett in Arthropoden her. In *gcm* Funktionsverlustmutanten sind Defekte in der Verbindung der Muskeln mit den „tendon cells“ sichtbar. Untersuchungen zeigten, daß *gcm* unter der Kontrolle von Segment-Polaritätsgenen an der terminalen Differenzierung dieser Zellen beteiligt ist (Soustelle *et al.*, 2004).

Da *gcm* im ZNS nur transient exprimiert wird, ist es wahrscheinlich nur für die Initiierung der glialen Differenzierung verantwortlich. Bisher sind jedoch nur wenige direkte oder indirekte Zielgene von Gcm bekannt, die das gliale Schicksal aufrecht erhalten und an der glialen Differenzierung beteiligt sind. Zu den bereits beschriebenen Genen gehören *reversed polarity (repo)*, *pointed (pnt)*, *tramtrack (ttk)* und *locomotion defects (loco)* (Badenhorst, 2001; Giesen *et al.*, 1997; Granderath *et al.*, 1999; Halter *et al.*, 1995; Klaes *et al.*, 1994; Klämbt, 1993). Das Homöodomänen-Protein Repo kontrolliert verschiedene Gesichtspunkte der glialen Differenzierung und kooperiert sowohl mit Pnt bei der Förderung des glialen Schicksals, als auch mit Ttk zur Reprimierung des neuronalen Schicksals (Yuasa *et al.*, 2003). Unterschiedliche Veröffentlichungen zur Beschreibung der transkriptionellen Kontrolle glialer Gene deuten auf ein Zusammenspiel mehrerer Komponenten hin (Granderath *et al.*, 2000; Jones *et al.*, 2004; Ragone *et al.*, 2003; Yuasa *et al.*, 2003). Hierbei steht die exakte temporale Regulation des Transkriptionsfaktors Gcm im Mittelpunkt der Gliogenese (zusammengefaßt in Jones, (2005)). Es konnte bereits gezeigt werden, daß Gcm in unterschiedlichen Zellstammbäumen durch denselben Faktoren (Notch) aktiviert bzw. reprimiert wird (Van De Bor und Giangrande, 2001; Van De Bor *et al.*, 2000). Durch die Untersuchung der Promoter- und Enhancer-Region von *gcm* konnten verschiedene regulatorische Elemente identifiziert werden, die die zeitliche und lokale Expression von *gcm* regulieren (Jones *et al.*, 2004; Ragone *et al.*, 2003). Die Abbildung 1.7 zeigt verschiedene cis-regulatorische Elemente des *gcm* Locus. Die Expression eines Konstruktes mit einem spezifischen Enhancer-Element (blau) zeigte hierbei Expression im gesamten ZNS, also auch in neuronalen Zellen (Jones *et al.*, 2004). Ein anderes Element (pink) steht unter der Kontrolle des Hox-Genes *abdominal-A*, das die

Segmentidentitäten der abdominalen Neuromere A1-A7 beeinflusst. Hier zeigte sich eine Zellstammbaum-spezifische Expression im NB6-4a, der eine reine gliale Zell-Linie hervorbringt.

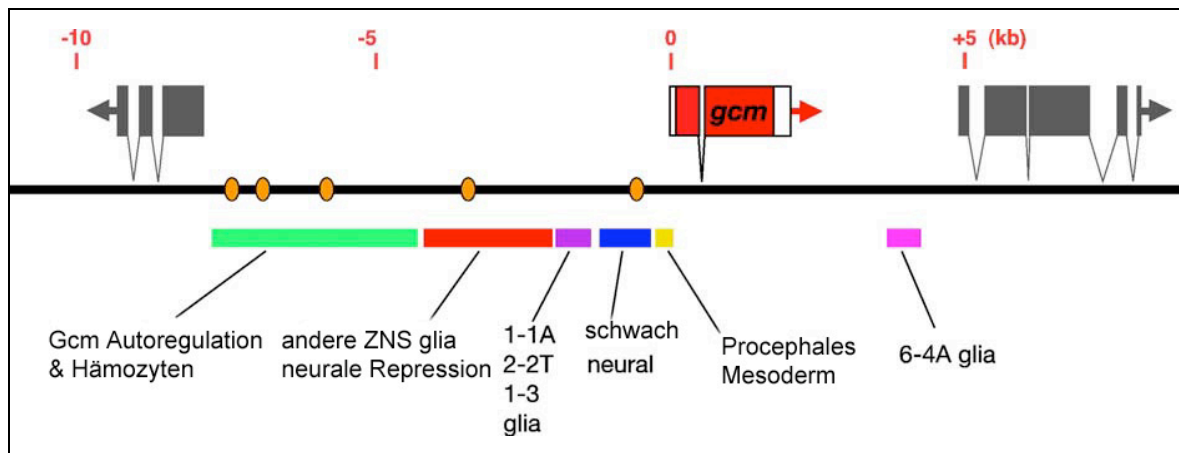


Abbildung 1.7 Cis-regulatorische DNA-Elemente von *gcm*

Die schwarze Linie deutet ca. 20 kb genomischer DNA des *gcm* Locus an; orange Punkte zeigen GBS an. Transkribierte Gene werden als Rechtecke oberhalb der Linie dargestellt, Pfeile deuten die Transkriptions-Richtung an. Die roten Rechtecke stellen die Exons von *gcm* dar. DNA-Regionen, die die Expression von *gcm* in spezifischen Zellen und Bereichen fördern, sind als farbige Linien unterhalb der Karte eingezeichnet. 1-1A, 2-2T und 1-3 sind ZNS Neuroglioblasten. Abbildung entnommen aus Jones et al., (2005)

Diese Ergebnisse deuten auf eine Kontext-abhängige Aktivierung von *gcm* hin. Weiterhin führt die synergistische Zusammenarbeit der Transkriptionsfaktoren Gcm, Repo, Pnt und Ttk zur Aktivierung von Glia-spezifischen Genen, wie es am Beispiel von *loco* gezeigt werden konnte (Yuasa *et al.*, 2003). Trotz dieser detaillierten Erforschung des glialen Netzwerkes fehlen noch viele bisher unbekannte Faktoren, die die Differenzierung und Diversität der Gliazellen mitbestimmen.

1.3. Klassifizierung von Gliazellen

Unter dem Begriff „Gliazellen“ sind mehrerer Gruppen und Untergruppen zusammengefaßt. In Vertebraten werden die Gliazellen des ZNS in die zwei Hauptgruppen der Astrozyten und Oligodendrozyten unterteilt. Die zahlenmäßig größere Gruppe der Astrozyten zeichnen sich durch eine sternförmige Morphologie aus, wodurch der Kontakt zu Nervenzellen, Synapsen und /oder Blutgefäßen hergestellt wird. Die zellulären Fortsätze der Oligodendrozyten bilden die isolierende Myelinschicht, die die Axone der Nervenzellen umhüllen. Weiterhin gibt es Makrophagen-ähnliche Mikroglia, die von Monozyten (Blutzellen) abstammen. In der Peripherie bildet die Gruppe der Schwannschen Zellen die größte Gruppe.

In *Drosophila* werden die Gcm bzw. Repo-positiven Gliazellen im ZNS und PNS als laterale Gliazellen zusammengefaßt. Die Einteilung der Gliazellen in verschiedene Gruppen basiert auf morphologischen und positionellen Gesichtspunkten, die von Ito *et al.*, (1995) eingeführt wurde (Ito *et al.*, 1995). Es ist bisher ungeklärt, ob diese positionelle und morphologische Einteilung auch einer differentiellen Genexpression in den einzelnen Unterklassen entspricht. Die ca. 25 Gliazellen im ZNS werden hierbei in drei Hauptklassen eingeteilt, die sich wiederum aus Unterklassen zusammensetzen. Insgesamt wird zwischen 6 Glia-Typen unterschieden. Entsprechend der Einführung von Ito *et al.* werden auch im deutschen Sprachgebrauch die englischen Begriffe verwendet.

1. „Surface-associated glia“: Diese Klasse von Gliazellen umhüllt die gesamte Oberfläche des ZNS. Innerhalb dieser Klasse gibt es zwei Subtypen, die „subperineurial glia“ (SPG; 14-16 Zellen pro Neuomer) und die „channel glia“ (CG; 4 Zellen pro Neuomer). Die SPG liegen unterhalb der ZNS Oberfläche. In einer Filetpräparation unterscheidet man zwischen dorsal und ventral liegenden SPG. Die Zellform ist rund und flach, wodurch dieser Glia-Typ gut identifiziert werden kann. CG finden sich am Rande der Dorsoventralkanäle und werden entsprechend der Position in dorsale und ventrale CG eingeteilt. Ihre Ausläufer kleiden die Kanäle im Inneren wie eine Schutzhülle aus. Die Zellkerne haben eine schmale und längliche Form.

2. „Cortex-associated glia“: Die zweite Kategorie besteht nur aus einer Untergruppe, den „cell body glia“ (CBG; 6-8 Zellen pro Neuomer). Sie liegen ventral innerhalb des Kortex zwischen neuronalen Zellkörpern. Ihre Zellkerne und Zellkörper sind von unregelmäßiger Gestalt.

3. „Neuropile-associated glia“: Zu dieser Klasse gehören insgesamt drei Untergruppen. Die „nerve-root glia“ (NG; 2-4 Zellen pro Neuomer), die entlang der Nervenwurzeln liegen, lassen sich weiter in „intersegmental nerve-root glia“ (ISNG) und „segmental nerve-root glia“ (SNG) einteilen. Die zweite Untergruppe der „interface glia“ (IG; 16-18 Zellen pro Neuomer) ist an der Kortex/Neuropil-Grenze positioniert und besitzen eine längliche, ellipsoide Form. Zu ihnen gehört ausschließlich die Gruppe der „longitudinalen glia“ (LG). Die letzte Untergruppe sind die „midline glia“ (ML; 3-4 Zellen pro Neuomer), die jedoch mesektodermalen Ursprungs sind und nicht zu den lateralen Glia gezählt werden (Bossing und Technau, 1994). Ihre Zellkörper sind relativ groß und rund und sie liegen medial an der anterioren und posterioren Kommissur.

Die Gruppe der peripheren Glia (PG, 24-26 Zellen pro Neuomer) gehören zum PNS, obwohl die meisten von ihnen aus dem ZNS in die Peripherie auswandern. Lediglich zwei

Repo-positive Zellen werden im PNS gebildet und wandern auf das ZNS zu. Eingeteilt wird diese Gruppe in zwei Unterklassen, die „exit glia“ (4-6 Zellen pro Neuromer) und die „peripheral glia“ (20 Zellen pro Neuromer). Allerdings stellen diese Bezeichnungen einen temporalen Zustand dar, da alle in jüngeren Stadien am Rande des ZNS liegenden „exit glia“ in die Peripherie auswandern und am Ende der Embryogenese als periphere Glia bezeichnet werden. Nur zwei Zellen werden in Stadium 16 in die Untergruppe der EG eingeordnet. Die Gruppe der EG/PG ist im folgenden Schema nur vereinfacht dargestellt.

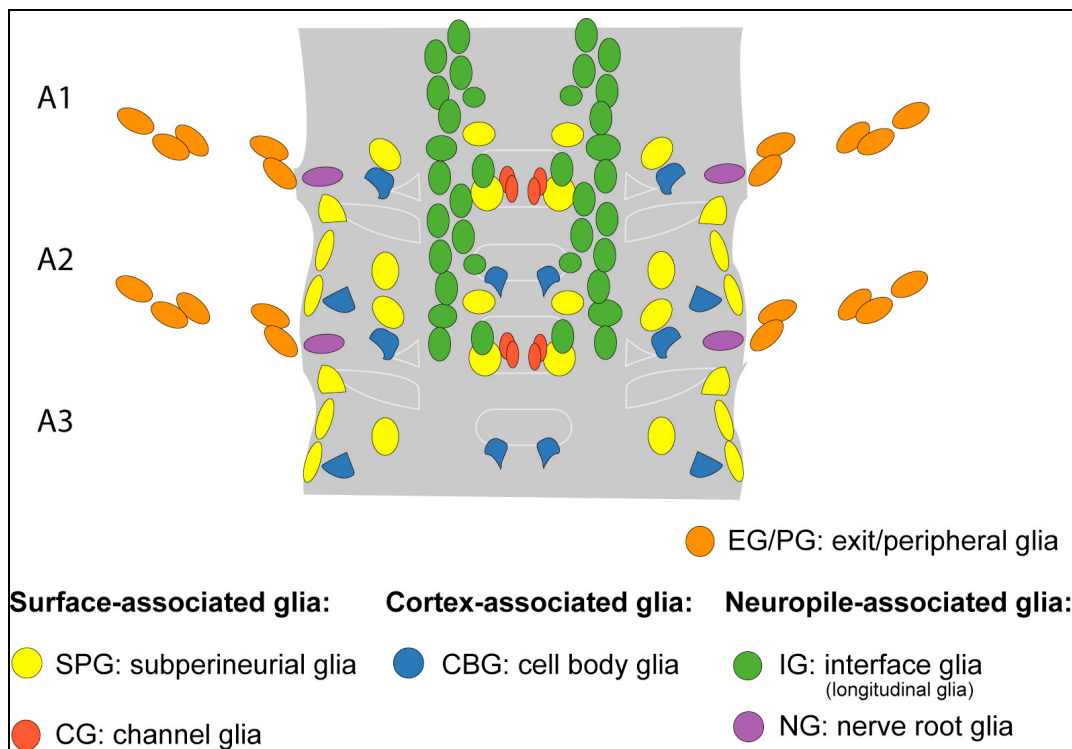


Abbildung 1.8 Klassifizierung der Gliazellen

Gezeigt wird eine ventrale Aufsicht eines Embryos im Stadium 17. Bild 1 zeigt drei abdominale Segmente (A1-A3). Man unterscheidet drei Hauptklassen von Gliazellen, die sich in einzelne Subtypen aufteilen. Die Einteilung erfolgte nach Position und Morphologie der Zellen (Ito et al., 1995). Der Farbcode der einzelnen Glia-Subtypen ist in der Legende wiedergegeben. Erläuterungen im Text. Mit freundlicher Unterstützung von Ruth Beckervordersandforth.

Die Markierung eines gesamten Zellstammbaumes offenbart die klonale Zuordnung einzelner Gliazellen, die von einem embryonalen NGB generiert werden. Eine Methode hierbei ist die direkte Markierung der neuralen Vorläuferzellen mit dem lipophilen Fluoreszenzfarbstoff DiI (1,1'-Dioctadecyl-3,3,3',3'-tetramethylindocarbocyanid-perchlorat). Eine Photokonvertierung der fixierten Präparate ermöglicht am Ende der Neurogenese die Analyse des ausdifferenzierten Zellstammbaumes *in vivo* (beschrieben in Bossing und Technau, (1994). Auf diese Weise entstand eine Karte wildtypischer Referenzklone, in der fast alle NBs mit ihrem vollständigen Zellstammbaum für ein Hemineuromer schematisch dargestellt sind. In Abbildung 1.8 ist durch farbige Umrandung der NB-Zellstammbäume dargestellt, welche Glia-Zelltypen von welchem NB

generiert werden. Manche Vorläuferzellen bringen nur eine Klasse von Gliazellen hervor, wie z. B. der als longitudinale Glioblast bezeichnete GP („glial precursor“), aus dem die auf den Konnektiven liegenden longitudinalen Gliazellen stammen. Im Gegensatz dazu generiert der NB7-4 neben den beiden „Surface-associated glia“ Unterklassen der SPG und CG auch CBG, die zu den „Cortex-associated glia“ zählen. Viele der NBs generieren in abdominalen Segmenten unterschiedliche Zellklone im Vergleich zu ihrem thorakalen Pendant. Am Beispiel des NB6-4 möchte ich diese sogenannte „Tagma-Spezifität“ erläutern. Während er sich im Thorax wie ein NGB verhält und eine gemischte Linie aus Neuronen und Gliazellen hervorbringt (NB6-4t), generiert er in abdominalen Segmenten eine rein gliale Zell-Linie (NB6-4a). Im Einzelnen produziert er in thorakalen Segmenten 3 Gliazellen: die 2 medial nah der ML gelegenen CBG, die deswegen auch "medialmost-CBG" (MM-CBG) genannt werden, und eine "medial-CBG" (M-CBG), sowie 5-6 Neurone. Der abdominale Zellstammbaum des NB6-4a entspricht einem GB mit nur 2 Gliazellen, eine M-CBG und eine MM-CBG. Diese Karte ist nicht vollständig, da nur für 30 Gliazellen der entsprechende NB zurückverfolgt werden konnte, worin die EG/PG enthalten sind.



Abbildung 1.9 Zellstammbäume mit Gliazellen

Gezeigt sind alle bekannten NB-Zellstammbäume, die Gliazellen produzieren. Die farbige Umrandung gibt entsprechend der Legende an, welche glialen Subtypen der jeweilige NB hervorbringt.

1.4. Funktion von Gliazellen

Während in *Drosophila* Gliazellen deutlich in der Anzahl den Neuronen unterlegen sind, ist das Verhältnis im Nervensystem der Säuger zu Gunsten der Gliazellen genau umgekehrt. Doch trotz der zahlenmäßigen Überlegenheit war dieser Zelltyp lange Zeit nur von sekundärer Bedeutung, während Neurone intensiv erforscht wurden. Früher wies man den Gliazellen lediglich eine stützende Funktion zu, die die Neurone zusammenhalten sollten. Daher stammt auch der Begriff „Glia“ von dem griechischen Wort für Leim ab (Virchow, 1858). Erst durch die Arbeit der letzten Jahre wurde die Wichtigkeit der Gliazellen für den Aufbau und die Funktion des Nervensystems entdeckt. In Vertebraten besitzen Astrozyten, wie Nervenzellen, Ionenkanäle und Rezeptoren, wodurch sie die Interaktionen mit den Neuronen herstellen und an der Informationsverarbeitung beteiligt sind. Die Oligodendrozyten bilden die isolierende Schicht für die Axone im ZNS, das Myelin, durch die die Nervenimpulse weitergeleitet werden. Im PNS wird diese Funktion von den vergleichbaren Schwannschen Zellen übernommen. Die Zerstörung dieser Myelinschicht, wie sie bei der Krankheit Multiple Sklerose vorliegt, führt zu Körperlähmungen, da die Signal-Verbindung zwischen Gehirn und Rückenmark unterbrochen ist. Die dritte Klasse der Mikroglia stellt das Immunsystem des ZNS dar. Sie erkennen u. a. mikrobiologische Eindringlinge und können sie als Makrophagen (Freßzelle) eliminieren.

Während die unterschiedlichen Glia-Typen der Vertebraten eine morphologische, wie auch eine funktionelle Klassifizierung besitzen, ist für die Glia-Subtypen in *Drosophila* eine Übereinstimmung der morphologischen Einteilung mit einer funktionellen Rolle noch unbekannt. Allerdings zeigen sich bezüglich der Funktionen der Vertebraten Glia einige Parallelen mit den Gliazellen der Insekten, wie z. B. die Entfernung apoptotischer Zellen als Makrophagen oder die isolierende Schicht der Axone. Im weiteren möchte ich nun einige beschriebene Funktionen der Gliazellen in *Drosophila* kurz zusammenfassen.

Eine Aufgabe von Gliazellen, die auch in Vertebraten von diesem Zelltyp erfüllt wird, ist der Aufbau einer Bluthirnschranke, die in Insekten das Gehirn vor der hohen Kalium-Konzentration der Hämolymphe schützt. Hier spielt vor allem die Untergruppe der subperineurial Glia eine entscheidende Rolle. Sie besitzen lange Fortsätze, die sogenannte "septate junctions" ausbilden und so das Nervensystem abdichten. Neueste Veröffentlichungen zeigen, daß G-Protein gekoppelte Rezeptoren, die in diesem glialen

Subtyp exprimiert werden, eine zentrale Rolle in der Bildung der Bluthirnschranke einnehmen (Schwabe *et al.*, 2005). Neben der bereits bekannten Funktion als Wegweiser für wachsende Axone, wie z. B. für das Pionier-Neuron aCC (Sepp *et al.*, 2001), spielen Gliazellen auch eine wichtige Rolle bei apoptotischen Prozessen der Axone, indem sie spezifisch zu „Mushroom-body“ Neuronen vor ihrer Fragmentierung rekrutiert werden und dort Axone durch Endocytose umschließen und abbauen (Awasaki und Ito, 2004; Watts *et al.*, 2004).

Die am Ende der Embryogenese geborenen larvalen und pupalen NBs produzieren in späten larvalen Stadien Neurone und Gliazellen, die später den Aufbau des adulten Gehirns mitbestimmen. Während der frühen larvalen Phase sind diese NBs jedoch ruhig gestellt (Truman und Bate, 1988). Dabei umhüllen larvale Gehirn-Glia die NBs und exprimieren das Glykoprotein Anachronism (Ana), das die Proliferation der NBs unterdrückt (Ebens *et al.*, 1993). Neben dieser temporären Reprimierung, sorgen die Gliazellen auch wieder für die Teilungen der NBs am Ende der larvalen Phase. Hier konnte gezeigt werden, daß sowohl Gliazellen als auch proliferierende NBs und ihre Nachkommen *Drosophila* E-cadherin (DE-cadherin) exprimieren. Die Expression eines dominant-negativen DE-cadherin Konstruktes in diesen Gliazellen resultierte in einer reduzierten mitotischen Aktivität der NBs. Somit scheint DE-cadherin lokal die Proliferation der NBs zu fördern (Dumstrei *et al.*, 2003). Diese Beobachtungen lassen auf eine Funktion der larvalen Gehirn-Glia in der temporären Regulation der NB-Teilungen schließen.

Dies sind nur einige Funktionen von Gliazellen, die bei der Entwicklung und der Struktur des zentralen und peripheren Nervensystems eine wichtige Rolle spielen. Trotz immer neu erforschter Aufgaben, die Gliazellen im Nervensystem von Invertebraten und Vertebraten erfüllen, ist in den meisten Fällen unklar, ob und wie Gliazellen in diesen Prozessen mit Neuronen interagieren.

1.5. Ziel dieser Arbeit

Im Mittelpunkt dieser Arbeit steht die Identifizierung und Charakterisierung *gcm*-abhängiger Gene in *Drosophila*. Im Gegensatz zu der beschriebenen Expression und den vielseitigen Funktionen von *gcm* sind bisher nur wenige direkte oder indirekte Zielgene von *gcm* identifiziert. Die Sequenzierung des Fruchtfliegen-Genoms im Jahre 2000 und die Methode der Microarray-Experimente ermöglichte eine Genom-weite Suche nach Zielgenen von *gcm*. Im Verlauf dieser Arbeit erschienen zwei Publikationen, in denen

ebenfalls die Identifizierung glialer Gene im Mittelpunkt stand (Egger *et al.*, 2002; Freeman *et al.*, 2003). Die erste Veröffentlichung von Egger *et al.* stellt eine reine Microarray-Studie dar, die die ektopische Expression von *gcm* in den zwei embryonalen Stadien 11 und 15/16 mit dem Wildtyp vergleicht. Es wurde eine Liste von mehr als 400 (Stadium 11) bzw. 1259 (Stadium 15/16) potentiellen glialen Genen veröffentlicht. Für keines dieser ca. 1500 Gene konnte eine Regulation durch *gcm* oder eine Expression in Gliazellen nachgewiesen werden. Im Gegensatz dazu erweiterten Freeman *et al.* ihr Microarray-Experiment, das ebenfalls die ektopische Expression von *gcm* im embryonalen Stadium 12/13 untersucht, um eine computergestützte Vorhersage von *gcm*-Zielgenen aufgrund von *gcm*-Bindestellen und eine Datenbank Suche nach Glia-spezifischen Genen. Durch diese kombinierten Ansätze konnten ca. 40 neue gliale Gene identifiziert werden. Der verwendete Microarray enthielt nur ca. ein Drittel aller zu diesem Zeitpunkt vorhergesagten Gene (4386 Gene) für *Drosophila*. Der Vergleich der beiden Publikationen zeigte nur eine sehr geringe Schnittmenge innerhalb der Ergebnisse.

Aus diesem Grund wurde im Rahmen dieser Arbeit zusammen mit meinem Betreuer Benjamin Altenhein eine erneute Genom-weite Suche nach *gcm*-abhängigen Zielgenen durchgeführt, die sich durch verschiedene Neuerungen und Verbesserungen auszeichnet. Durch eine Kollaboration mit der Arbeitsgruppe von Prof. J. Hoheisel am Deutschen Krebsforschungszentrum (DKFZ, Heidelberg) erhielten wir einen DNA-Chip („FlyArray“), der das heute bekannte Genom von *Drosophila* mit mehr als 21.000 Genen umfaßt (Hild *et al.*, 2003). Das Microarray-Experiment besteht aus zwei antagonistischen Ansätzen, der ektopischen Expression von *gcm*, im weiteren Verlauf als GOF (*gain-of-function*) abgekürzt, und dem Funktionsverlust von *gcm*, die jeweils mit der Wildtyp-Situation verglichen wurden. Die erstmalige Untersuchung einer *gcm* Funktionsverlust Mutante, die im folgenden als LOF (*loss-of-function*) bezeichnet wird, könnte die Identifizierung neuer glialer Gene möglich machen, die in den veröffentlichten GOF-Experimenten nicht gefunden werden konnten. Um einen Eindruck der Gliogenese und den daran beteiligten Gene im temporalen Kontext zu erhalten, wurden für beide Ansätze Zeitverlaufs-Experimente durchgeführt, die den Zeitraum der Gliogenese in *Drosophila* umfassen (Abb. 1.10). Die Durchführung in Form eines durchgängigen Zeitverlaufsexperimentes lieferte Regulationsprofile für jedes untersuchte Gen und sollte somit einen zeitlichen Einblick in die Gliogenese und eine Unterscheidung zwischen direkten und indirekten Zielgenen von *gcm* ermöglichen.

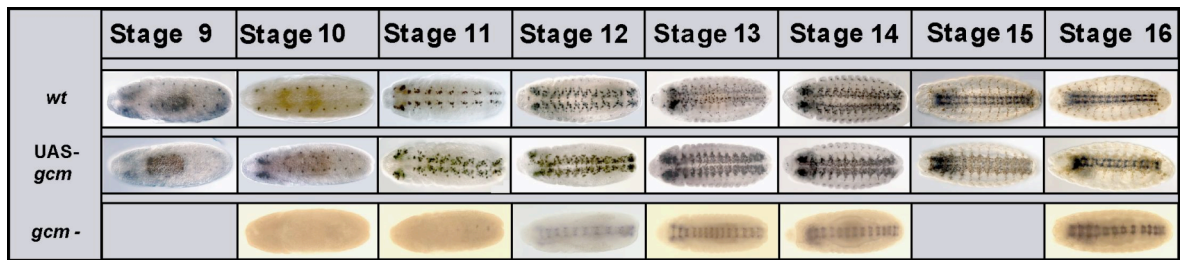


Abbildung 1.10 Stadienübersicht des Microarray-Experimentes

Dargestellt sind die einzelnen embryonalen Entwicklungsstadien, die den beiden antagonistischen Versuchsansätzen zu Grunde liegen. Eine Antikörperfärbung gegen das gliale Markerprotein Repo zeigt den Verlauf der Gliogenese in Wildtyp-Embryonen (*wt*). Während in den ektopischen Überexpressionsmutanten (UAS-*gcm*) ein Überschuss an Gliazellen auf Kosten von Neuronen sichtbar wird, sind in der *gcm* Funktionsverlustmutante (*gcm*-) nahezu keine Gliazellen mehr sichtbar. Zusätzlich sind alle Axone mit dem Marker BP102 angefärbt. Bei allen Bildern sieht man eine ventrale Aufsicht auf das ZNS, anterior ist links.

Im Laufe der Microarray-Auswertung wurden verschiedene Filterschritte variabel eingesetzt, um *gcm*-abhängige Gene identifizieren zu können. Die gefilterten, potentiellen Kandidaten-Gene wurden anschließend durch *in situ* Hybridisierung (ISH) an *wt*-Embryonen verifiziert. Um die auf dem Microarray festgestellte Regulation durch *gcm* im Embryo zu zeigen, wurden ISH an *gcm*-Überexpressionsmutanten (UAS-*gcm*) und *gcm*-Funktionsverlustmutanten (*gcm*⁻) durchgeführt.

Eine zelluläre und regulatorische Analyse stellen erste Schritt zur Charakterisierung der identifizierten Gene dar. Am Beispiel von 12 Genen, die zu gleichen Teilen aus der GOF und LOF stammen bzw. antagonistisch reguliert waren, wird die gliale Expression auf Einzelzellebene beschrieben. Zusätzlich wird die Abhängigkeit dieser Gene von bekannten *gcm*-Zielgenen untersucht. Hierfür wurden ISH in den Funktionsverlustmutanten von *repo*, *pnt* und *ttk* durchgeführt. Die Suche nach *gcm*-Bindestellen innerhalb des Enhancerbereiches der Kandidatengene, die auf eine direkte Regulation durch *gcm* hinweisen, ist ein weiterer Schritt in dieser regulatorischen Analyse.

2. Material und Methoden

2.1. Modellorganismus *Drosophila melanogaster*

2.1.1. Fliegenzucht

Die Fliegen werden auf *Drosophila* Standardmedium in wieder verwendbaren Kulturgefäßen (Ø 25 und 50 mm) aus Kunststoff gehalten, die mit luftdurchlässigen Schaumstoffstopfen verschlossen sind. Stämme, die nicht für Experimente benutzt werden, gehören zur so genannten Stammsammlung und werden auf 18°C gehalten. Fliegen, die für Experimente verbreitert werden, stehen in einem auf 25°C temperierten Raum und werden alle drei Tage auf neue Kulturgefäße umgeschüttelt. Hierbei liegt die Generationsdauer bei etwa 2 Wochen, was allerdings je nach Stamm leicht variieren kann.

2.1.2. Fliegenstämme

Es wurden folgende Stämme zur Anfertigung dieser Arbeit verwendet:

Tabelle 2.1 Verwendete Fliegenstämme

Wildtyp-Stamm	Herkunft/ Referenz
<i>OregonR</i>	Stammsammlung AG Technau
mutante Stämme	
<i>gcm</i> ^{N7-4}	Bloomington Stock B-#4104; (Vincent <i>et al.</i> , 1996)
<i>Def(2L)200</i>	<i>gcm/gcm2</i> Mutante, FBab0022176;
<i>pnt</i> ^{M254}	Bloomington Stock B-#11724; (Klämbt, 1993)
<i>repo</i> ²	Bloomington Stock B-#11604; (Halter <i>et al.</i> , 1995)
<i>ttk</i> ^{1e11}	Bloomington Stock B-#4164; (Giesen <i>et al.</i> , 1997)
<i>repo</i> ² , <i>pnt</i> ^{M254}	Dr. Olaf Vef, AG Technau
<i>repo</i> ² , <i>ttk</i> ^{1e11}	Dr. Olaf Vef, AG Technau
<i>repo</i> ² , <i>pnt</i> ^{M254} , <i>ttk</i> ^{1e11}	Dr. Olaf Vef, AG Technau

Gal4-Stämme	
<i>Mz1060-Gal4</i>	Stammsammlung AG Technau
UAS-Stämme	
UAS- <i>gcm</i>	Bloomington Stock B-#5446
Balancer Chromosomen	
<i>Kr-GFP</i>	Bloomington Stock B-#5194; (Casso <i>et al.</i> , 2000)
<i>Ubi-GFP</i>	Bloomington Stock B-#4888; (Casso <i>et al.</i> , 1999)
TM3, twist-GFP	Dr. Olaf Vef, AG Technau
TM6b, abdA-lacZ	V-891, Dr. Olaf Vef, AG Technau

2.1.3. Verwendung von Balancer-Chromosomen

Mutationen, die im homozygoten Zustand Letalität hervorrufen und innerhalb weniger Generationen verloren gehen würden, können mit Hilfe so genannter Balancer-Chromosomen heterozygot langfristig erhalten werden. Diese Balancer-Chromosomen tragen vielfältige Aberrationen, die eine Rekombination verhindern und dabei gleichzeitig Letalfaktoren, die nur heterozygoten Fliegen das Überleben erlauben. Ein weiterer Vorteil von Balancer-Chromosomen ist der Besitz von Markergenen. Hier unterscheidet man hauptsächlich zwei Arten, so genannte „Blue-“ oder „Green-“ Balancer. „Blue-Balancer“ tragen das Reportergen *lacZ*, das durch eine Antikörperfärbung (2.3) sichtbar gemacht werden kann. Bei „Green-Balancern“ wurde das *lacZ* durch das aus der Qualle stammende grün fluoreszierende Protein (GFP) ersetzt. Hier kann auf eine histochemische Färbung, die ein Abtöten des Embryos bzw. der Fliege zur Folge hat, verzichtet werden und *in-vivo* unter Fluoreszenz-Licht zwischen heterozygoten und homozygoten Tieren unterschieden werden.

2.1.4. Kreuzungen

Um jungfräuliche Fliegen von einem der beiden Ausgangsstämme zu erhalten, entfernt man alle adulten Fliegen von einem Kulturgefäß. Die danach frisch schlüpfenden Fliegen werden alle 3-4 Stunden über Tag bei Haltung auf 25°C mit CO₂ betäubt und die

weiblichen, jungfräulichen Fliegen separat in einem Kulturgefäß gesammelt. Diese Zeitintervalle verhindern eine Begattung durch gleichzeitig geschlüpfte Männchen, die in dieser kurzen Zeit keine Geschlechtsreife entwickeln konnten. Über Nacht werden die Fliegenröhrchen bei 12°C aufbewahrt, was ebenfalls die Jungfräulichkeit der Weibchen für bis zu 18 Stunden sicherstellt. Wenn genügend weibliche Fliegen gesammelt wurden, können sie mit Männchen des anderen Ausgangsstammes verpaart werden, wobei Männchen zu Weibchen in einem Verhältnis von 1:3 zusammengesetzt werden.

2.1.5. Das UAS/Gal4 System

Das UAS/Gal4 System nach Brand und Perrimon (Brand, 1993) erlaubt eine gerichtete räumliche und zeitliche Genexpression in der Fruchtfliege. Hierzu benötigt man zwei Fliegenstämme, die beide spezifische P-Elemente (transposable Elemente) tragen, die künstlich der Fliege injiziert wurden und sich im Genom an zufälligen Stellen inseriert haben. In der folgenden Abbildung sind die beiden Ausgangsstämme der Parental-Generation als P1 und P2 bezeichnet. Die Gal4- oder Treiberlinie enthält ein P-Element, das für das aus der Hefe stammende Galaktosidase-Gen (Gal4) codiert. Gal4 ist ein Transkriptionsfaktor, der für die Transkription von Enzymen des Galactose-Stoffwechsels zuständig ist und dabei an UAS-Sequenzen bindet (upstream activating sequences). Das Gal4 befindet sich unter der Kontrolle eines endogenen Enhancers und wird in spezifischen Geweben oder Zellen zu einem bestimmten Zeitraum der Entwicklung von *Drosophila* exprimiert, in denen der Enhancer aktiv ist. Der zweite Fliegenstamm enthält ein P-Element mit UAS-Sequenzen und dem gewünschten GenX, das ektopisch im Muster des gewählten endogenen Enhancers der Gal4-Linie exprimiert werden soll. Die Verkreuzung dieser zwei Stämme führt zur Expression des Galaktosidase-Gens, das an die UAS-Sequenz bindet und so die Expression von GenX im räumlichen und zeitlichen Muster des Enhancers bewirkt. Auf diese Weise können die Folgen einer künstlichen Genexpression in verschiedenen Geweben oder Zellen zu unterschiedliche Zeiten angefärbt und untersucht werden.

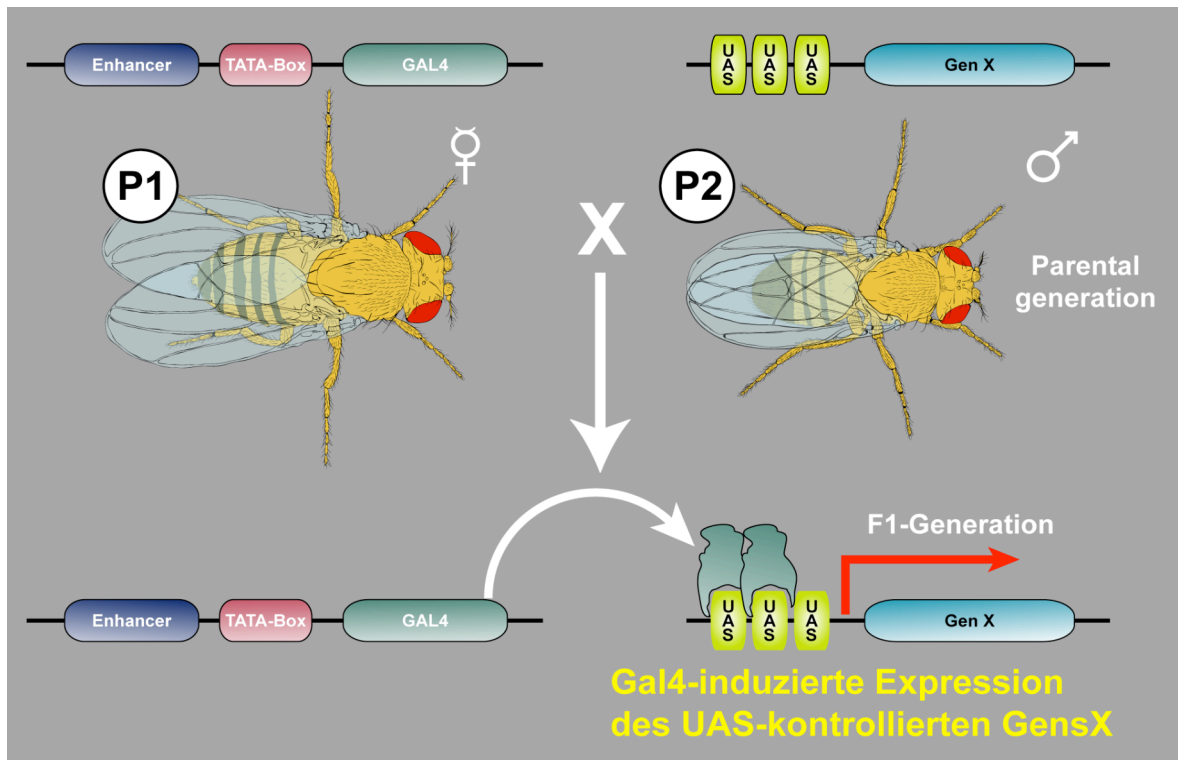


Abbildung 2.1 Das UAS/Gal4 System nach Brand und Perrimon 1993

Der erste Fliegenstamm (P1), der ein für Gal4 kodierendes P-Element trägt, wird mit einem zweiten Stamm (P2) verkreuzt, der ein transposables Element mit der UAS-Sequenz vor einem GenX besitzt. Das Gal4, das unter der Kontrolle eines endogenen Enhancers steht, wird nun in den Zellen der F1-Generation exprimiert, in denen der Enhancer aktiv ist. Gal4 bindet an die UAS-Sequenz und dadurch wird das gewünschte GenX in diesen Zellen ektopisch exprimiert. Abbildung mit freundlicher Genehmigung von C. Berger.

2.1.6. Apfelagar-Röhrchen zur Eiablage

Für Apfelagar-Röhrchen wird 1 Liter handelsüblicher Apfelsaft mit 28 g gelöstem Agar-Agar aufgekocht und ca. 1 cm dick in Kulturgefäße gegossen. So können die Ablageröhrchen gekühlt bei 4°C bis zu 4 Wochen verwendet werden.

2.1.7. Eiablage

Drei Tage vor der Eiablage werden die Fliegen in Kulturgefäßen mit Trockenhefe als Stimulans zur Eiablage angefüttert, bevor sie dann auf Apfelagar-Ablageröhrchen umgesetzt werden. Diese Fliegen werden in speziell dafür vorgesehene Inkubatoren (18°C, 25°C oder 29°C) gestellt. Das Alter der Fliegen sollte hierbei nicht jünger als 3 Tage und nicht älter als 2 Wochen sein. Für immunhistochemische Färbungen werden Übernachtablagen verwendet, damit ein breites Spektrum an Entwicklungsstadien betrachtet werden kann. Um eine homogene Ablage eines Entwicklungsstadiums zu erhalten, werden Stundenablagen auf 25°C genommen und anschließend für unterschiedlich lange Zeitdauer auf 18°C, 25°C bzw. 29°C inkubiert, bis das gewünschte

Stadium erreicht ist. In der Regel wird hier die erste Ablage eines Tages nicht verwendet, da die Entwicklungsstadien dieser Eiablage zu heterogen sind.

Tabelle 2.2 Temperaturabhängige Entwicklungszeiten

Entwicklungsstadium nach (Hartenstein und Campos-Ortega, 1985)	Inkubation bei 18°C 60min. ~ 120min.	Inkubation bei 25°C	Inkubation bei 29°C 60 min. ~ 45min.
9	440-520 min.	220-260 min.	176-208 min.
10	520-640 min.	260-320 min.	208-256 min.
11	640-880 min.	320-440 min.	256-352 min.
12	880-1240 min.	440-620 min.	352-496 min.
13	1240-1360 min.	620-680 min.	496-544 min.
14	1360-1560 min.	680-780 min.	544-624 min.
15	1560-1920 min.	780-960 min.	624-768 min.
16	1920-2520 min.	960-1260 min.	768-1008 min.

2.1.8. Massen-Eiablagen

Da für ein Microarray-Experiment mit statistischen Wiederholungen und ohne Amplifizierung über molekulare Techniken große Mengen an Ausgangsmaterial (Gesamt-RNA) benötigt werden, werden zur Eiablage spezielle Fliegenkäfige benutzt. Die Apfelagarplatte hat hierbei einen Durchmesser von 12 cm und die Höhe des Käfigs beträgt 30 cm. Die Oberseite des Käfigs ist mit einem luftdurchlässigen Gitternetz versehen. Die Platten werden mit Hefe bestrichen, die täglich frisch aus Trockenhefe und Wasser zu einem Brei angerührt wird. Es werden ca. 30 große Kulturgefäße (Ø 50 mm) mit Fliegen in einen Käfig gegeben. Die Fliegenkäfige werden bei 25°C aufbewahrt und die Apfelagarplatten stündlich gewechselt. Für die Experimente der GOF werden die Stundenablagen anschließend bei 29°C inkubiert, die eine maximale ektopische Expression der Kreuzungen mit dem UAS/Gal4 System bewirkt. Für die LOF hingegen werden die Stundenablagen in der Regel bei 18°C inkubiert, wodurch weitere Arbeitsschritte auf den folgenden Tag verschoben werden konnten. Die genauen Inkubationszeiten und Stadien beider experimenteller Ansätze sind in der nächsten Tabelle vermerkt.

Tabelle 2.3 Inkubationszeiten der Stundenablagen

Stadium	GOF	Stadium	LOF
spät 9	3 Stunden bei 29°C		
früh11	4 Stunden bei 29°C	spät 10	5 Stunden bei 25°C
spät 11	5 Stunden bei 29°C	früh 11	6 Stunden bei 25 °C
früh 12	6 Stunden bei 29°C	spät 12	18 Stunden bei 18°C
spät 12	7 Stunden bei 29°C	spät 14	20 Stunden bei 18°C
früh 14	8 Stunden bei 29°C	15	22 Stunden bei 18°C
früh 15	9 Stunden bei 29°C	früh 16	24Stunden bei 18°C
früh 16	10 Stunden bei 29°C	früh 17	29 Stunden bei 18°C

2.1.9. Automatisiertes Sortieren von Embryonen

Auf Apfelagarplatten gesammelte Embryonen werden nach der Inkubation mit 7,5%iger Chlorbleichlauge (15%ige Stammlösung verdünnt mit Wasser) überschichtet und nach 2 min. mit Hilfe eines Trichters, der eine Gaze als Auffangnetz am Ende trägt, eingespült. Dieser Vorgang löst chemisch die Chorionhülle ab, die sich als Schutzhülle um den Embryo befindet. Nach mehrmaligem Nachspülen mit frischem Wasser, werden die dechorionisierten Embryonen mit einem Skalpell vorsichtig aus der Gaze entnommen und in ein Gefäß mit 3%iger PBTween-Lösung überführt. Das Detergenz verhindert ein Zusammenkleben der Embryonen während des Sortiervorgangs. Gleichzeitig stoppt die Flüssigkeit die Entwicklung, hat jedoch für die kurze Dauer des Experiments keine schädliche Wirkung auf den Embryo und sein Wachstum (Furlong *et al.*, 2001). Das Sortieren der Embryonen erfolgt in einem CopasTM Select Embryo Sorter (Union Biometrica, Somerville, MA, USA), der auf einem ähnlichen Prinzip wie die FACS (fluorescence activated cell sorting) Analyse beruht. Die nach Stadien gesammelten Embryonen werden in eine Sammelkammer mit Magnetrührer gegeben. Durch Verschließen der Kammer und mit Hilfe einer peristaltischen Pumpe werden die Embryonen positioniert in einem Flüssigkeitsstrom an zwei Lasern vorbeigeführt. Ein Argon Laser, der eine Anregungswellenlänge von 488 bzw. 514nm besitzt, kann je nach Einstellung drei verschiedene Fluoreszenzen anregen. Hier wird gleichzeitig die natürliche Autofluoreszenz des Embryos, die hauptsächlich durch den Darm hervorgerufen wird, als auch die gewünschte GFP-Fluoreszenz gemessen. Es folgt ein roter Laser (670 nm), der die Größe sowie die optische Dichte des Objektes im Strahlengang mißt. Hier kann zwischen Embryonen und Verunreinigungen, z. B. Luftblasen, unterschieden werden. Der

angeschlossene Computer trennt die GFP-leuchtenden von den nicht leuchtenden Embryonen durch die Regulation eines Luftstromes. Dabei werden die Embryonen, die verworfen werden sollen, durch einen gebündelten Luftstrahl aus dem Strom des Sortiermediums abgelenkt. Zur Bestimmung, welche Embryonen-Population verworfen und welche behalten werden soll, sowie zur Einstellung der richtigen Embryonenkonzentration im Sortiermedium, wird zuerst ein Sortiervorgang mit wenigen Embryonen durchgeführt und am Computer bestimmt, welche Population behalten werden soll. Die positiv sortierten Embryonen werden in einem Auffangbehälter gesammelt. Zur Sicherheit werden Embryonen, die am Strahlengang zu schnell aufeinanderfolgten, automatisch verworfen. Aus diesem Grund wurde von uns eine Änderung des Gerätes vorgenommen und ein Auffangsieb in den Abfallbehälter gebaut, so daß die verworfenen Embryonen ein zweites Mal sortiert werden konnten. Eine Beschreibung der Balancerchromsomen und das Sortieren der *gcm^{N7-4}* Mutanten ist in Kapitel 3.1.4 zu finden. Die Embryonen werden anschließend sofort mit flüssigem Stickstoff schockgefroren und können bei -80°C bis zur RNA-Präparation aufbewahrt werden.

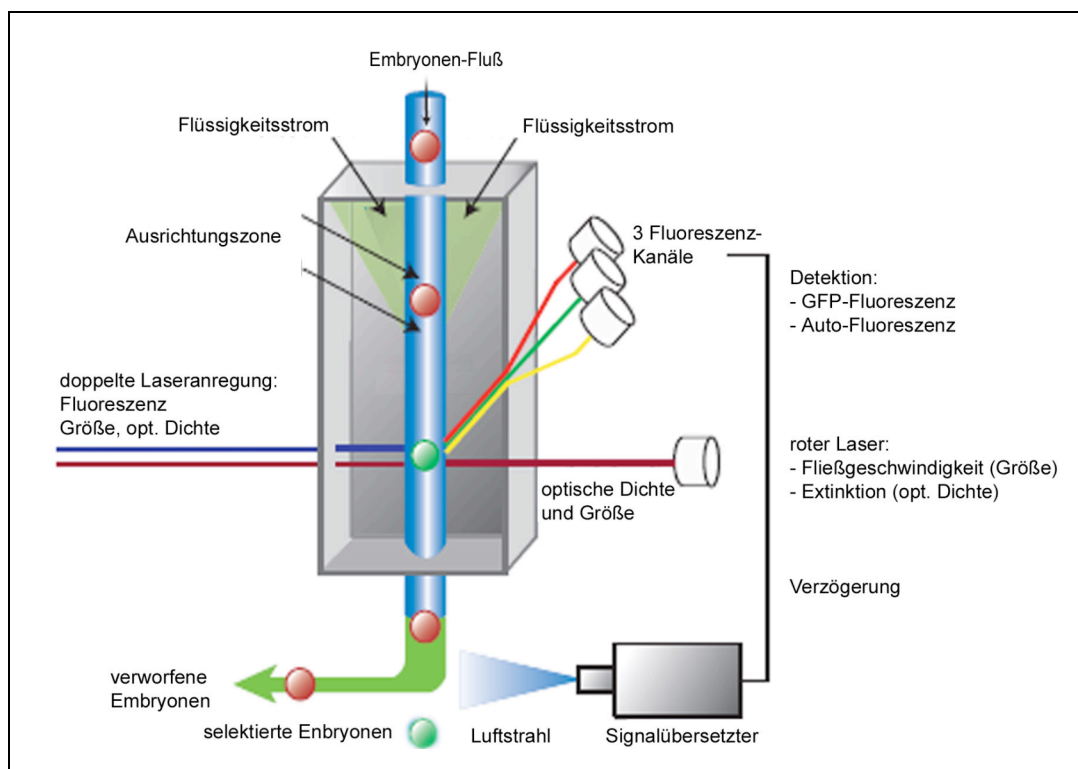


Abbildung 2.2 Automatisiertes Sortieren von mutanten Embryonen

Das Bild zeigt den Aufbau eines Embryo-Sortiers (www.unionbiometrica.com). Dechorionisierte Embryonen werden in 3%igem PBTween in eine Embryo-Kammer gegeben. Die Embryonen passieren ausgerichtet im Flüssigkeitsstrom einen Argonlaser (Detektion), der sowohl die GFP-Fluoreszenz als auch die Auto-Fluoreszenz anregt. Weiterhin passieren die Embryonen einen roten Laser, der die Größe und die opt. Dichte des Objektes im Strahlengang berechnet. Aufgrund der Messungen wird ein gebündelter Luftstrom reguliert, der die GFP-leuchtenden Embryonen (roter Ball) aus dem Flüssigkeitsstrom ablenkt und sie verwirft. Embryonen ohne GFP (grüner Ball) werden in einem Auffangbehälter gesammelt.

2.1.10. Herstellung von Doppel- und Tripelmutanten

Die Veröffentlichung von Yuasa et al., 2003 (Yuasa *et al.*, 2003) zeigt, daß die durch *gcm* aktivierten Gene *reverse polarity (repo)*, *pointed (pnt)* und *tramtrack (ttk)* koordiniert zusammenarbeiten, um gliale Differenzierung zu regulieren. Um Doppel bzw. Tripelmutanten dieser drei Gene zu erzeugen, wurden die letalen und daher balancierten Einzelmutanten *repo*², *pnt*^{M254} und *ttk*^{le11} untereinander verkreuzt. Die drei Gene befinden sich alle auf dem dritten Chromosom in den Abschnitten 90F9-10, 94E10-13 und 100D1. Es ist bekannt, daß bei einer Entfernung von 40 Banden Rekombination mit einer Wahrscheinlichkeit von 100% stattfindet. Hieraus erwarten wir eine 10%ige (*repo-pnt*), eine 15%ige (*pnt-ttk*) bzw. eine 25%ige (*repo-ttk*) Häufigkeit von Rekombinationsereignissen. Alle Ausgangsstämme liegen als heterozygot balancierte Stämme vor, die ein TM3 (third multiple 3)-Balancerchromosom mit dem Marker-Gen *stubbled* besitzen und phänotypisch an verkürzten Borsten auf dem ersten thorakalen Segment zu erkennen sind. Im folgenden werden die einzelnen Kreuzungsschritte der *repo*, *pnt* Doppelmutante erklärt (Abbildung 2.3). Die gleichen Schritte wurden parallel für die beiden anderen Doppelmutanten durchgeführt. Die über TM3 balancierten Einzelmutanten werden miteinander verkreuzt und aus der F1-Generation werden ca. 50 Jungfrauen gesammelt, die nicht den *stubbled*-Marker tragen. Es ist entscheidend, daß Jungfrauen gesammelt werden, da Rekombination nur in der weiblichen Keimbahn bei *Drosophila* auftritt. Diese Weibchen werden verteilt in 2-3 großen Kulturgefäßen mit ca. 10 TM3/TM6b (third multiple 6b) doppelbalancierten Männchen verkreuzt. In der folgenden F2-Generation könnte man nun sowohl TM3-balancierte Tiere sammeln, die an dem Borsten-Phänotyp zu erkennen sind, als auch TM6b-balancierte Tiere sammeln, die als Marker das Gen „humoral“ tragen. Die phänotypische Ausprägung dieses Gens zeigt sich in zusätzlichen Borsten auf dem humoralen Segment anstatt der wildtypischen 3 Borsten. Zur Vereinfachung der Erklärung, fahre ich nur mit dem Absammeln und Verkreuzen von TM3-balancierten Tieren fort. Nachdem in der vorigen Generation die Rekombination stattgefunden hat, muß nun ein weiteres Ereignis verhindert werden. Dafür werden bis zu 150 einzelne Männchen gesammelt, unter denen sich laut Statistik mind. 15 Tiere befinden, die aufgrund von Rekombination ein Chromosom besitzen, das sowohl die Mutation für das Gen *repo* als auch für das Gen *pnt* trägt. Nun wird ein sogenannter Komplementationstest durchgeführt. Ein solcher Test dient der Ermittlung von Positionen im Genom, die eine Mutation aufweisen. In unserem Fall kann damit festgestellt werden,

ob durch Rekombination eine Doppelmutante entstanden ist. Er beruht darauf, daß die Verkreuzung mit einem für dieses Gen mutanten Fliegenstamm die Mutation nicht ausgleichen (komplementieren) kann, da beide Chromosomen an der gleichen Stelle einen Defekt aufweisen. Die vereinzelt TM3-balancierten Männchen werden daher gleichzeitig mit TM3-balancierten Jungfrauen von *repo*-Mutanten und Jungfrauen von TM6b-balancierten *pnt*-Mutanten verkreuzt. Auf dem TM6b-Balancerchromosom befindet sich das Markergen *abdA-lacZ*, das später bei Antikörperfärbungen eine Unterscheidung zwischen heterozygoten und homozygoten Tieren ermöglicht. Während des Schlüpfens werden alle Fliegen, die den TM6b-Marker tragen, abgesammelt und zusammengesetzt. Erst nach dem vollständigen Durchschlüpfen der Kulturgefäße steht fest, ob es sich bei den TM6b gesammelten Fliegen um Doppelmutanten handelt. Fliegen, die eine Mutation für *repo* und *pnt* auf beiden homologen Chromosomen aufweisen, können nicht schlüpfen, da diese Mutation Letalität erzeugt. Befinden sich daher unter den schlüpfenden Fliegen Tiere ohne Marker der Balancerchromosomen TM3 bzw. TM6, so hat Komplementation stattgefunden, da diese transhomozygoten Fliegen lebensfähig sind. Die Kreuzung von Tripelmutanten wurde freundlicherweise von Dr. Olaf Vef durchgeführt. Leider konnte im Rahmen dieser Arbeit nach 2 Kreuzungsansätzen keine *pnt*, *ttk* Doppelmutante erzeugt werden und stand daher nicht für Analysen zur Verfügung.

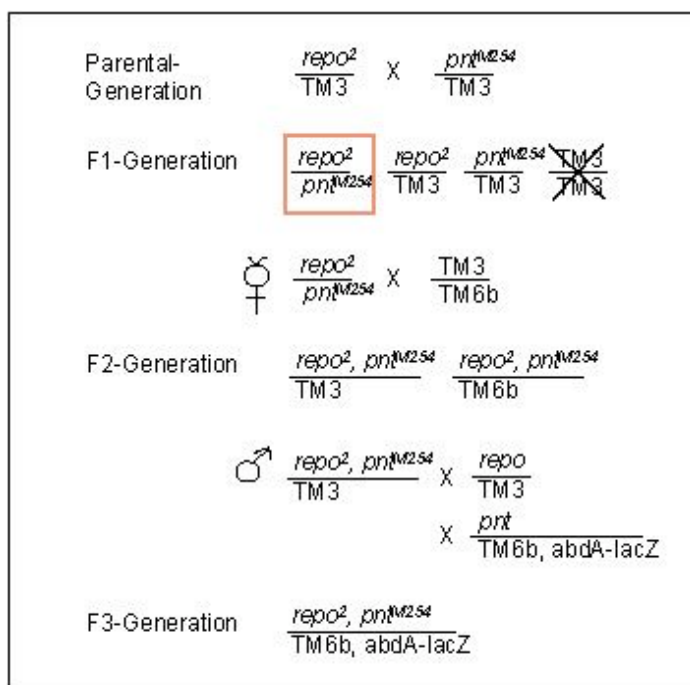


Abbildung 2.3 Herstellung der Doppelmutanten

Balancierte Einzelmutanten werden miteinander verkreuzt und aus der nächsten Generation Jungfrauen ohne Marker abgesammelt. Diese wiederum werden mit einem TM3/TM6b Balancerchromosom verkreuzt. Aus diesem Kreuzungsschritt, in dem die Rekombination stattfindet, werden TM3-tragende Männchen vereinzelt. Der anschließende Komplementationstest erfolgt mit unterschiedlichen mutanten Allelen von *repo* und *pnt*, balanciert über TM3 bzw. TM6b, *abdA-lacZ*.

2.2. Microarray-Technologie (DNA-Chips)

Die Technologie und Verwendung von Microarrays ist noch eine relative junge Technik, die in kurzer Zeit zahlreiche Anwendungen gefunden hat. Sie ermöglicht eine gleichzeitige, schnelle Untersuchung tausender Gene bezüglich ihrer Expression, dem Nachweis von DNA-Varianten (Polymorphismen, Mutationen) oder wird bei vergleichenden Analysen (z. B. Veränderungen der Genexpression in gesundem Gewebe im Vergleich zu Tumorgeweben) eingesetzt. Das Prinzip von Microarrays beruht darauf, daß komplementäre Nukleinsäuren miteinander hybridisieren. Als Trägermaterial wird, anstelle von Membranen wie bei einem Blot, ein speziell beschichteter Glasobjektträger verwendet, auf den 10-35 nl DNA-Lösung (z. B. PCR-Produkte, cDNAs oder Oligonukleotide) mit Hilfe von Robotoren aufgetragen werden. Sogenannte „high density Microarrays“ besitzen mehr als 30.000 Gene. So gibt es für *Drosophila* einen Microarray, der das gesamte Genom mit mehr als 20.000 Genen umfaßt und im Rahmen dieser Arbeit verwendet wurde. Nun wird RNA von zwei verschiedenen Quellen, die miteinander verglichen werden sollen (z. B. gesundes und Tumor-befallenes Gewebe), präpariert und während einer reversen Transkription in cDNA umgewandelt. Dabei werden die zu vergleichenden Gewebe mit verschiedenen Fluorochromen, meist Cyanin 3 und Cyanin 5 (Cy3 und Cy5) markiert und können anschließend gemeinsam auf dem Microarray hybridisiert werden. Eine Anbindung an die auf dem DNA-Chip aufgetragene, komplementäre Sequenz einer bzw. beider cDNAs führt zu unterschiedlichen Farbsignalen, die durch einen Laserscanner festgehalten und in Pixelwerte übertragen werden. Hierin läßt sich neben der Aussage, ob ein Gen nur in gesundem Gewebe oder auch im Tumorgewebe exprimiert wird oder umgekehrt, auch eine quantitative Aussage der Transkriptionsraten treffen. Der Fragestellung dieser Arbeit folgend, wurde die RNA von wildtypischen Embryonen unterschiedlicher Embryonalstadien mit mutanten Embryonen (ektopische Expression von *gcm*, *loss-of-function* von *gcm*) auf dem Microarray verglichen. In den folgenden Absätzen werden die einzelnen Schritte des Experimentes erläutert. Die folgende Abbildung zeigt allgemein die Durchführung von Microarray-Experimenten auf einen Blick.

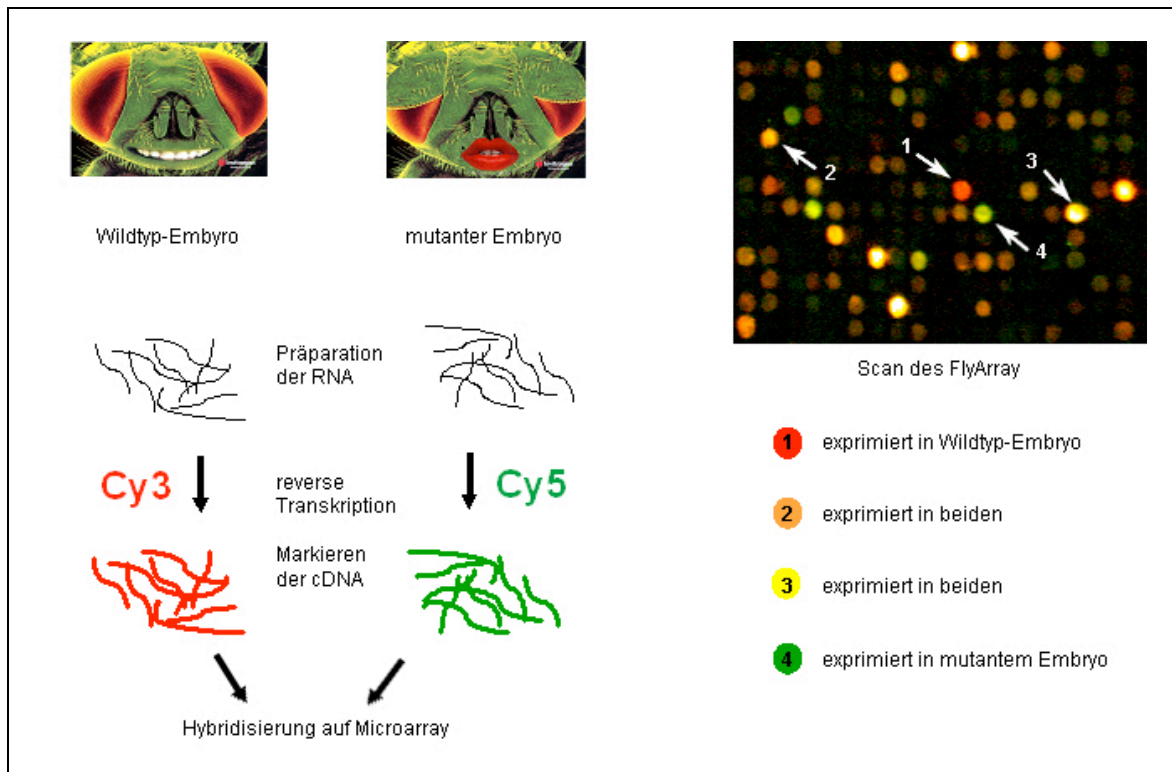


Abbildung 2.4 Microarray-Technik

Die RNA von zwei genotypisch unterschiedlichen Embryonen wird präpariert und revers transkribiert. Anschließend werden die cDNAs mit unterschiedlichen Fluorochromen (Cy3 und Cy5) markiert und gemeinsam auf dem Microarray hybridisiert. Nach dem Scannen des Microarray erfolgt die Analyse, ob und wie stark ein Gen nur im Wildtyp, nur in der Mutante oder in beiden Genotypen exprimiert wird

2.2.1. Der FlyArray

In Kollaboration haben die Gruppen von J. Hoheisel (DKFZ, Heidelberg), M. Vingron (MPI für Molekulare Genetik, Berlin), F. Sauer (ZMBH, Heidelberg) and R. Paro (ZMBH, Heidelberg) einen DNA-Microarray entwickelt, der das gesamte Genom von *Drosophila* umfaßt. Dafür kombinierte man die BDGP cDNA Kollektion (BDGC) Veröffentlichung 1 und die BDGP Genom Annotierung Veröffentlichung 2, die zusammen 13.861 Gene umfassen. Die Heidelberger Gen-Vorhersage, basierend auf der „Fgenesh ab initio gene prediction Software“ enthält 20,622 Gene. Diese drei Annotationen wurden kombiniert und zusätzlich 71 Gene aus verschiedenen Datenbanken hinzugefügt, die in keiner der Annotationen vorhanden waren. Die daraus entstandene „Heidelberg Kollektion“ umfaßt 21.306 potentielle Gene und stellt die Grundlage des Heidelberg FlyArrays dar. Automatisiert wurden Primerpaare für jedes Gen entworfen, die in einer PCR-Reaktion einen Teil eines mittleren Exons synthetisieren. Die synthetisierten PCR-Produkte sind bis zu 500bp lang und jedes Gen ist zweimal an unterschiedlichen Positionen auf dem Microarray vertreten. Der Microarray ist somit aus 2x 24 Abschnitten aufgebaut. Außerdem wurden insgesamt 2.502 PCR Produkte von *Arabidopsis* cDNAs, genomischer *Drosophila* DNA and *C. elegans* cDNAs als negativ bzw. positiv Kontrollen dem

Microarray beigefügt. Die genaue Herstellung und weitere Einzelheiten des FlyArray wurden in (Hild *et al.*, 2003) veröffentlicht.

2.2.2. RNA-Präparation

Zur Gewinnung großer Mengen von RNA wurde das RNeasy[®] Midi Kit der Firma Qiagen verwendet. Das Arbeiten mit RNA verlangt große Sorgfalt, um eine Kontamination mit RNasen, die die RNA zerstören würden, zu vermeiden. Alle Chemikalien und Behälter müssen mit Diethylpyrocarbonat (DEPC) (0,001% (V/V) DEPC in H₂O autoklavieren) angesetzt oder behandelt werden, um ein RNase-freies Arbeiten zu gewährleisten. Im ersten Schritt werden die dechorionisierten Embryonen in Glasmörsern, die zur Sterilisation bei 180°C gebacken wurden, homogenisiert. Dies passiert in einem denaturierenden Puffer aus Guanidin-Isothiocyanat (GTC) und 0,1% β -Mercaptoethanol, der im Gewebe enthaltene RNasen sofort inaktiviert. Die Zugabe von Ethanol ermöglicht eine Bindung der RNA an die Silicagelmatrix des Zentrifugationssäulchen, auf die das Lysat gegeben wird und trennt so die RNA von Proteinen, die herausgewaschen werden können. Kleine RNA-Moleküle (< 200 nt), wie 5.8 rRNA oder tRNA, die bis zu 20% der Gesamt-RNA darstellen, werden dabei auch entfernt. Die Präparation erfolgte nach Angaben des Herstellers. Die Ausbeute wurde photometrisch bestimmt und die Qualität in einer RNA-Gelelektrophorese überprüft.

2.2.3. Ethanolische Fällung

Um die DNA oder RNA von Salzen und anderen Chemikalien, die während eines Experimentes zugefügt werden, zu reinigen, kann man die Nukleinsäure ausfällen bzw. aussalzen. Hierfür gibt man ein zehntel Volumen Salz, bei DNA-Fällungen meist 2 M NaCl, und 2,5 Volumen absolutes Ethanol zur gelösten DNA oder RNA. Beispiel: Zu einem Restriktionsansatz mit einem finalen Volumen von 20 μ l gibt man 2 μ l NaCl und 50 μ l abs. Ethanol. Das Ethanol zerstört dabei die Hydrathülle der DNA/RNA und das positiv geladene Salz neutralisiert die negative Ladung der Nukleinsäure, wodurch sie ausfällt. Idealerweise wird die DNA/RNA über Nacht bei -20°C gefällt und am nächsten Tag bei 4°C für eine Stunde bei 14.000 rpm pelletiert. Durch anschließende Zugabe von 70%igem Ethanol wird die DNA während kurzer Zentrifugation gereinigt, anschließend getrocknet und kann dann in gewünschtem Volumen resuspendiert werden. Bei RNA-Fällungen wird häufig 4 M LiCl als Salz verwendet. Dabei werden nur RNA-Fragmente größer als 50 bp gefällt, kleinere Fragmente bleiben in Lösung und werden mit dem Abziehen des Ethanols entfernt.

2.2.4. RNA-Gelelektrophorese

Für Ribonukleinsäuren wurden 1%ige Gele mit Formaldehyd und MOPS-Puffer gegossen. Für ein kleines Gel wird 0,4 g Agarose in 4 ml 10x MOPS und 30 ml Wasser aufgeköcht. Nach Abkühlen auf ca. 50°C gibt man 6,8 ml Formaldehyd (37%ige Lösung) hinzu und läßt das Gel fest werden. Für die RNA-Proben löst man gefällte RNA in 4,5 µl DEPC-Wasser und fügt 10 µl Formamid, 2 µl 10xMOPS-Puffer, 3,5 µl Formaldehyd und 0,5 µl Ethidiumbromid (EtBr) hinzu. Das Formaldehyd und das Formamid verhindern hierbei die Aktivität von RNasen. Durch die anschließende Denaturierung bei 70°C für 5 min. wird der RNA-Strang linearisiert und erleichtert somit ein Anlagern des EtBr an die einzelsträngigen RNA, wodurch die RNA später unter UV-Licht sichtbar gemacht werden kann. Der Probe wird vor Beladen des Gels 0,1 Volumen RNA-Beladungspuffer zugesetzt. Als Laufpuffer wird 1xMOPS-Puffer verwendet. Dieses Verfahren wurde von mir verwendet, um die Qualität der präparierten Gesamt-RNA zu überprüfen. Denaturierte RNA ist im Gel als verschmierte Bande zu sehen, wohingegen intakte RNA ein deutlich umrissenes Bandenmuster zeigt.

Ethidiumbromid-Stammlösung

10 mg/ml in H₂O gelöst

10x MOPS-Puffer (3-(N-Morpholino)-2-hydroxypropansulfonsäure Natriumsalz)

0,2 M MOPS, pH 7

50 mM Natriumacetat, pH 7

10 mM EDTA, pH 8

RNA-Beladungspuffer

50 % (V/V) Glycerin

0,4 % (V/V) Bromphenolblau

0,4 % (V/V) Xylencyanol

10 x Tris-Acetate-EDTA-Puffer (TAE)

2.2.5. Northern Blot

Im Anschluß an eine RNA-Gelelektrophorese können die Nukleinsäuren auf eine Nylonmembran transferiert und sichtbar gemacht werden. Dies wurde im Rahmen dieser Arbeit durchgeführt, um eine quantitative Veränderung der *gcm* mRNA in

Überexpressionsmutanten im Vergleich zu den wildtypischen Ausgangstämmen, Gal4-Treiberlinie und UAS-*gcm*, nachzuweisen. Dafür wird das RNA-Gel zuerst 20 min. in 2xSSC Puffer äquilibriert, um das Formaldehyd aus dem Gel zu entfernen. Eine Denaturierung wie es bei Southern Blots (Blotten von DNA) üblich ist, entfällt, da die RNA-Gelelektrophorese unter denaturierenden Bedingungen erfolgt. Das Experiment wird über Nacht durchgeführt. Der Transferpuffer (20xSSC) wird durch Kapillarkräfte in die trockenen Papiertücher nach oben gezogen und transferiert dabei die RNA aus dem Gel auf die positiv geladene Nylonmembran. Durch UV-Bestrahlung kann nun die RNA mit der Membran kovalent verbunden werden, wodurch ein Auswaschen in den nächsten Schritten verhindert wird. Danach wird die Membran in einer Folie mit Hybridisierungspuffer eingeschweißt und für eine Stunde bei 45°C inkubiert, um alle freien Bindestellen der Membran abzusättigen. Die Hybridisierung erfolgt über Nacht bei 45°C und die eingesetzte Konzentration der Digoxigenin-markierten Sonde lag bei 1:3500. Ungebundene Sonde wird durch mehrmaliges Waschen mit Tweenpuffer sowohl bei stringenter Temperatur als auch bei Raumtemperatur (RT) entfernt. Anschließend wurde die Membran eine Stunde mit Blockingpuffer bei RT inkubiert. Dazu wurde der sekundäre anti-DIG Antikörper gegeben. Nach gründlichem Waschen mit Tweenpuffer erfolgte die Detektion, wie in Absatz 2.3.2 beschrieben wird. Eine Abweichung stellt die Verwendung eines AP-Puffers zur Detektion dar.

20xSSC

3 M NaCl

0,3 M NaCitrat

pH 7,0

Blockingpuffer (für Northern Blot und Dot-Test)

100 mM Tris/HCl

150 mM NaCl

1% Blockingreagenz (Boehringer, Mannheim)

Hybridisierungspuffer

0,1 % Natrium-N-Lauroylsarcosinat

1 % Blockingreagenz

0,02 % SDS lösen in 5x SSC

Tweenpuffer

100 mM Tris/HCl

150 mM NaCl

0,3% Tween 100

pH 7,5

AP-Puffer zur Detektion (für Northern Blot und Dot-Test)

100 mM Tris/HCl

100 mM NaCl

5 mM MgCl

pH 9,5

2.2.6. poly-A⁺-Präparation

Zur Extraktion der poly-A⁺-RNA wurden 250 µg Gesamt-RNA mit Lithiumchlorid und absolutem Ethanol über Nacht bei -20°C gefällt. Bei der anschließenden Extraktion wird ausgenutzt, daß die mRNA an ihrem 3' Ende einen sogenannten PolyA-Schwanz aus 20-250 angehängten Adenosin-Nukleotiden trägt. Dadurch läßt sich die mRNA, die nur bis zu 5% der Gesamt-RNA darstellt, von den anderen RNA-Klassen trennen. Hierfür wurde das Oligotex[®] Kit der Firma Qiagen verwendet. Die Oligotex[®] Suspension besteht aus Polystyren-Latex Partikeln, die kovalent mit dC₁₀T₃₀-Oligonukleotiden (10 Cytosin- und 30 Thymidin-Nukleotiden) verbunden sind. Unter hohen Salzkonzentrationen hybridisieren diese Oligotex[®]-Partikel mit dem poly-A-Schwanz der mRNA-Moleküle. So gebunden läßt sich die mRNA aufreinigen und trennen und kann anschließend durch Erniedrigung der Salzkonzentration wieder von den Partikeln gelöst werden. Dazu wurde die gefällte Gesamt-RNA resuspendiert und nach Angaben des Herstellers die poly-A⁺-RNA extrahiert. Auch hier wurde die Konzentration photometrisch bestimmt und die mRNA gefällt, um in geringem Volumen wieder gelöst zu werden.

2.2.7. Indirekte Markierungsmethode

Nach der Gewinnung großer Mengen von Gesamt-RNA und der Isolierung der poly-A⁺-RNA, wird nun die mRNA durch reverse Transkription in cDNA umgeschrieben. Bevor sie später auf dem Microarray hybridisiert werden kann, muß die cDNA markiert werden. Es gibt zwei Verfahren, die cDNA fluoreszent zu markieren. Der direkte Einbau der großen, fluorophoren Farbstoff-Moleküle Cyanin 3 und Cyanin 5 (Cy3 bzw. Cy5), die an Nukleotide gekoppelt sind, ist während der cDNA-Synthese sterisch ungünstig und hat

meist eine geringere Einbaurate zur Folge. Daher haben wir uns für die indirekte Markierungsmethode entschieden. Hierbei erfolgt zuerst die cDNA-Synthese, während der Aminoallyl-dUTPs in den cDNA Strang eingebaut werden. Erst im folgenden Schritt reagieren die reaktiven N-hydroxyl-succinimidyl (NHS)-Ester der Farbstoffe mit der Amino-Gruppe der Aminoallyl-Nukleotide und knüpfen eine kovalente Bindung. Die einzelnen Schritte dieser Markierungsmethode sind in der folgenden Abbildung 2.5 dargestellt.

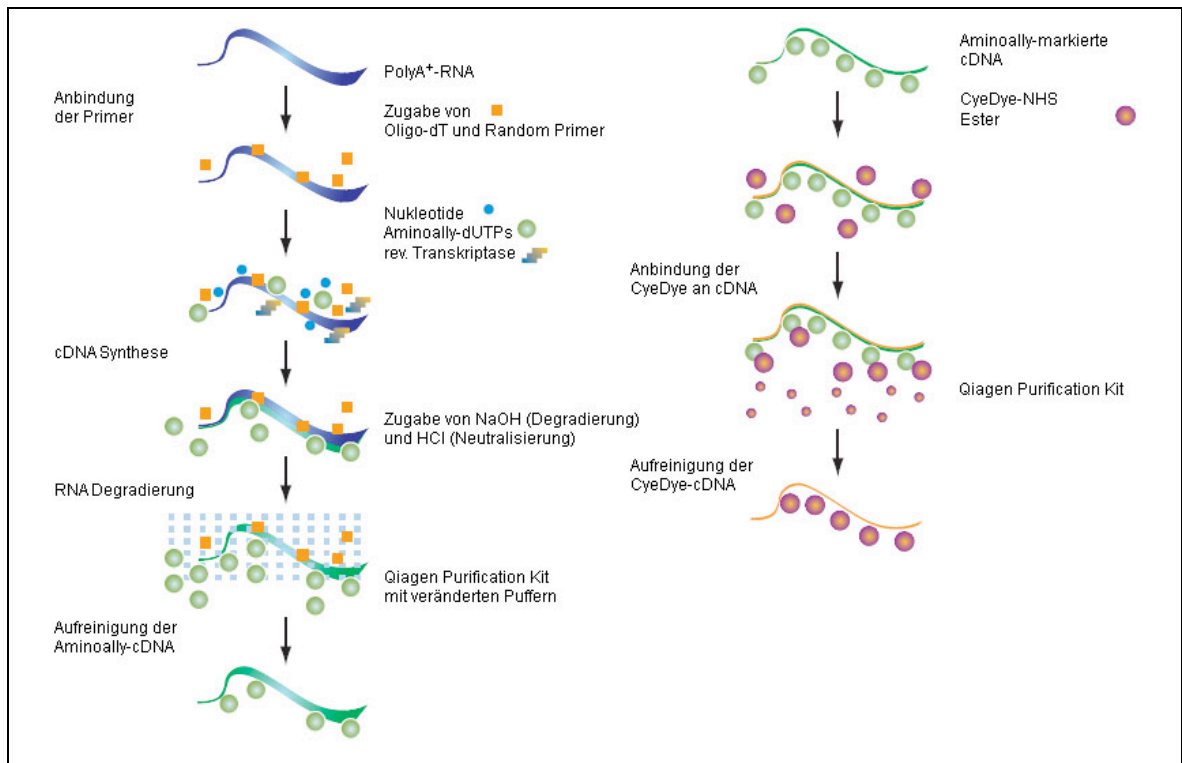


Abbildung 2.5 Indirekte Markierungsmethode

Im ersten Schritt wird poly-A⁺-RNA (blaue Linie) nach Zugabe von Oligo-dT und Random Primer (gelbe Kästchen) durch reverse Transkription in cDNA umgeschrieben und dabei Aminoallyl-tragende dUTPs (grüner Ball) eingebaut. Nach Abbau der RNA und Aufreinigung der cDNA (grüne Linie) mit veränderten Waschpuffern (blauer Kästchenhintergrund), erhält man eine Aminoallyl-markierte cDNA. Danach wird die cDNA mit reaktiven NHS-Estern, die mit fluorophoren Farbstoffen gekoppelt sind (roter Ball), inkubiert. Dabei gehen die Amino-Gruppen und die Fluorochrome eine kovalente Bindung ein. Nach erneuter Aufreinigung kann die fluoreszent markierte cDNA (gelbe Linie) als Microarray-Probe eingesetzt werden. Verändert nach Amersham Microarray-PDF 63-0048-49.

Für die Hybridisierung eines Microarrays benötigt man zum einen die RNA der Kontrolle (Wildtyp), sowie die RNA der Mutante. Im Falle der ektopischen Expression (GOF) von *gcm* wurde eine besondere Kontrolle verwendet. Der Gal4-Treiber *Mz1060* und der UAS-*gcm* Stamm wurden in unterschiedlichen Laboratorien hergestellt, die verschiedene Fliegenstämme zur Erzeugung verwendeten. Dies läßt sich schon am Phänotyp der Fliegen deutlich sehen, da die Fliegen des UAS-*gcm* Stammes kleiner als die Fliegen des *Mz1060* Stammes sind und eine gelbliche Körperfarbe zeigen. Dies könnte veränderte Genexpressionen innerhalb des Fliegengenoms zur Folge haben, die im Microarray-

Experiment als differentiell regulierte Gene auftauchen würden. Um diese genetischen Unterschiede der Ausgangsstämme auszugleichen und später nur differentielle Regulation aufgrund von ektoptischer Expression von *gcm* zu messen, wurde die RNA des Gal4-Treibers *Mz1060* mit der RNA des UAS-*gcm* Stammes B5446 zu gleichen Teilen gemischt und als Wildtyp-Kontrolle der GOF verwendet (siehe auch Kapitel 3.1.1). Die vergleichende Analyse der *loss-of-function* (LOF) wurde mit *OregonR* wildtypischen Embryonen durchgeführt. Die Markierung der cDNAs wurde mit den fluorophoren Farbstoffen Cy3 und Cy5 (Amersham) durchgeführt. Da die Haltbarkeit und Sensitivität der zwei verwendeten Farbstoffe unterschiedlich ist, wurden die Farbstoffe innerhalb jedes Stadiums zwischen Kontrolle und Mutante ausgetauscht („Dye-Swap“). Für die reverse Transkription gibt man zu 1 µg mRNA sowohl Random Hexamer Primer (4,5 µg) als auch Oligo-dT Primer (0,75 µg). Da wir poly-A⁺-RNA verwenden, können beide Primer benutzt werden, wodurch alle Bereiche des Transkriptes synthetisiert werden. Zusätzlich zur mRNA von *Drosophila* wurde RNA von *Arabidopsis thaliana* (Ackerschmalwand) verwendet. Dies sollte eine Quantitätskontrolle verschiedener Transkriptmengen auf dem Microarray möglich machen. Auf dem Microarray waren PCR-Produkte von 8 verschiedenen *Arabidopsis*-Sequenzen enthalten. Diese 8 cDNAs wurden *in vitro* transkribiert und die jeweilige Konzentration der RNA genau bestimmt. Diese RNA wurde in unterschiedlichen Konzentrationen den Transkriptionsansätzen beigelegt, wobei ein Teil der *Arabidopsis*-Klone immer Cy3 markiert wurden und der andere entsprechend mit Cy5. Leider stellte sich bei der Auswertung der Microarrays heraus, daß diese Kontrolle aufgrund von unterschiedlichen Ergebnissen nicht zuverlässig war und daher nicht benutzt werden konnte. Zuerst wird der Transkriptionsansatz 1 zusammen gemischt und für 2 Stunden bei 42°C inkubiert. Nach 2 Stunden wird der Transkriptionsansatz 2 hinzugegeben und über Nacht bei 42°C inkubiert. Am nächsten Tag hydrolysiert man die RNA durch Zugabe von 10 µl 1 M NaOH und 10 µl 0,5 M EDTA und erhitzt für 15 min. bei 65°C. Anschließend neutralisiert man den pH-Wert mit 10 µl 1 M HCl. Zur Aufreinigung dieser cDNA sowie später der markierten cDNA wurde das PCR Purification Kit (Qiagen, Hilden) verwendet. Allerdings mußten für die Aufreinigung der Aminoallyl-markierten cDNA veränderte Waschpuffer angesetzt werden, da die Puffer von Qiagen freie Amine enthalten, die mit den Farbstoffen konkurrieren und ihre Anbindung an die Aminoallyl-Nukleotide verhindern würden. Während die Bindung und das Waschen nach Angaben des Herstellers verliefen, wurde die Elution der cDNA verändert, um sie möglichst vollständig von der Säule zu lösen. Dafür wurden zweimal 35 µl Elutionspuffer auf die Membran geben, 1-3

min. inkubiert und dann jeweils für 1 min. bei 14.000 rpm abzentrifugiert. Eine dritte Elution erfolgte mit auf 65°C erhitztem Elutionspuffer, so daß die cDNA insgesamt in einem Volumen von 105 µl gelöst wurde. Nach einer photometrischen Konzentrationsbestimmung der einzelsträngigen cDNA (5 µl in 45 µl Elutionspuffer), wurden die restlichen 100 µl der eluierten cDNA in einer Vakuumzentrifuge vollständig eingedampft.

Die Cy3/Cy5 Farbstoffe werden als gefriergetrocknetes Pulver geliefert. Zur Aliquotierung wurde eine Verpackungseinheit mit 73 µl wasserfreiem Dimethylsulfoxid (DMSO) gelöst. Daraus ergeben sich 16 Aliquots mit jeweils 4,5 µl Inhalt, was für einen Markierungsansatz mit 1 µg mRNA ausreichend ist. Zur Lagerung werden die Farbstoffe in der Vakuumzentrifuge eingedampft (20-30 min ohne Temperatur) und bei -80°C gelagert.

Nach der Aufreinigung der Aminoallyl-markierten cDNA werden die Farbstoffe in 4,5 µl DMSO gelöst und mit der eingedampften cDNA, die in 4,5 µl frischem Natriumcarbonatpuffer resuspendiert wurde, gemischt. Die Inkubation erfolgt abgedunkelt für 2 Stunden bei RT. Anschließend wird nicht gebundener Farbstoff durch Aufreinigung mit dem PCR Purifikation Kit unter Verwendung der beigefügten Puffer entfernt. Auch hier wird dreimal eluiert, wie bereits vorher beschrieben. Nachdem die Konzentration photometrisch bestimmt wurde, werden die Cy3 und Cy5 markierten cDNAs in gleichen Teilen gemischt und die nun vollständige Microarray-Probe eingedampft. So läßt sich die Probe für einige Wochen bei -20°C im Dunkeln lagern.

25x Aminoallyl-dNTP-Mix:

- 12,5 mM dATP
- 12,5 mM dCTP
- 25 mM dGTP
- 7,5 mM dTTP
- 5 mM AA-dUTP

Transkriptionsansatz 1 (total 30 µl):

- 1 µg mRNA
- 3 µl *Arabidopsis* mRNA
- 0,5 µl RNase Inhibitor (40U/µl)
- 6 µl 5x First Strand Buffer

3 μl 0.1 M DTT
1,5 μl 25x Aminoallyl-dNTP-Mix
2 μl Superscript II RT (200U/ μl)

Transkriptionsansatz 2:

2,25 μg Random Primer
0,375 μg Oligo-dT Primer
0,5 μl 25x Aminoallyl-dNTP-Mix
5 μl DEPC-H₂O
2 μl 5x First Strand Buffer
1 μl 0.1 M DTT
0,5 μl Superscript II RT

Natriumcarbonat-Puffer

0,1 M Na₂CO₃, pH 9,0

Phosphatpuffer für Microarrays

1 M Phosphat-Puffer (KPO₄), pH 8,5-8,7

Phosphat-Waschpuffer

5 mM KPO₄, pH 8,0 (gelöst in 80% Ethanol)

Phosphat-Elutionspuffer:

1 mM KPO₄, pH 8,5

2.2.8. Microarray-Hybridisierung

Vor der Verwendung wurden die gespotteten PCR-Produkte kovalent mit der beschichteten Oberfläche des Glasobjektträgers verbunden. Dafür wurden die Microarrays mit 250 mJ UV-Licht (StrataLinker Energie bei 2500) bestrahlt und anschließend für 2 Stunden bei 80°C „gebacken“. Mit einem Glasschneider werden die Microarrays durchnummeriert und die Fläche mit den aufgetragenen PCR-Produkten eingerahmt. Nun werden die beschrifteten Microarray für 10-20 s in gefiltertem Reinigungspuffer gewaschen. Um ein Antrocknen zu verhindern, werden die Microarrays schnell in gefiltertes Wasser überführt

und gewaschen, bevor sie dann in frischem, gefiltertem 95°C heißen Wasser für 3 min. denaturiert werden. Anschließend werden die Objektträger in gefiltertem Prähybridisierungspuffer bei 55°C für 45 min. inkubiert. Danach werden die Microarrays in frischem Wasser für 10-20 s gewaschen und sofort mit Druckluft getrocknet. Es wurden meist 8 Microarrays auf diese Weise gleichzeitig prähybridisiert und in einem Exzikator für bis zu drei Monate aufbewahrt.

Während der Aufreinigung und Trocknung der markierten Microarray-Probe werden die prähybridisierten Microarrays für die Hybridisierung vorbereitet. Es wurden speziell angefertigte Kammern der Firma TeleChem, Stuttgart verwendet, die mit gefiltertem Wasser gewaschen werden und durch Druckluft und spezielle Staubtücher fusselfrei getrocknet werden. In zwei Aussparungen in der Kammer werden jeweils 60 µl 3x SSC-Puffer pipettiert und der Microarray mit der gespotteten Seite nach oben vorsichtig eingelegt. Große Deckgläser mit Abstandshaltern (LifterSlip, Erie Scientific Company, Portsmouth, USA) werden genau auf die Objektträger aufgelegt, wobei ein Verrutschen des Deckglases den Microarray sehr schnell unbrauchbar macht. Der denaturierten, resuspendierten Microarray-Probe wird 68°C vorgewärmte SlideHyb#1[®] (Ambion) beigefügt und luftblasenfrei zwischen Microarray und Deckglas pipettiert. Die Kammer wird durch Schrauben luftdicht verschlossen und in einem dunklen Wasserbad bei 55°C über Nacht inkubiert.

Am nächsten Tag werden insgesamt 4 Glasgefäße mit Waschpuffern vorbereitet, zweimal Waschpuffer 1 und jeweils einmal Waschpuffer 2 und 3. Da die Microarrays auf keinen Fall antrocknen dürfen, müssen sie schnell aus der Kammer und von einem Puffer in den nächsten überführt werden. Nach dem Aufschrauben der Kammer wird der Microarray mit einer Pinzette entnommen und das Deckglas in vorgewärmtem Waschpuffer 1 entfernt. Dann wird der Microarray in frischen Waschpuffer 1 überführt und mit Alufolie abgedeckt unter leichtem Schütteln bei Raumtemperatur für 10 min. gewaschen. Danach wird auf die gleiche Weise in Waschpuffer 2 und 3 gewaschen, der Microarray mit Druckluft getrocknet und abgedunkelt im Kühlschrank bis zum Scannen aufbewahrt.

Hybridisierungslösung

Die Probe wird in 10 µl 10 mM EDTA gelöst und bei 95°C für 5 min. denaturiert. Anschließend wird 35-40 µl Slide Hyb #1 der Firma Ambion zugegeben.

Waschpuffer

Reinigungspuffer: 0,1% SDS

Waschpuffer 1: 2x SSC, 0,2% SDS

Waschpuffer 2: 2x SSC

Waschpuffer 3: 0,2x SSC

Prähybridisierungspuffer: 5x SSC, 0,1% SDS

Vor Gebrauch wird dem Prähybridisierungspuffer 1 g/100 ml bovines Serum Albumin (BSA) zugeben.

2.2.9. Scannen der Microarrays und Bildbearbeitung

Die hybridisierten Microarrays werden innerhalb von 1-3 Tagen gescannt. Dafür wurde der GeneTac™ LS IV Scanner (Perkin Elmer Life Sciences, Wellesley, USA) mit der entsprechenden Software benutzt, der uns freundlicherweise durch die Arbeitsgruppe von Prof. T. Hankeln im Hause zur Benutzung angeboten wurde. Durch die Positiv-Kontrolle auf dem Microarray (genomische *Drosophila*-DNA) wurde die Intensität der Laser bei jedem Scan angeglichen. Der Vorgang liefert eine quantitative Aussage über die Genexpression in Form von Pixelintensitäten als 16bit Graustufenbild im TIFF-Format. Bevor die eigentliche Auswertung erfolgen kann, wird dieses Bild mit einer speziellen Software, GenePix Pro 5.0 (Axon Instruments, Union City, USA), weiter bearbeitet und hier erfolgt die Zuordnung des Gens zu jedem aufgetragenen PCR-Produkt. Dafür wurde uns ein Masterdokument zur Verfügung gestellt, das die genauen Angaben über die Gene in Form einer Schablone enthält, die innerhalb der GenePix Software auf das gescannte Microarray-Bild gelegt wird. Das Programm bietet die Möglichkeit eines „Selbst-Alignments“, d. h. das sich die Schablone automatisch das passende PCR-Produkt sucht. Trotzdem muß der Microarray manuell nachgefiltert werden. Dazu gehören Bestätigung von aufgetragenen Genen, die das automatische Alignment nicht erkannt hat, die Angleichung der Größe, die nicht immer identisch ist aufgrund von technischen Problemen während des Herstellungsvorgangs und das Ausstreichen eines PCR-Produktes, das verwischt oder von anderen, verlaufenen Produkten überdeckt wurde. Dieser Vorgang wurde für jeden Microarray durchgeführt und das fertig bearbeitete Bild wird als „GenePix-Resultat“ (gpr)-Format abgespeichert, damit es in die M-CHiPS Analysesoftware eingeladen werden kann.

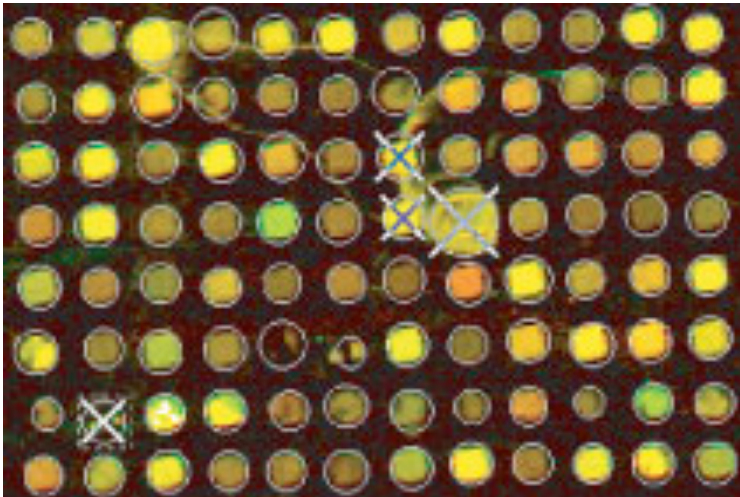


Abbildung 2.6 Genepix Bildbearbeitung

Die Abbildung zeigt einen Ausschnitt aus einem gescannten Microarray mit der GenePix-Schablone, die die aufgetragenen PCR-Produkte kreisförmig umrandet. Verwischte oder fehlende Punkte können manuell ausgestrichen werden und werden nicht analysiert.

2.2.10. Benutzung der M-CHiPS-Software

Die “Multi-Conditional Hybridization Intensity Processing System” (M-CHiPS) Software wurde zusammen mit dem FlyArray in der Arbeitsgruppe von Prof. J. Hoheisel entwickelt und wurde von mir zur Analyse aller Microarrays verwendet ((Fellenberg *et al.*, 2002). Die Analyse erfolgte am Deutschen Krebsforschungszentrum (DKFZ), da diese Software auf spezielle Computer in Heidelberg zugreifen muß und das Linux-Betriebssystem erfordert. Der erste Schritt bestand in dem Anlegen einer vollständigen Datenbank, die die Experimente der GOF und LOF für jedes Stadium mit mindestens 4 Wiederholungen umfaßt. Die Daten wurden als GenePix-Resultat-Formate (gpr), getrennt nach Cy3 und Cy5 Kanal eingeladen. Die Analyse erfolgte für die GOF und LOF getrennt, ebenso wie für jeden Zeitpunkt.

Zuerst wird der lokale Hintergrund des Microarrays abgezogen, so daß nur die echte Pixelintensität jedes aufgetragenen PCR-Produktes in die Analyse einbezogen wird. Die anschließende Normalisierung dient der Korrektur von systematischen Variationen, z. B. physikalische Eigenschaften der fluoreszenten Farbstoffe Cy3 und Cy5, die die Aussage über regulierte oder unregulierte Gene erschwert. Die verwendete Normalisierung (lineare, logarithmische Regression), setzt voraus, daß die Mehrzahl der Gene auf dem Microarray eine stabile Transkriptionsrate besitzt. Da der Microarray alle Gene von *Drosophila* aufweist, erscheint diese Annahme sinnvoll, da wir nur für eine vergleichbar geringe Anzahl von Genen in der ektopischen oder *loss-of-function* Mutante von *gcm* eine differentielle Regulation erwarten. Weiterhin wird vor der M-CHiPS-Analyse die Qualität der Microarrays in Form des Korrelationskoeffizienten bestimmt. Dieser Wert beschreibt

die Übereinstimmung der Pixelintensitäten des 1. und 2. aufgetragenen PCR-Produktes eines Gens im Cy3-Kanal bzw. Cy5-Kanal, und somit die Gleichförmigkeit der Hybridisierung über den gesamten Microarray. Eine identische Pixelzahl der beiden Replikate hat somit den Wert 1. Alle Microarrays, die einen Korrelationskoeffizienten kleiner als 0,8 hatten, wurden nicht zur Analyse zugelassen.

Danach wird die eigentliche Analyse der Microarrays durchgeführt, die der Bestimmung dient, welche Gene in welchem Stadium in den mutanten Situationen der GOF und LOF im Vergleich zum Wildtyp differentiell reguliert sind. Das Herausfiltern erfolgt durch unterschiedliche, miteinander verknüpfte Filter. Im folgenden entspricht die „Kontrolle“ den 8 Meßwerten jedes Gens (4 Microarrays für jedes Stadium, jedes Gen doppelt vorhanden auf einem Microarray, ergibt 8 Meßwerte pro Gen) im Wildtyp und die „Kondition“ denen der verglichenen Mutante.

1. Intensitäts-Filter: Zuerst werden alle Gene ausgeschlossen, die eine zu geringe Pixelintensität besitzen, d. h. deren Signal sich kaum vom Hintergrund abhebt. Der Filter nimmt hierbei den Mittelwert der Replikate sowohl von der Kontrolle, als auch von der Kondition. Das sicherte den Ausschluß von Genen, die in 7 Werten eine sehr geringe Pixelanzahl aufweisen, und nur mit einem Wert durch Verschmutzung des Microarrays an dieser Stelle die gewählte Pixelgrenze überschreiten konnte. Diese Grenze lag bei allen Microarrays bei ca. 10.000 Pixel und dadurch wurde die Anzahl der Gene (22.429) meist halbiert. Eine visuelle Betrachtung der Microarrays, gestützt von einer zufälligen Auszählung mehrerer Einheiten auf Microarrays verschiedener Stadien, zeigte, daß deutlich mehr als 50% der Gene nicht exprimiert sind (>75%). Die Pixelgrenze wurde relativ großzügig gewählt, damit keine schwach exprimierten Gene irrtümlich von der Analyse ausgeschlossen werden konnten.

2. Verhältnis-Filter: Der Unterschied der Expression (gemessen in Pixelintensität) eines Gens im Wildtyp und der mutanten Situation wird in dem Verhältnis der beiden zueinander ausgedrückt. Dabei wird der Wildtyp als konstanter Wert 1 angenommen. Beispiel: Das GenX hat eine Pixelintensität im wildtypischen Cy3-Kanal im Wert von 10.000 und im mutanten Cy5-Kanal einen Wert von 15.000. Somit liegt ein Verhältnis von +1.5 vor. Ein Cy5-Kanal mit 5000 Pixel hätte ein Verhältnis von -1.5. Die Durchführung von Kontrollexperimenten zeigte, daß Gene mit einem Verhältnis ≥ 1.5 als differentiell reguliert anzusehen sind. Der Filter wurde passiert, wenn nur einer der acht Meßwert für ein Gen ≥ 1.5 lag. Da die Filter über eine „Und-Verknüpfung“ verbunden sind, verbleiben nach

diesen zwei Filtern nur differentiell regulierte Gene, die sich über die Hintergrundfärbung deutlich abheben.

3. MinMax-Filter: Der letzte Filter stellt die Reproduzierbarkeit der 8 Meßwerte für ein Gen sicher. Die Abbildung 2.7 soll diesen Filter anhand von drei eingezeichneten Meßwerten für die Kontrolle (Kreis) und die Kondition (Kreuz) erklären. Betrachtet man die Pixelintensitäten aller Replikate eines Gens auf diese Weise, so muß eine deutliche Trennung der Daten voneinander erkennbar sein (Beissbarth *et al.*, 2000).

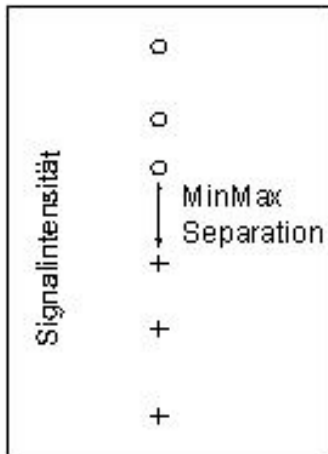


Abbildung 2.7 MinMax-Filter

Die Darstellung zeigt die Verteilung der Meßwerte für die Kontrolle (3 Meßwerte, Kreis) und die Kondition (3 Meßwerte, Kreuz dargestellt) abhängig von ihrer Pixelintensität. Nur deutlich voneinander getrennte Datensätze passieren den Filter.

Dabei darf die kleinste Distanz zwischen den Meßwerten der Kontrolle und der Kondition nicht kleiner 0,0 sein. Im Gegensatz zu dem vorigen Verhältnis-Filter, bei dem nur ein Replikat eine differentielle Regulation größer 1.5 aufweisen mußte, um den Filter zu passieren, werden hier alle Gene eliminiert, die einen Meßwert der Kondition innerhalb der Kontrollwerte oder umgekehrt aufweist. Ein Beispiel: Das Gen hat die Kontroll-Meßwerte 10.000, 11.000 und 10.500. Die Konditions-Meßwerte liegen bei 16.000, 10.500 und 10.500. Dieses Gen konnte den Verhältnis-Filter mit einem Wert von 1.5 überwinden, scheitert aber an diesem Filter, da zwei Meßwerte innerhalb der Kontroll-Werte liegen, und somit keine deutliche Datentrennung vorliegt. Dieser Filter wurde mit fallender Stringenz (0,5; 0,2; 0,0) angewendet.

4. Korrespondenzanalyse: Diese Analyse im Anschluß an das Filtern ermöglicht eine gleichzeitige Darstellung aller verbliebenen Gene (in Abbildung 2.8 als schwarze Punkte eingezeichnet), sowie der einzelnen Microarray-Hybridisierungen eines Zeitpunktes (Fellenberg *et al.*, 2001; Greenacre, 1984). Dabei wird die gemittelte Kontrolle (roter Pfeil) den einzelnen Replikaten der Kondition (blaue Kästchen) gegenübergestellt. Während der Korrelationskoeffizient die Qualität eines Microarrays bezüglich der

Replikate für ein Gen überprüft, wird hier die Gleichförmigkeit der Microarray-Replikate überprüft. Wie durch den MinMax-Filter vorgesehen, sieht man eine deutliche Datentrennung zwischen Kontrolle und Kondition. Weiterhin wird deutlich, daß die Wiederholungsexperimente miteinander vergleichbar sind, verdeutlicht durch die räumliche Nähe der Replikate zueinander. Microarrays, die deutlich entfernt von den anderen Replikaten dargestellt wurden, konnten so verworfen werden und durch erneute Microarray-Experimente des gleichen Zeitraumes ersetzt werden.

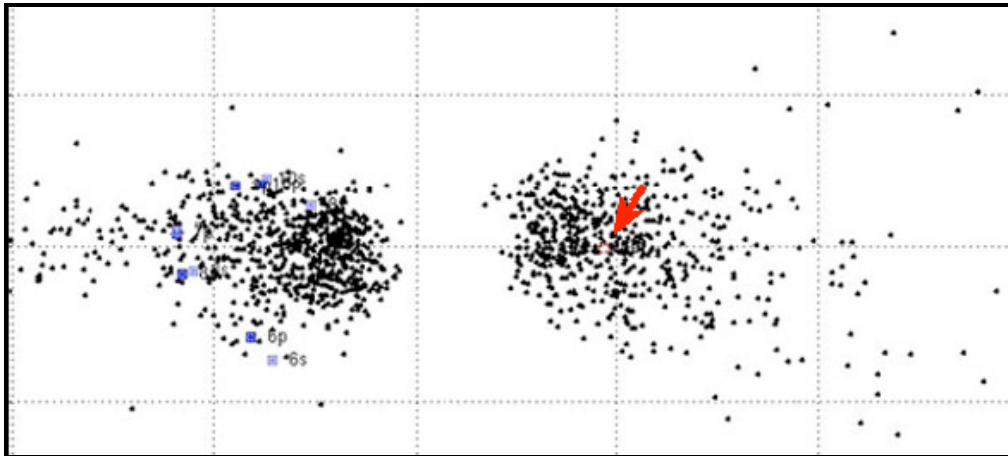


Abbildung 2.8 Darstellung der Korrespondenzanalyse

Die Analyse ermöglicht die Darstellung der gefilterten, differentiell regulierten Gene (schwarze Punkte) und das Verhältnis von gemittelter Kontrolle (roter Pfeil) zur Kondition (einzelne Replikate als blaue Kästchen). Die Nähe der einzelnen Replikate der Kondition zeigt eine Vergleichbarkeit der Microarrays miteinander an.

Es wurden von jedem Zeitpunkt der GOF bzw. der LOF jeweils 3 Listen mit einem MinMax-Filter von 0,5, 0,2 und 0,0 abgespeichert, die als Grundlage der weiteren Analyse dienten. Um ein Zeitprofil jedes einzelnen Genes innerhalb des Experimentes (GOF bzw. LOF) aufzuzeigen, wurden die Listen jedes Zeitpunktes in einer Tabelle kombiniert.

Da der Verhältnis-Filter alle Gene, die einen der acht Meßwert oberhalb der gewählten Grenze von 1.5 aufwiesen, passieren ließ, hatten viele Gene innerhalb der abgespeicherten Listen einen tatsächlichen Verhältnis-Medianwert, der deutlich unterhalb von 1.5 lag. Daher wurden alle Listen manuell nachgefiltert und nur Gene mit einer differentiellen Regulation größer oder gleich ± 1.5 verblieben in den Gen-Listen.

2.3. Antikörperfärbung

Über Nacht gesammelte oder Stundenablagen von Embryonen werden durch Überschichten mit 7,5%iger Chlorbleiche chemisch dechorionisiert und nach gründlichem Spülen mit Wasser in ein Eppendorf-Gefäß (1,5 ml) oder einen Falcon (15 ml) mit frisch angesetzter Fixierlösung überführt, je nach Menge der eingespülten Embryonen. Die

Embryonen werden nun für 21 min. bei starkem Schütteln fixiert. Anschließend wird die untere, wäßrige Lösung aus PBS und Formaldehyd abgezogen und in gleichem Volumen durch Methanol ersetzt. Gründliches Vortexen löst die zweite Schutzhülle des Embryos, die Vitellinmembran, durch Scherkräfte an der Phasengrenze Heptan/Methanol ab und die Embryonen sinken auf den Boden. Dieser Vorgang wird nochmals wiederholt und danach alle verbliebene Lösung aus dem Eppendorf-Cap entfernt und mit frischem Methanol aufgefüllt. Nach wiederholtem Austauschen und Waschen mit frischem Methanol können die fixierten Embryonen bei -20°C über mehrere Monate gelagert werden.

Werden die Embryonen direkt für eine Antikörperfärbung verwendet, spült und wäscht man die Embryonen anschließend mit PBT und inkubiert den primären Antikörper bei leichtem Schütteln über Nacht bei 4°C. Primäre Antikörper können mehrmals verwendet werden. Die lange Inkubation über Nacht bei 4°C unterstützt eine gute Bindung des primären Antikörpers. Am nächsten Tag wird nicht gebundener Antikörper durch intensives Waschen entfernt. Darauf folgt die Inkubation des sekundären Antikörpers für 2 Stunden bei Raumtemperatur (RT), der danach ebenfalls durch wiederholtes Waschen entfernt wird.

Fixativ zur Antikörperfärbung

PBS	425µl
Heptan	500µl
Formaldehyd (37%)	75µl

Für Fixierungen im 15ml Falcon werden die Volumina verfünffacht.

20x PBS (pH 7,4)

1,3 M NaCl

0,07 M Na₂HPO₄

0,03 M NaH₂PO₄

Im Folgenden wird 1x PBS, das aus dieser Stammlösung angesetzt wird, als PBS bezeichnet.

1x PBT

1x PBS wird mit 0,1% Triton versetzt und wird weiterhin als PBT bezeichnet.

PBTween

1 x PBS wird mit 0,1% Tween 20 (Firma Riedel-de Haën) versetzt.

2.3.1. Färbung mit Fluoreszenzfarbstoffen

Werden fluoreszenzgekoppelte, sekundäre Antikörper benutzt, erfolgt die Inkubation im Dunkeln. Nach wiederholtem Waschen, um überschüssigen Antikörper zu entfernen, werden die Embryonen in 70%igem Glycerin im Kühlschrank aufbewahrt. Die Lagerung der Embryonen ist jedoch begrenzt, da die an den Antikörper gekoppelten, fluoreszierenden Konjugate mit der Zeit verblassen. Zur Dokumentation am konfokalen Laserscan Mikroskop (LSM) werden die fluoreszenzgefärbten Embryonen in Vectashield Mounting Medium überführt, das ein schnelles Ausbleichen der Farbstoffe verhindert.

2.3.2. Färbung mit alkalischer Phosphatase

Diese Färbemethode wird bei allen ISH verwendet, da hier ein anti-DIG Antikörper mit alkalischer Phosphatase als sekundärer Antikörper (Roche) benutzt wird. Da die alkalische Phosphatase nur im alkalischen Milieu aktiv ist, wird nach gründlichem Auswaschen des sekundären Antikörpers ein sogenannter Detektionspuffer mit einem pH-Wert von 9,5 verwendet. Die Zugabe von NBT und BCIP als Substrate der Phosphatase führt zum Ausfallen eines wasserunlöslichen, blauschwarzen Salzes. Die Färbung wird unter dem Binokular beobachtet und durch Zugabe von PBT, das den pH-Wert wieder neutralisiert, abgestoppt. Anschließendes Waschen mit Methanol stoppt die Farbreaktion endgültig ab und wäscht den Schwarzanteil der Färbung heraus, was zu einem stärkeren Kontrast bei Doppelfärbungen mit Meerrettich-Peroxidase Färbungen führt. Nach wiederholtem Waschen mit PBT und PBS können die gefärbten Embryonen in 70% Glycerin bei RT jahrelang aufbewahrt werden.

Detektionspuffer für alkalische Phosphatasefärbung

5 M NaCl

1 M MgCl

1 M Tris pH 9,5

0,1% Tween20

NBT/ X-Phosphat-Färbelösung für alkalische Phosphatase Färbung:

Detektionspuffer	1 ml
NBT (Nitroblau-tetrazoliumchlorid; 50 mg/ml in 70%DMF)	4,5 µl
BCIP (X-Phosphat; 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-phosphat; 50 mg/ml in 70%DMF)	3,5 µl

(DMF : Dimethylformamid)

2.3.3. Färbung mit Meerrettich-Peroxidase

Bei dieser zweiten Färbemethode sind die verwendeten Sekundärantikörper biotinyliert und es erfolgt eine Verstärkung der Färbereaktion über das ABC-Kit von Vectastain (Vectastain Elite ABC Kit, Vector Laboratories). Die A/B Lösung enthält Avidin und Streptavidin, gekoppelt mit Meerrettich-Peroxidase. Eine Verstärkung beruht auf der Komplexbildung von Avidin mit Streptavidin, der dann an Biotin bindet. Nach Auswaschen des sekundären Antikörpers, werden die Embryonen eine Stunde in der A/B Lösung bei RT auf dem Schüttler inkubiert, wobei die Lösung ebenfalls mind. eine halbe Stunde vor Gebrauch angesetzt werden sollte, damit sich die Komponenten A (Avidin) und B (Streptavidin) miteinander verbinden. Erneut wird gründlich mit PBT gewaschen, bevor die Färbereaktion durch H₂O₂ aktivierte DAB-Lösung in Gang gesetzt und unter dem Binokular beobachtet wird. Während der Reaktion wird DAB durch die Peroxidaseaktivität in einen bräunlichen Niederschlag verwandelt. Gründliches Waschen mit PBT beendet die Reaktion. Die Embryonen werden nach wiederholtem Waschen mit PBS in 70% Glycerin aufbewahrt.

A/B Lösung (Merrettich-Peroxidase-Färbung)

Man gibt ca. eine Stunde vor Gebrauch 4 µl Lösung A und 4 µl Lösung B in 300 µl PBT (ABC-Kit von Vectastain), damit sich die Komponenten verbinden können.

DAB-Färbelösung:

Für Antikörperfärbungen 1 Tablette (10 mg) 3,3'-Diaminobenzidin (DAB) in 40 ml 1xPBS für 2 Stunden in Rotationsschüttler lösen. Vor der Färbereaktion wird 1 µl H₂O₂ zur Aktivierung hinzugegeben.

Tabelle 2.4 Verwendete Antikörper

primäre Antikörper	Konzentration	Herkunft/ Hersteller
anti- β -Galaktosidase aus Kaninchen	1:1000	Cappel
anti-Digoxigenin-POD aus Maus	1:500	Roche
anti-Digoxigenin-AP aus Maus	1:1000	Roche
anti-Reversed polarity aus Maus	1:5	DSHB
anti-Reversed polarity aus Kaninchen	1:200	(Halter <i>et al.</i> , 1995)
anti-Elav aus Ratte	1:2000	DSHB
anti-Fasciclin II aus Maus 1D4(intrazellulär)	1:10	DSHB
anti-BP102 aus Maus	1:20	DSHB
sekundäre Antikörper	Konzentration	Herkunft/Hersteller
Ziege-anti-Kaninchen-Biotin-gekoppelt	1:250	Dianova
Ziege-anti-Maus-Biotin-gekoppelt	1:250	Dianova
Ziege-anti-Kaninchen-AP-gekoppelt	1:250	Dianova
Ziege-anti-Maus-AP-gekoppelt	1:250	Dianova
Ziege-anti-Maus-Cy5-gekoppelt	1:250	Dianova
Esel-anti-Kaninchen-FITC-gekoppelt	1:250	Dianova
Esel-anti-Ratte-FITC-gekoppelt	1:250	Dianova
Esel-anti-Kaninchen-Cy5-gekoppelt	1:250	Dianova
Ziege-anti-Ratte-Cy3-gekoppelt	1:250	Dianova
Esel-anti-Kaninchen-Cy3-gekoppelt	1:250	Dianova

2.4. *In situ* Hybridisierung

Die Expression der im Zuge der Microarray Experimente identifizierten Kandidatengene wurde mit Hilfe von *in situ* Hybridisierungen im Embryo nachgewiesen. Um spezifische Ribonukleinsäure-Sonden (im weiteren RNA-Sonden) der Gene anfertigen zu können, wurde die *Drosophila* Gene Collection (DGC) Release1 bzw. 2 von Berkeley *Drosophila* Genome Project (BDGP) verwendet. Dieses Konsortium analysierte mehr als 240.000 sogenannter „Expressed Sequence Tags“ (ESTs), die die Sequenz ausgehend vom 3' Ende einer cDNA darstellt (Informationen unter: <http://www.fruitfly.org/DGC/index.html>). Daraus entstand eine Kollektion von mehr als 10.000 ESTs, die als bakterieller Glycerinstamm (*E.coli* DH5 α) in 384er Mikrotiterplatten, aufbewahrt bei -80°C, zur Verfügung steht. Die cDNAs stammen aus unterschiedlichen Entwicklungsstadien und

Gewebe von *Drosophila* und sind in 3 unterschiedliche Vektoren (Vektorkarten siehe Anhang) einkloniert.

2.4.1. Präparation von Plasmid-DNA

Der Glycerinstock des gewünschten ESTs wird auf LB-Platten mit geeigneter Resistenz ausgestrichen und über Nacht im Brutschrank bei 37°C inkubiert. Am nächsten Tag wird eine Kolonie mit einer sterilen Pipettenspitze entnommen und damit eine „Über Nacht Kultur“ (3 ml LB-Medium mit Resistenz) angeimpft, die im 37°C Raum inkubiert wird. Am folgenden Morgen werden mind. 2 ml der Kultur bei max. 4000 rpm pelletiert und mit dem „Mini-Prep Kit“ (Qiagen, Hilden) nach Angaben des Herstellers die Plasmid-DNA isoliert. Hierbei wird das Prinzip der alkalische Lyse verwendet, wobei die Bakterienzellen mittels Detergenz (meist SDS) aufgeschlossen werden, so daß die Plasmid-DNA frei in der Lösung vorliegt und isoliert werden kann. Da das ringförmige Bakterienchromosom mit der Zellwand verbunden ist, können die Bakterienzellen mit dem Chromosom durch einfaches Zentrifugieren von der Plasmid-DNA getrennt werden. Nun gibt man den Überstand, der die Plasmid-DNA enthält auf ein Zentrifugationssäulchen mit Membranfilter, über den die gebundene Plasmid-DNA aufgereinigt wird. Eine Veränderung des pH-Wertes ermöglicht die Freisetzung der Plasmid-DNA von der Membran. Die Bestimmung der Konzentration erfolgt photometrisch.

LB-Medium

10 g/l Trypton

5 g/l Hefe-Extrakt

10 g/l NaCl

in H₂O lösen und autoklavieren.

LB-Platten

LB-Medium wird 15 g/l Bacto-Agar zugegeben und nach dem Autoklavieren in sterile Petrischalen gegossen. Die Zugabe von Antibiotika erfolgt vorher in das auf 50°C abgekühlte LB-Medium. Die abgekühlten Platten können bei 4°C mind. 8 Wochen gelagert werden.

Antibiotika	Stamm-Konzentration	Gebrauchskonzentration
Ampicillin	50 mg/ml in H ₂ O	50 µg/µl
Chloramphenicol	34 mg/ml in Ethanol	170 µg/µl

2.4.2. Restriktionsverdau

Restriktionsendonukleasen schneiden die DNA an spezifischen Sequenzstellen und erzeugen dabei Doppelstrangbrüche mit glatten oder überhängenden Enden. Die in der Arbeit verwendeten Enzyme gehören alle dem Typ II an, wobei die Erkennungssequenz der Schnittstelle entspricht. Mit Hilfe dieser Endonukleasen können DNA-Fragmente von gewünschter Größe aus Plasmid-Vektoren ausgeschnitten werden und beliebig weiter verwendet werden. Jedes Restriktionsenzym benötigt unterschiedliche Bedingungen, wie Temperatur, Salzkonzentrationen und Inkubationszeit, um optimal arbeiten zu können (Angaben des Herstellers). Diese Methode wurde von mir zur Herstellung von RNA-Sonden verwendet. Die in die „multiple cloning site“ (MCS) eines Standardvektors einklonierte cDNA kann mit Hilfe von flankierenden RNA-Polymerase Promotorbindestellen durch *in vitro* Transkription (Übersetzung der DNA in RNA) in die antisense-RNA des klonierten ESTs umgeschrieben und für RNA *in situ* Hybridisierungen (Kapitel 2.4) verwendet werden. Um Sonden einer definierten Größe, die zwischen 400-1200 bp liegen sollte, zu gewinnen, wird der Plasmid-Vektor mit einem geeigneten Enzym verdaut. Hierfür wird ca. 1,5 µg Plasmid-DNA eingesetzt. Anschließend wird ein Teil der Restriktion einer Gelelektrophorese unterzogen. Hier wird zum einen festgestellt, ob die Restriktion erfolgreich verlaufen ist und ob die entstandenen DNA-Fragmente der richtigen Größe entsprechen.

Restriktionsansatz (Endvolumen 20µl)

Plasmid-DNA (1-2 µg)	X µl (<20µl)
H ₂ O	Y µl
10x Restriktionspuffer	2 µl
Restriktionsenzym	1 µl

Für 2 Stunden bei 37°C inkubieren, wenn nicht anders angegeben.

2.4.3. DNA-Gelelektrophorese

Mit Hilfe der Elektrophorese werden Nukleinsäuren, die aufgrund ihrer negativen Ladung im elektrischen Feld zur Kathode wandern, ihrer Größe entsprechend aufgetrennt. Durch Zugabe von 2 µl EtBr in das meist 1%ige TAE-Agarosegel (50 ml) können die DNA Fragmente unter UV-Licht anschließend sichtbar gemacht werden. DNA-Gele laufen unter nicht-denaturierenden Bedingungen und das EtBr interkaliert zwischen den Basen der DNA und lagert sich im DNA-Molekül ein. Als Laufpuffer wird 1x TAE verwendet und

die Spannung beträgt 80 mV. Zum Beladen der Gele wird der DNA-Probe 6fach konzentrierter Beladungspuffer zugefügt, der sich durch einen hohen Glycerin-Anteil auszeichnet und die Lauffront im Gel durch Farbstoffe anzeigt. Zusätzlich wird eine Spur im Gel mit einem Molekulargewichtsmarker (meist EcoRI/HindIII restringierte Lambda-DNA) beladen, der definierte Fragmente liefert, mit denen die Größe der Proben-DNA eingeschätzt werden kann.

Tris-Acetat-EDTA (TAE)-Stammlösung (50x, pH 8.3):

242 g Tris in 500 ml Aqua dest. lösen, 100 ml 0,5 M Na₂EDTA, pH 8 und 57,1 ml Eisessig zugeben und auf 1 Liter mit Aqua dest. auffüllen. (2 M Tris-Acetat und 50 mM EDTA (pH 8,0))

2.4.4. *in vitro* Transkription

Eine Möglichkeit, die Aktivität eines Gens nachzuweisen, ist die Anfärbung der Proteincodierenden mRNA. Dazu stellt man eine markierte antisense-Sonde her, die durch eine Farbreaktion nachgewiesen werden kann. Dazu werden während des Umschreibens der Matrizen-DNA Digoxigenin-tragende Uraciltriphosphate (UTPs) in den RNA-Strang eingebaut. Die Digoxigenin-Moleküle (DIG) ragen aus dem RNA-Strang heraus und hieran bindet später ein anti-DIG Antikörper, der mit alkalischer Phosphatase gekoppelt ist. Mit einer alkalischen Phosphatase Färbung läßt sich so das Transkript im Gewebe nachweisen. Für die *in vitro* Transkription wird das gewünschte Plasmid durch Restriktion linearisiert, gefällt und ca. 1 µg geschnittene DNA in 13,5 µl DEPC-Wasser gelöst. Der unten aufgeführte Transkriptionsansatz wird gemischt und die Sonde wird bei 37°C für 2 Stunden synthetisiert. Anschließende Zugabe von DNaseI entfernt die Matrizen-DNA und die Fällung der RNA mit 4 M LiCl entfernt alle nicht eingebauten Nukleotide, die in einer *in situ* Hybridisierung Hintergrund erzeugen würden. Die Sonden werden in 50 µl DEPC-Wasser gelöst und bei -20°C gelagert. Bei jedem Gebrauch muß auf sauberes Arbeiten mit Handschuhen und gestopften Spitzen geachtet werden und die Sonden müssen auf Eis gehalten werden, um Kontamination mit RNAsen zu vermeiden.

***In vitro* Transkriptionsansatz (Endvolumen 20µl)**

linearisierte Matrizen-DNA (1 µg)	13,5 µl
RNAse Inhibitor (40U/µl)	0,5 µl
RNA-Dig Labeling Mix (Roche)	2,0 µl

10x Transkriptionspuffer	2,0 μ l
RNA-Polymerase	2,0 μ l

2.4.5. Hybridisierung

Über Nacht gesammelt Embryonen werden wie für eine Antikörperfärbung dechorionisiert und fixiert. Hierbei enthält die Fixierlösung jedoch einen höheren Anteil an Formaldehyd. Die so fixierten Embryonen lassen sich ebenfalls für Monate bei -20°C lagern. Zu Beginn der *in situ* Hybridisierung, im folgenden mit ISH abgekürzt, werden die Embryonen durch mehrmaliges Waschen mit PBTween rehydriert. Anschließend tauscht man das PBTween schrittweise gegen Hybridisierungspuffer aus und prähybridisiert die Embryonen für mind. eine Stunde bei 55°C , um später unspezifische Hintergrundfärbung zu vermeiden. Dafür wird einzelsträngige Heringssperma-DNA der Hybridisierungslösung zugegeben, die potentielle unspezifische Bindestellen der RNA-Sonden blockiert.

Bevor die hergestellten RNA-Sonden eingesetzt werden, wird in einem sogenannten „Dot-Test“ bestimmt, in welcher Konzentration die Sonden verwendet werden können. Hierbei wird 1 μ l der Sonde auf eine positiv geladene Nylonmembran gegeben und mit UV-Bestrahlung die RNA auf der Membran kovalent verknüpft (1200 KJ/cm^2). Anschließend werden, wie bei der ISH, unspezifische Bindestellen auf der Membran durch Waschen mit Blockingpuffer abgesättigt. In diesen Puffer gibt man für 30 min. den AP-gekoppelten anti-DIG Antikörper (1:7500), der spezifisch an die DIG-Moleküle der Sonde bindet. Die Färbereaktion erfolgt nach mehrmaligem Waschen mit Tweenpuffer wie in Kapitel 2.3.2 beschrieben. Aus der Intensität der Färbung läßt sich die einzusetzende Konzentration der Sonde ablesen, die in der Regel zwischen 3 μ l-15 μ l gelöst in 250 μ l Hybridisierungslösung liegt.

Im Anschluß an die Prähybridisierung wird die bei 95°C für 5-10 min. denaturierte Sonde auf die Embryonen gegeben, wodurch die RNA-Sonde linearisiert wurde und so besser an die mRNA im Gewebe binden kann. Die Hybridisierung erfolgt über Nacht in einem auf 55°C temperierten Schüttler. Am nächsten Tag werden die Sonden abgezogen und wieder eingefroren, da sie mehrmals verwendet werden können. Nun wird für jeweils eine halbe Stunde mit reiner und mit 1:1 mit PBTween verdünnter Hybridisierungslösung bei 65°C stringent gewaschen. Es folgen 4 Waschritte für jeweils 20 min. mit PBTween ebenfalls bei 65°C . Anschließend wird der AP-gekoppelte anti-DIG Antikörper (hier 1:1000) über Nacht bei 4°C oder für 2 Stunden bei RT inkubiert. Nachdem der Antikörper ausgewaschen wurde, erfolgt die in Abschnitt 2.3.2 beschriebene alkalische Phosphatase

Färbereaktion, die bei ISH normalerweise einen längeren Zeitraum als bei Antikörperfärbungen einnimmt.

Wird die ISH mit einer Antikörperfärbung verbunden, erfolgt zuerst die Detektion der ISH durch alkalische Phosphatase Färbung und anschließend die Meerrettich-Peroxidase Färbung des Antikörpers. Dafür erfolgt die Inkubation des anti-DIG Antikörpers, der an die DIG-markierte RNA-Sonde bindet, zusammen mit dem primären Antikörper gegen das gewünschte Protein, z. B. Repo, für 2 Stunden bei RT. Anschließend wird mit PBTween gut gewaschen und der biotinylierte sekundäre Antikörper über Nacht bei 4°C inkubiert. Am dritten Tag erfolgt, nach Auswaschen des ungebundenen sekundären Antikörpers die AP-Färbung zur Detektion der ISH. Nach intensivem Waschen mit PBTween, um die Färbung durch Substratzug und pH-Wert Änderung zu stoppen, wird der A/B Komplex inkubiert und anschließend die DAB-Färbung wie in Kapitel 2.3.3 durchgeführt.

Bei fluoreszenter ISH (FISH) werden die fixierten Embryonen vor der Prähybridisierung mit Natriumborhydridlösung (0,001 g/ml PBS) behandelt, die den autofluoreszenten Hintergrund des Darmgewebes unterdrückt. Die Prähybridisierung und Hybridisierung erfolgt wie oben beschrieben. Als primärer Antikörper wird anstelle des AP-gekoppelten Antikörpers ein Peroxidase-gekoppelter (POD) anti-DIG Antikörper verwendet. Die fluoreszenten sekundären Antikörper werden im Dunkeln inkubiert und nach anschließendem Waschen können die gefärbten Embryonen im Kühlschrank gelagert werden.

Fixativ zur *in-situ* Hybridisierung

PBS-DEPC	350µl
Heptan	500µl
Formaldehyd (37%)	150µl

Für Fixierungen im 15ml Falcon werden die Volumina verfünffacht.

Hybridisierungspuffer für *in-situ* Hybridisierung

50% (V/V) Formamid

5x SSC

0,1% Tween20

Für die Prähybridisierung wird 10 µl/ml von einzelsträngiger Heringssperma-DNA (10mg/ml) zugegeben.

TNT-Puffer für das TSA-Kit

1M Tris-HCl, pH 7,5

0,15M NaCl

0,05% Tween20

Färbelösung des TSA Kit

12 µl fluorophore Cy3/Cy5 Tyramide in 900 µl Amplification Reagenz.

2.4.6. „Whole-mount“-Präparate

Ausgewählte Embryonen werden auf einen Objektträger in einen Tropfen 70%iges Glycerin überführt. Auf den Objektträger sind an den Rändern kleine Deckgläser mit Nagellack aufgeklebt, die als Abstandhalter fungieren, damit die Präparate nicht zerquetscht werden. Ein größeres Deckglas deckt die Embryonen ab und bringt die Embryonen durch vorsichtiges Verschieben in die richtige Position, meist mit ventraler oder lateraler Ansicht des Nervensystems.

2.4.7. Filetpräparation

Um eine zelluläre Färbung im Nervensystem zu dokumentieren, muß das Bauchmark frei präpariert werden. Dafür wird der Embryo in wenig 70%igem Glycerin auf einen Objektträger gegeben. Präparationen der embryonalen Stadien 8 bis frühes Stadium 12 werden so geöffnet, daß man später eine ventrale Ansicht auf den Embryo hat. Dabei wird der Embryo seitlich hingelegt und mit einer feinen Präpariernadel der verlängerte Keimstreif umgeklappt. Mit einer breiteren Nadel läßt sich vorsichtig der wachsende Darm entfernen und der Embryo wird auf der dorsalen Seite abgelegt.

Für spätere Stadien (12.2 - spät 16) wird der Embryo mit der Ventralseite auf den Objektträger aufgelegt, der Kopf wird vorsichtig flach nach oben präpariert oder abgetrennt und das posteriore Ende wird abgetrennt. Nun wird eine Seite der Epidermis auf den Objektträger geklappt. Da die inneren Organe, insbesondere der in Schlingen gelegte Darm mit der Epidermis verbunden ist, müssen diese Verbindungen durchtrennt werden und die Organe über die nicht aufliegende Epidermisseite ausgerollt werden. So liegt nun das Präparat flach auf und man hat freien Aufblick auf das Nervensystem. Eingebettet werden die präparierten Embryonen unter einem Deckglas mit 70%igem Glycerin bei sichtbaren Färbungen oder einem Tropfen Vectashield Mounting Medium bei fluoreszenten Färbungen. Zum Abschluß werden die Präparate mit Nagellack rundherum versiegelt und im Kühlschrank aufbewahrt.

„Whole-mount“- oder Filet-Präparate, die durch alkalische Phosphatase bzw. Meerrettich-Peroxidase angefärbt wurden, werden an einem Mikroskop mit Kamera (Axiocam) ausgewertet und mit der Adobe Photoshop Software weiterbearbeitet.

Die Dokumentation von fluoreszenz-gefärbten Filetpräparationen erfolgt an einem konfokalen Laserscan Mikroskop der Firma Leica (TCS SPII). Vorher wird die Qualität des Präparates und der Färbung an einem Olympus BX 50 WI Mikroskop mit Kamera beurteilt. Die sequentiell gescannten Bilder (getrennte Aufnahme der Färbkanäle, um Überlagerungen der Emissionswellenlängen der Farbstoffe zu verhindern) werden anschließend mit der Adobe Photoshop Software weiterbearbeitet.

2.5. Geräte und Materialien

2.5.1. Lösungen und Puffer

Für diese Arbeit wurden alle Chemikalien in Analysequalität von folgenden Firmen bezogen: Amersham, MBI Fermentas, Merck, NBI, Roche und Sigma-Aldrich. Abweichungen hiervon werden gesondert erwähnt. Das Ansetzen der Lösungen erfolgte mit einfach destilliertem, autoklaviertem Wasser, wenn nicht anders angegeben. Bei Arbeiten mit RNA wurden alle Lösungen mit DEPC behandelt, um RNAsen zu zerstören.

2.5.2. Computer und Software

Es wurden sowohl Apple Mcintosh als auch PC Computersysteme verwendet, wobei in der Regel Windows XP bzw. Mac OS X als Betriebssystem diente. Lediglich die Auswertung der Microarrays erforderte das Linux Betriebssystem. Als Software wurden verwendet: Adobe Photoshop Version 7.0; Adobe Illustrator 10.0; Endnote 7.0; GenePix 5.0 (Axon Instruments); Genespring (Silicon Genetics); GeneTac (Perkin Elmer Life Sciences); Leica Confocal Software (LCS Lite); Microsoft Excel und Word; Mozilla Firefox; ProgRes 4.0 (Kontron Elektronik).

3. Ergebnisse

3.1. Microarray-Screen

Im ersten Teil dieser Ergebnisse sind die Durchführung und die Resultate der Microarray-Experimente zusammengefaßt. Hier stand die Identifizierung von Zielgenen des Transkriptionsfaktors *gcm* im Mittelpunkt, der als Hauptfaktor für die Induktion von glialem Schicksal in neuronalen Vorläuferzellen verantwortlich ist. Im Verlauf dieser Genom-weiten Suche wurde sowohl die ektopische Expression von *gcm* mit dem Wildtyp verglichen (GOF), als auch der Funktionsverlust von *gcm* der wildtypischen Situation gegenübergestellt (LOF). Beide Ansätze wurden als Zeitverlaufsexperimente durchgeführt, die einen zeitlichen Eindruck der Gliogenese und der daran beteiligten Gene geben sollen. Die in dieser Arbeit beschriebene Durchführung der Microarray-Hybridisierungen der LOF-Analyse sowie das Einscannen dieser Microarrays wurden von meinem Betreuer Benjamin Altenhein durchgeführt.

Diese Genom-weite Suche nach *gcm*-abhängigen Genen wurde in der Zwischenzeit in der Zeitschrift *Developmental Biology* unter dem Titel „Expression profiling of glial genes during *Drosophila* embryogenesis“ veröffentlicht (Altenhein *et al.*, 2006).

3.1.1. Microarray-Kontrollen

Im Vorfeld wurden viele Kontrollen in unterschiedlichen Abschnitten des Experimentes durchgeführt. Dazu zählten neben der Überprüfung der gesammelten Embryonen nach Stadium und Entwicklung mit Hilfe von Antikörperfärbungen, sowie der Kontrolle der RNA-Qualität durch Gelelektrophorese und Northern Blot, auch Microarray-Testhybridisierungen. Die Methodenkontrolle mit identischem Material wurde mit RNA aus wildtypischen Embryonen (OregonR) des embryonalen Stadiums 10 in 3facher Wiederholung durchgeführt. Hierfür wurde die identische Wildtyp-RNA mit den Fluorochromen Cyanin 3 und Cyanin 5 (Cy3 und Cy5) markiert und hybridisiert. Da alle Gene zweimal auf dem Microarray vertreten sind ergeben sich somit 6 Meßwerte pro Gen. Durch die Auswertung mit der M-CHiPS Software konnte das methodische Hintergrundrauschen bestimmt werden.

Die Gleichförmigkeit der Hybridisierung über den gesamten Microarray wird durch den Korrelationskoeffizienten angegeben, der die Übereinstimmung der Pixelintensitäten des 1. und 2. Meßwertes anzeigt. Alle Koeffizienten der Kontroll-Microarrays wiesen Werte zwischen 0.98 und 1 auf, was auf eine sehr hohe Reproduzierbarkeit der Hybridisierung schließen läßt. Die Analyse erfolgte wie in Abschnitt 2.2.10 beschrieben und die Ergebnisse sind in Tabelle 3.1 in den Spalten „*wt* vs. *wt*“ dargestellt. In der ersten Spalte ist die Anzahl der verbliebenen Gene nach dem Intensitätsfilter und dem Verhältnis-Filter angegeben, jedoch ohne die Benutzung des MinMax-Filters. Hier wird mit aufsteigender differentieller Regulation (Verhältnis 1.0-2.0) die Anzahl der Gene immer geringer, wobei ein deutlicher Bruch zwischen dem Verhältnis-Filter von 1.1 und 1.2 deutlich wird. Wie bereits im Kapitel Material und Methoden erwähnt läßt dieser Filter alle Gene passieren, die nur einen der Meßwerte oberhalb der gewünschten Grenze besitzen. Daher liegt der tatsächliche Median meistens deutlich niedriger, wenn man die einzelnen Meßwerte für ein Gen betrachtet. In der Tabelle ist in Klammern die Anzahl der Gene angegeben, die eine 1.5fache differentielle Regulation oder größer im Median besitzen. Es zeigte sich, daß lediglich ein Gen diese Meßwerte aufweist und erst ein sehr stringenter MinMax-Filter von 0.5 konnte dieses Gen herausfiltern. Somit bleibt festzuhalten, daß bei einer Hybridisierung mit identischem Ausgangsmaterial nur ein einziges Gen eine differentielle Regulation größer als 1.5 aufweist, was auf ein sehr geringes Hintergrundrauschen schließen läßt. Der theoretische Idealfall, daß alle gespotteten Gene ein Verhältnis von 1 zeigen, ist aufgrund von experimentellen Fehlerquellen nicht zu erwarten. Aufgrund dieser Ergebnisse kann für die Microarray-Experimente der GOF und LOF festgehalten werden, daß alle Gene, die ein Verhältnis größer als 1.5 besitzen, differentiell reguliert sind und zur weiteren Analyse herausgefiltert werden können. Somit konnte eine höhere Sensitivität dieses Filters erreicht werden, da dieser Wert nicht der allgemein verwendeten Analysegrenze entspricht, bei der Gene erst ab einem Verhältnis von 2.0 als differentiell reguliert eingestuft werden.

Weiterhin wurden die beiden Ausgangsstämme der ektoptischen Expression (GOF), der Gal4-Treiber *Mz1060* und der UAS-*gcm* Stamm, miteinander verglichen. Dies sollte mögliche Veränderungen in der Genexpression der phänotypisch wildtypischen Fliegen aufzeigen, die in verschiedenen Laboratorien aus unterschiedlichen Wildtypstämmen generiert wurden. Daraus resultierende differentielle Genregulation könnte in der Analyse der GOF zu „falsch positiven“ Kandidatengen führen. Für diese Kontrolle wurde parallel präparierte RNA von Embryonen im Entwicklungsstadium 9 verwendet und die 3

hybridisierten Microarrays wurden wie vorher beschrieben analysiert. Es sind im Vergleich der beiden heterozygoten Ausgangsstämme weitaus mehr Gene differentiell reguliert als bei der Kontrolle mit identischer Wildtyp-RNA. Auch hier zeigt sich eine starke Reduktion der verbliebenen Gene bei einem Verhältnis zwischen 1.1 und 1.2 und erneut zwischen 1.4 und 1.5, wie schon bei den identischen *wt* Hybridisierungen. Es verbleiben allerdings insgesamt 171 Gene, die ein Verhältnis größer 1.5 zeigen. Auch der Gebrauch des stringenten MinMax-Filters zeigte keine deutliche Verminderung dieser regulierten Gene. Somit handelt es sich hierbei um Unterschiede in der Genexpression, die auf die verschiedenen Genotypen der wildtypischen Fliegenstämme zurückzuführen sind. Da diese differentiell regulierten Gene später irrtümlich als Kandidatengene im Vergleich der ektopischen Expression von *gcm* gegenüber dem Wildtyp auftauchen würden, wurde die RNA beider Stämme als Wildtyp-Kontrolle der GOF zu gleichen Teilen für die Microarray-Probe verwendet. Dadurch sollten die unterschiedlichen Genaktivitäten innerhalb der beiden Stämme, die der ektopischen Expression von *gcm* mit dem UAS/Gal4-System zugrunde liegen, auf dem Microarray ausgeglichen werden.

	ohne MinMax		MinMax 0.0		MinMax 0.2		MinMax 0.5	
	<i>wt</i> vs. <i>wt</i>	Gal4 vs. UAS	<i>wt</i> vs. <i>wt</i>	Gal4 vs. UAS	<i>wt</i> vs. <i>wt</i>	Gal4 vs. UAS	<i>wt</i> vs. <i>wt</i>	Gal4 vs. UAS
Verhältnis 1.0	10279	10747	2986	2880	26	399	0	85
Verhältnis 1.1	7692	10170	2723	2833	26	399	0	85
Verhältnis 1.2	2302	7306	1127	2359	26	398	0	85
Verhältnis 1.3	729	4281	360	1613	23	385	0	85
Verhältnis 1.4	264	2449	109	1060	13	340	0	85
Verhältnis 1.5	150 (1)	1535 (171)	56 (1)	663 (162)	4 (1)	271 (94)	0	85 (85)
Verhältnis 1.6	103	1012	36	454	1	213	0	85
Verhältnis 1.7	83	690	27	314	1	163	0	81
Verhältnis 1.8	67	506	23	235	1	130	0	72
Verhältnis 1.9	54	387	19	183	1	107	0	63
Verhältnis 2.0	44	296	15	131	0	87	0	54

Tabelle 3.1 Wildtyp-Kontrollen

Die Tabelle zeigt die Anzahl der mit M-CHiPS gefilterten Gene mit einer differentiellen Regulation von 1.0 bis 2.0 und unterschiedlich stringenten MinMax Filtern. Verglichen wurden Cy3 bzw. Cy5 markierte identische *wt* RNA (*wt* vs. *wt*), um methodisches Hintergrundrauschen zu bestimmen. Außerdem wurden der UAS-*gcm* Stamm (UAS) mit dem Gal4-Treiber *Mz1060* (Gal4) verglichen, um differentielle Genexpression der verschiedenen *wt*-Hintergründe festzustellen.

Leider kann Ähnliches nicht für die LOF-Analyse angewendet werden. Hier wird die aus dem Wildtyp „*Seleven*“ erzeugte Mutante *gcm*^{N7-4} (Vincent *et al.*, 1996) mit dem Wildtyp „*Oregon R*“ auf dem Microarray verglichen. Die heterozygoten, balancierten Mutanten sind nicht als Wildtyp-Kontrolle geeignet, da die Balancer-Chromosomen schwere Gen-Defekte aufweisen und oft Letalfaktoren angehäuft haben. Dieser „Wildtyp“ würde im Vergleich mit den *gcm* mutanten Embryonen Gene aufzeigen, die aufgrund dieser Letalfaktoren, die die *gcm* Mutanten nicht besitzen, differentiell reguliert sind. Daher ist eine anschließende Verifizierung der gefilterten Gene, z. B. durch ISH unerlässlich.

3.1.2. Der Gal4-Treiber *Mz1060*

Die Gal4-Linie *Mz1060* wird ausschließlich im Nervensystem von *Drosophila* exprimiert. Dies ist eines der wichtigsten Auswahl-Kriterien, da somit die Induktion von glialem Zellschicksal auf neural-kompetentes Gewebe beschränkt wird und somit unbekannte Nebeneffekte vermieden werden. Die von Freeman *et al.* und Egger *et al.* verwendete Treiberlinie „*scabrous*“ zum Beispiel wird im gesamten ventralen Neuroektoderm exprimiert, aus dem das Nervensystem, aber auch epidermale Zellen, entstehen. Es konnte gezeigt werden, daß durch die Mißexpression von *gcm* in epidermale Gewebe das gliale Markergen Repo, wie auch der neuronale Marker Elav angeschaltet werden und sich sowohl die Morphologie als auch das Migrationsverhalten der epidermalen Zellen ändert (Akiyama-Oda *et al.*, 1998). Die dadurch veränderte Genexpression könnte in einem Microarray-Experiment differentielle Regulation in Genen hervorrufen, die nicht unserer Fragestellung entsprechen. Ein weiteres Kriterium, das für die Verwendung der *Mz1060*-Linie spricht, ist das temporäre Profil. Die Expression beginnt im embryonalen Stadium 10, hat seinen Höhepunkt in Stadium 13 und bleibt bis Stadium früh 16 erhalten, wodurch es der natürlichen *gcm* Expression sehr ähnlich und für eine ektopische Expression von *gcm* geeignet ist. Die Verkreuzung der Gal4-Linie mit einem UAS-*lacZ* Stamm machte eine Antikörperfärbung gegen β -Galaktosidase (β -Gal) möglich. Es konnte beobachtet werden, daß der Gal4-Treiber spezifisch im ZNS exprimiert wird. Die Färbung beginnt in Stadium 10 in einzelnen Zellen, verstärkt sich bis Stadium 14, in dem mind. 60% aller Zellen des ZNS angefärbt sind, und schwächt sich bis zum Stadium Mitte 16 ab. Um eine zelluläre Beschreibung des Gal4-Treibers zu erhalten, wurden Doppelfärbungen erneut gegen β -Gal, um das Expressionsmuster von *Mz1060* zu zeigen zusammen mit dem glialen Marker Repo durchgeführt. Die fluoreszenten Antikörperfärbungen gegen β -Gal, dargestellt in grün, und Repo, dargestellt in magenta, zeigen konfokale Laserscanning

Aufnahmen (LSM-Bilder) von Filetpräparaten. Die Bilder in Abbildung 3.1 zeigen eine Aufsicht des ZNS in den Stadien früh 11, spät 12, 14 und früh 16 (A-D). Doppelfärbungen in Gliazellen des Gal4-Treibers mit Repo erscheinen weiß. Es wurden bis zu 6 einzelne Schnitte (0,6-0,8µm Schnittdicke) übereinandergelegt. Hierdurch wird deutlich, daß die Gal4-Linie vor allem in Neuronen, aber auch in unterschiedlichen Subtypen von Glia (z. B. periphere Glia und subperineurial Glia), jedoch nicht in allen Gliazellen exprimiert wird. Auch läßt sich für ältere Stadien feststellen, daß nicht alle Neurone gefärbt sind, da medial im ZNS große Lücken erkennbar sind.

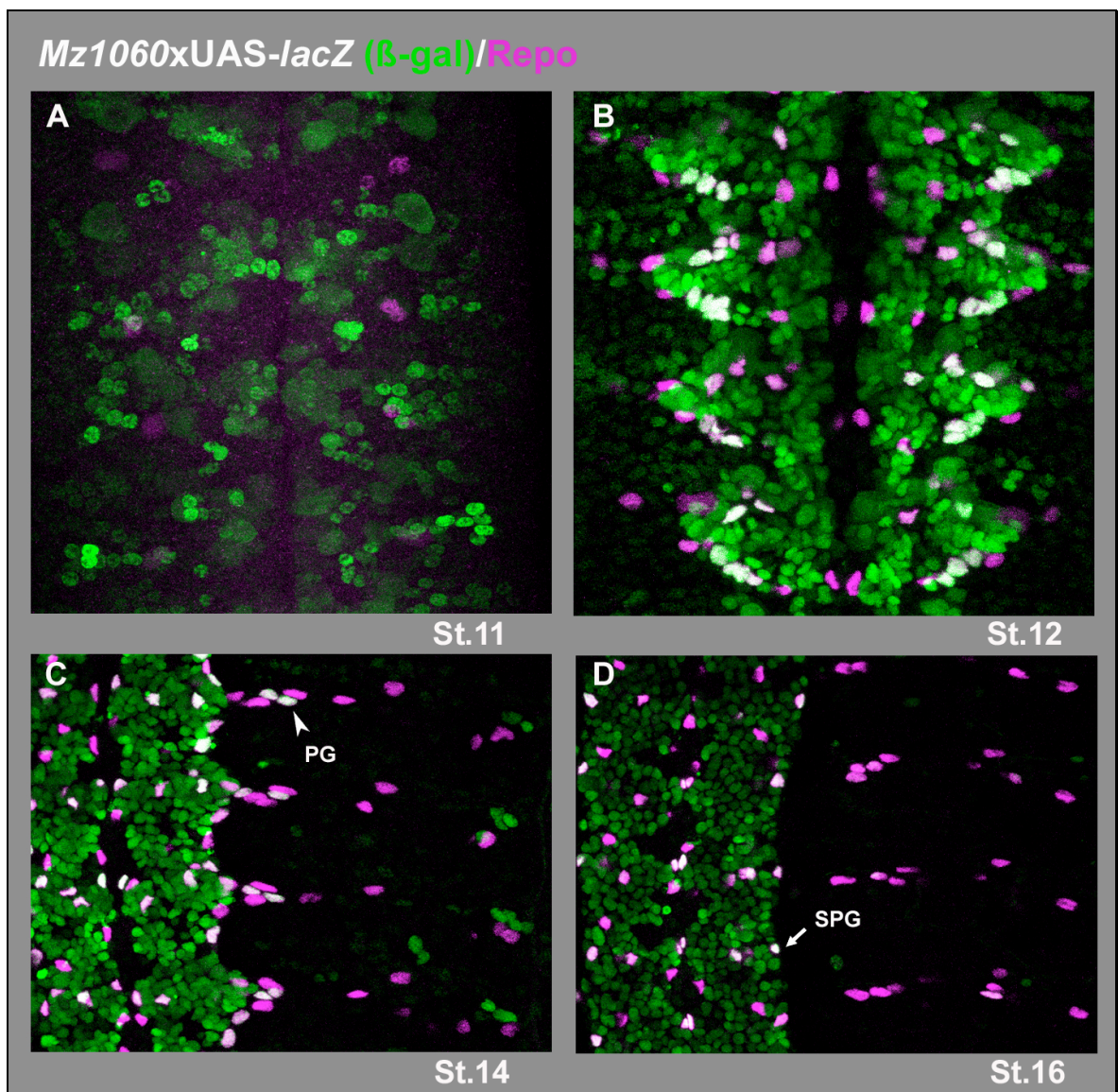


Abbildung 3.1 Expression von *Mz1060* mit Repo-Doppelfärbung

Bild A zeigt die Repo-Expression (magenta) im longitudinalen Glioblast, während die Gal4-Linie (grün) schon in vielen Neuronen exprimiert wird. Eine deutliche Verstärkung der *Mz1060* Expression ist bis Stadium 14 deutlich und wird dann bis Stadium 16 schwächer, bevor sie ganz verschwindet. Die Doppelfärbung mit Repo zeigt eine Expression in verschiedenen Subtypen, wie den peripheren Glia (PG, Pfeilspitze) und den subperineurial Glia (SPG, Pfeil), jedoch nicht in allen Gliazellen. Bei allen Abbildungen ist anterior oben.

3.1.3. Ektopische Expression von *gcm* im Vergleich zum Wildtyp

Es wurde gezeigt, daß eine ektopische Expression von *gcm* gliales Schicksal auf Kosten von Neuronen induzieren kann, was durch die Aktivierung des Transkriptionsfaktors Repo verdeutlicht wird (Akiyama-Oda *et al.*, 1998). Die Auswirkung der ektopischen Expression von *gcm* mit dem *Mz1060*-Treiberstamm (*Mz1060::gcm*) auf das embryonale Nervensystem ist in Abbildung 3.2 als konfokale LSM-Bilder mit maximaler Projektion (Übereinanderlagerung aller Schnitte) in den Stadien 12, 14 und 16 im Vergleich zum Wildtyp gezeigt.

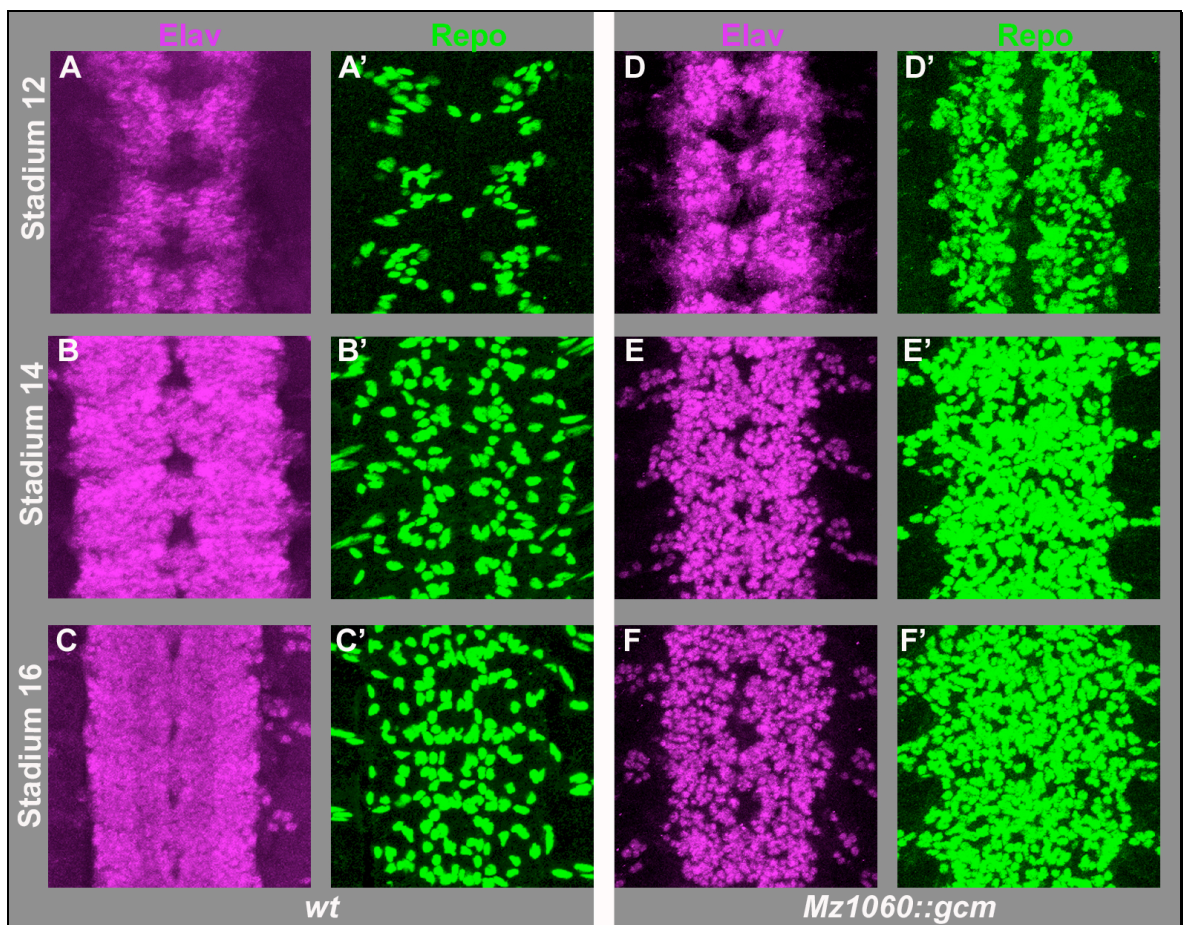


Abbildung 3.2 Ektopische Expression von *gcm* mit *Mz1060*

Die konfokalen Bilder zeigen maximale Projektionen des ZNS in *wt* (A-C') und *Mz1060::gcm* (D-F') Embryonen, gefärbt gegen Repo (grün) und Elav (magenta). Schon in Stadium 12 (A, A', D, D') läßt sich ein Überschuß an Gliazellen aufgrund der ektopischen Expression gegenüber dem Wildtyp erkennen, der in Stadium 14 (B, B', E, E') noch verstärkt ist. Eine Verminderung der Elav-positiven Zellen wird schon in Stadium 14 deutlich. In Stadium 16 (C, C', F, F) zeigt sich eine gleichmäßige Verteilung der auf Kosten von Neuronen gebildeten Gliazellen.

Zur Darstellung der Neurone wurde der allgemein als postmitotischer, neuronaler Marker verwendete Elav-Antikörper benutzt und mit dem glialen Marker Repo doppelt gefärbt. In den Abbildungen A-C bzw. A'-C' ist das wildtypische Expressionsmuster von Elav bzw. Repo dargestellt. In der gleichen Anordnung sieht man in den Bildern D-F und D'-F' die

Auswirkung der ektopischen Expression von *gcm* auf das ZNS. Es kann eine deutliche Vermehrung der Repo-positiven Zellen schon in Stadium 12 festgestellt werden, die in Stadium 14 noch gesteigert wird. Gleichzeitig beobachtet man eine Verminderung der Elav-positiven Zellen in den Stadien 14 und 16. Es zeigt sich eine gleichmäßige Verteilung der transformierten Gliazellen im gesamten Nervensystem.

Die Präparation der RNA der wildtypischen Kontrolle sowie der *gcm*-Überexpressionsembryonen erfolgte aus 7 unabhängigen Fliegenkreuzungen der Gal4-Treiberlinie *Mz1060* mit dem UAS-*gcm* Stamm B5446. Um die Synchronität der Eiablagen zu gewährleisten, wurden sowohl die beiden Ausgangsstämme, als auch die Kreuzung parallel für jeweils eine Stunde bei 25°C auf Ablage gesetzt und anschließend bei 29°C für 3-10 Stunden, je nach gewünschtem Stadium, inkubiert. Die Inkubation bei 29°C stellt optimale Bedingungen für das aus der Hefe stammende UAS/Gal4 System her. Vor jeder RNA-Präparation wurden Embryonen der drei Ablagen entnommen, fixiert und eine Antikörperfärbung gegen Repo durchgeführt, um das genaue Stadium, Fehlentwicklungen und die ektopische Expression zu überprüfen. Insgesamt wurden Embryonen von acht verschiedenen Stadien, Stadium 9 bis 16, gesammelt, die eine Fehlentwicklungsrate von 5-15% aufwiesen. Ablagen der Überexpressionsmutanten zeigten allgemein mehr fehlentwickelte Embryonen als die Ablagen der beiden Ausgangsstämme. Die RNA-Präparation erfolgte für jeden Kreuzungsansatz direkt nach der Inkubation. Es wurden mind. 4 Microarrays für jedes der acht Entwicklungsstadien hybridisiert. Hierbei wurde auf eine ausgeglichene Anzahl von „dye swaps“ geachtet und mit Ausnahme des embryonalen Stadiums 10, bei dem nur ein Farbstoff-Wechsel vorgenommen wurde, verwirklicht. Nur Microarrays, die einen Korrelationskoeffizienten zwischen 1 und 0.8 aufwiesen, wurden analysiert wie in den Abschnitten 2.2.9 und 2.2.10 beschrieben.

3.1.4. Automatisiertes Sortieren der *gcm*-mutanten Embryonen

Während bei der Kreuzung der Gal4-Linie mit dem UAS-Stamm alle Embryonen eine ektopische Genexpression von *gcm* zeigen, führt die Verkreuzung der heterozygot balancierten *gcm*^{N7-4}-Mutante (Vincent *et al.*, 1996) nur zu einem Viertel homozygot mutanter Embryonen, die in einer Eiablage erkannt werden müssen. Diese Unterscheidung muß an lebenden Embryonen möglich sein, da die RNA-Präparation nicht von fixierten Embryonen erfolgen kann. Infolgedessen wurde ein Balancerchromosom mit GFP verwendet. Somit entstehen dem Kreuzungsschema in Abbildung 3.3 entsprechend folgende Genotypen: ein Viertel nicht GFP-leuchtende, homozygot mutante Embryonen,

50% heterozygote Embryonen mit GFP und 25% stark GFP-leuchtende, homozygote Balancertiere.

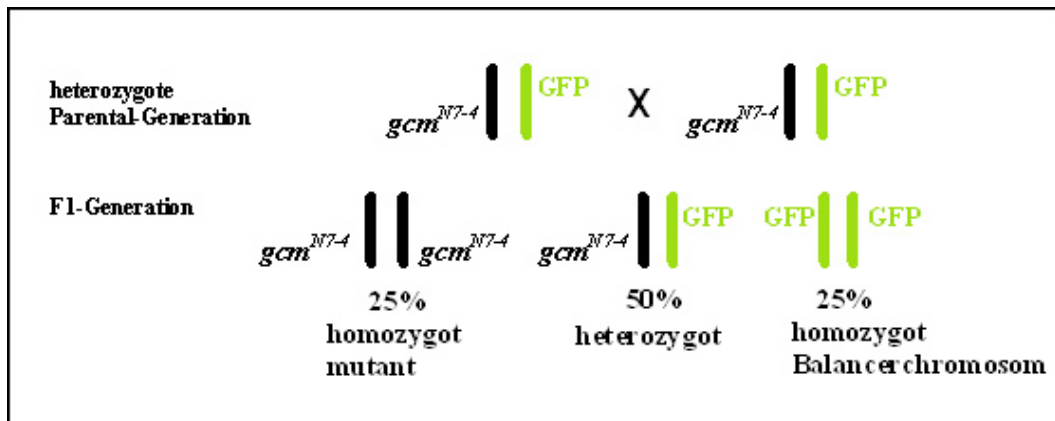


Abbildung 3.3 Kreuzungsschema der GFP-balancierten Mutanten

Die letale Mutation *gcm*^{N7-4}, die ein inaktives Protein zur Folge hat (Vincent *et al.*, 1994), wird über ein GFP-tragendes Balancer-Chromosom bewahrt. Kreuzt man die heterozygote Parental-Generation mit sich selbst, erhält man in der F1-Generation drei genotypisch unterschiedliche Nachkommen, in denen die homozygot mutanten Embryonen durch fehlende GFP-Expression erkennbar sind.

Da uns freundlicherweise ein *Drosophila* Embryo-Sortiergerät (CopasTM Select Embryo Sorter (Union Biometrica, Somerville, MA, USA)) im Labor von Dr. Anne Ephrussi (EMBL, Heidelberg) zur Verfügung stand, konnten große Mengen an mutanten Embryonen sortiert und auf eine künstliche RNA-Amplifizierung verzichtet werden. Das automatisierte Sortieren ist in Kapitel 2.1.9 erklärt. Um unterschiedliche Entwicklungsstadien (10-16) optimal zu sortieren, wurden 2 verschiedene Balancer-Chromosomen verwendet. Für die jüngeren Stadien bewährte sich der „*Kr*-GFP-Balancer“, ein unter der Kontrolle des *Krüppel*-Gen exprimiertes GFP, aufgrund seiner schon in jungen Stadien, starken GFP-Expression. Für die übrigen Stadien, 13-16, wurde ein ubiquitär exprimiertes GFP (*Ubi*-GFP-Balancer) verwendet (Casso *et al.*, 2000; Casso *et al.*, 1999).

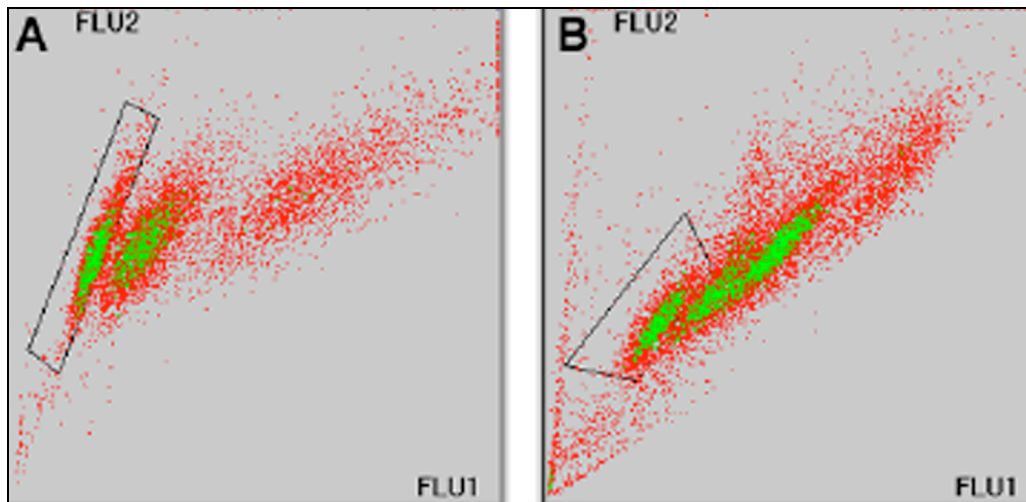


Abbildung 3.4 Automatisiertes Sortieren von Embryonen

Die Bilder A und B zeigen die Bildschirmdarstellung des Copas™ Select Embryo Sorter während des Embryo-Sortiervorganges der Kr-GFP- (Bild A) und Ubi-GFP- (Bild B) balancierten Mutanten. Die X-Achse stellt die GFP-Fluoreszenz (FLU1) gegenüber der Autofluoreszenz auf der Y-Achse (FLU2) dar, wobei jeder rote Punkt einem sortierten Embryo entspricht. Durch grüne Bereiche werden große Mengen an sortierten Embryonen angezeigt. Mit beiden Balancer-Chromosomen konnten die drei Genotypen der F1-Generation, homozygot mutante Embryonen ohne GFP, heterozygote mit GFP und homozygote Balancertiere deutlich unterschieden werden. Die eingerahmte Population bestimmt die selektionierten, mutanten Embryonen.

Die Mutante wurde parallel mit dem Wildtyp auf Ablage gesetzt. Die Stundenablagen erfolgten, wie bei der GOF-Analyse, auf 25°C, wurden jedoch für die Entwicklungsstadien 12-16 anschließend bei 18°C inkubiert, um genügend Zeitraum für die Fortsetzung der Experimente zu schaffen. Die genauen Inkubationszeiten und Temperaturen sind in Tabelle 2.3 (Seite 23) aufgeführt. Nach der Inkubation wurden die Embryonen dechorionisiert, sortiert und danach sofort in flüssigem Stickstoff eingefroren. Auch hier wurden von jeder sortierten Fraktion Embryonen entnommen, fixiert und bezüglich Stadium, Entwicklung und Mutation überprüft. Eine Antikörperfärbung gegen Repo zeigte, daß die sortierten Embryonen mit einer Genauigkeit von 98% homozygot mutant waren. Dabei stellte sich auch heraus, daß die sortierten Ablagen des Stadiums 15 zu heterogen bezüglich der Entwicklungsstadien waren und somit nicht verwendet werden konnten. Somit fehlt dieser Zeitpunkt in der Microarray-Analyse, ebenso wie Stadium 9, für das kein geeigneter GFP-Balancer zur Verfügung stand. Insgesamt wurden ungefähr 1 Millionen Embryonen sortiert und 107.000 wurden als homozygot mutant in 25 Sortiervorgängen positiv selektiert. Die parallel auf Ablage gesetzte Wildtyp-Kontrolle (*OregonR*) wurde ebenfalls dechorionisiert und für den gleichen Zeitraum wie die Mutanten in 3%igem PBTween aufbewahrt, jedoch nicht sortiert. Aus den Stickstoffgefrorenen Embryonen des Wildtypes und der Mutante wurde die RNA präpariert und als Cy3 bzw. Cy5 markierte cDNA (und umgekehrt) auf dem Microarray hybridisiert. Auch hier wurde auf eine ausgeglichene Anzahl von Farbstoff-Wechseln für jeden Zeitpunkt

geachtet („dye swaps“), konnte aber im Fall von zwei Stadien (10 und 16) aufgrund von Materiallimitierung leider nicht verwirklicht werden. Für jedes der 6 Entwicklungsstadien (10-14 und 16) wurden mind. 4 Microarrays hybridisiert und mit der M-CHiPS Software analysiert.

3.1.5. M-CHiPS-Analyse

Die Analyse erfolgte mit der in Heidelberg entwickelten M-CHiPS-Software (Fellenberg *et al.*, 2001) für jedes einzelne Stadium der ektopischen Expression von *gcm* im Vergleich zur Wildtyp-Kontrolle (GOF) bzw. der *loss-of-function* Analyse von *gcm* im Vergleich zum *OregonR*-Wildtyp (LOF). Durch Herausfiltern der pixelschwachen (Intensitätsfilter), unregulierten (Verhältnis-Filter) und nicht-reproduzierbaren (MinMax-Filter) Gene wurden für jeden Zeitpunkt differentiell regulierte Kandidatengene herausgefiltert. Dabei wurde mit einer Pixelgrenze von 10.000 (50% aller Gene, siehe Abschnitt 2.2.10), einer 1.5fachen differentiellen Regulation und einem MinMax-Filter mit fallender Stringenz von 0,5, 0,2 und 0,0 analysiert und Gen-Listen erstellt, die als Grundlage für die weitere Analyse dienten. Um ein Zeitprofil jedes einzelnen Genes innerhalb des Experimentes (GOF bzw. LOF) aufzuzeigen, wurden die Listen jedes Zeitpunktes in einer Tabelle kombiniert. Da der Verhältnis-Filter alle Gene, die einen der acht Meßwert oberhalb der gewählten Grenze von 1.5 aufwiesen, passieren ließ, hatten viele Gene innerhalb der abgespeicherten Listen einen tatsächlichen Medianwert, der deutlich unterhalb der 1.5fachen Regulation lag. Daher wurden alle Listen manuell nachgefiltert und nur Gene mit einer differentiellen Regulation größer oder gleich ± 1.5 verblieben in den Gen-Listen. Die nachfolgenden Tabellen für die GOF und die LOF enthalten die Gesamtzahlen aller so gefilterten Gene, sowie die Aufteilung in hoch- bzw. runterregulierte Gene für jeden analysierten Zeitpunkt mit einem fallenden MinMax-Filter (0,5, 0,2 und 0,0). Da viele Gene zu mehreren Zeitpunkten differentiell reguliert sind, ist die angegebene Gesamtzahl kleiner als die Summe aller Stadien. Da manche Gene innerhalb des Zeitverlaufes, vor allem in der LOF, sowohl hoch- als auch runterreguliert sind, ist die Summe der differentiell regulierten Gene kleiner als die Summe der hoch- und runterregulierten Gene.

GOF	St.	St.	St.	St.	St.	St.	St.	St.	Gesamt	MinMax
	9	10	11	12	13	14	15	16		
1.5fach regulierte Gene	147	167	150	138	96	28	31	34	387	0.5
Hochregulierte Gene (>1.5)	116	149	143	137	84	27	31	28	316	0.5
Runterregulierte Gene (<-1.5)	31	18	7	1	12	1	0	6	71	0.5
1.5fach regulierte Gene	596	656	389	346	291	82	80	91	1152	0.2
Hochregulierte Gene (>1.5)	285	447	305	331	263	74	79	74	683	0.2
Runterregulierte Gene (<-1.5)	311	209	84	15	28	8	1	17	470	0.2
1.5fach regulierte Gene	877	743	425	395	388	107	107	111	1413	0.0
Hochregulierte Gene (>1.5)	399	496	328	372	322	98	106	89	789	0.0
Runterregulierte Gene (<-1.5)	478	247	97	23	66	9	1	22	625	0.0

Tabelle 3.2 Statistische Analyse der GOF

Dargestellt sind die Gesamtzahlen aller hoch- und runterregulierten Gene für jedes Stadium der GOF mit unterschiedlichem MinMax-Filter. Die rot hervorgehobene Anzahl an hoch- bzw. runterregulierten Genen mit MinMax 0.5, 0.2 und 0.0 wurde zur weiteren Analyse verwendet.

LOF	St.	St.	St.	St.	St.	St.	St.	St.	Gesamt	MinMax
	10	11	12	13	14	15	16			
1.5fach regulierte Gene	141	135	72	94	44		141	476	0.5	
Hochregulierte Gene (>1.5)	80	31	31	50	29		124	273	0.5	
Runterregulierte Gene (<-1.5)	61	104	41	44	15		17	205	0.5	
1.5fach regulierte Gene	414	382	344	319	111		368	1367	0.2	
Hochregulierte Gene (>1.5)	243	104	114	169	56		274	744	0.2	
Runterregulierte Gene (<-1.5)	171	278	230	150	55		94	658	0.2	
1.5fach regulierte Gene	598	575	627	632	245		560	2086	0.0	
Hochregulierte Gene (>1.5)	353	193	180	269	161		386	1056	0.0	
Runterregulierte Gene (<-1.5)	245	382	447	363	84		174	1080	0.0	

Tabelle 3.3 Statistische Analyse der LOF

Dargestellt sind die Gesamtzahlen aller hoch- und runterregulierten Gene für jedes Stadium der LOF mit unterschiedlichem MinMax-Filter. Die blau hervorgehobene Anzahl an hoch- bzw. runterregulierten Genen mit MinMax 0.5, 0.2 und 0.0 wurde zur weiteren Analyse verwendet.

3.1.6. Manuelles Filtern der Gen-Listen

Die Auswahl der potentiellen Kandidaten-Gene erfolgte zuerst aus der sehr stringenten MinMax-Liste 0.5, die die geringste Anzahl an Genen enthielt, und wurde in der 0.2 und 0.0 Liste fortgesetzt. Durch die Verbindung einer Negativ- und Positiv-Selektion konnte die Anzahl der potentiellen Kandidatengene auf ca. 14 % aller differentiell regulierten Gene minimiert werden. Informationen über die ausgewählten Gene wurden in der *Drosophila* Datenbank „Flybase“ recherchiert und in der Analyse berücksichtigt. Gene, denen schon eine funktionelle Rolle in der glialen Entwicklung nachgewiesen worden waren, waren von besonderem Interesse. Hier wurden die Gen-Listen nach ähnlich regulierten Genen durchsucht und in die Analyse aufgenommen. Gleiches gilt für Gene, die während der Auswertung der ISH Expression im ZNS oder anderen *gcm*-abhängigen Zellen zeigten.

Das manuelle Filtern konzentrierte sich auf die in der GOF-Analyse hochregulierten Gene und umgekehrt auf die runterregulierten Gene in der LOF-Analyse. Um die Expression jedes Genes im Verlauf der untersuchten Stadien zu untersuchen, wurden alle Gene nach Profil sortiert, beginnend mit den früh exprimierten Genen, und abhängig davon, in wieviel aufeinanderfolgenden Stadien sie differentiell reguliert sind. Bei dem manuellen Nachfiltern der Verhältnis-Werte (siehe Abschnitt 3.1.5) wurden alle M-CHiPS gefilterten Gene mit einer tatsächlichen differentiellen Regulation kleiner als 1.5 aus den Listen entfernt. Um das gesamte Expressionsprofil eines Genes zu überschauen, wurden die fehlenden Werte mit einer differentiellen Regulation kleiner als 1.5 aus einer Gesamtliste, die die normalisierten Werte jedes einzelnen Genes auf dem Microarray enthält, eingefügt (in den folgenden Tabellen ohne Hintergrundfarbe). Die Tabelle aller sortierten, differentiell regulierten Gene, die den manuellen Filterschritten zugrunde liegt, findet sich im Anhang.

Im ersten Schritt wurden in beiden Ansätzen alle Gene verworfen, die keine Änderung des Expressionsprofils zeigten, also in allen Stadien gleich stark hoch- oder runterreguliert waren. Außerdem wurden im Beispiel der GOF die Gene aus der Analyse genommen, die ein zu *gcm* gegenläufiges Profil zeigten, also schon in frühen Stadien stark hochreguliert waren und im Verlauf eine sich abschwächende, differentielle Regulation zeigten. Ein solches Expressionsprofil würde man nicht von einem *gcm*-abhängigen Ziel-Gen erwarten. Ein weiterer Filterschritt entfernte alle Gene ohne Verlaufsprofil. In diese Kategorie fallen Gene, die z. B. zu einem frühen Zeitpunkt und nochmals zu einem späten Stadium stark hoch- oder runterreguliert sind, aber in den dazwischen liegenden Zeitpunkten nicht

differentiell reguliert waren. Hiervon ausgenommen waren Gene, die in der GOF in Stadium 15 und /oder 16 differentiell hochreguliert waren, da es sich hierbei um indirekte Zielgene handeln könnte. Im Anschluß an diese Negativ-Auswahl wurden die gefilterten Gen-Listen positiv nach Ziel-Genen von *gcm* durchsucht. Als erstes Kriterium in der GOF wurde nach Genen gesucht, die ein ähnliches oder zeitlich versetztes Profil wie *gcm* auf dem Microarray zeigten, das durch den Gal4-Treiber bestimmt wird. Ein vergleichbares Auswahlkriterium kann in der LOF-Analyse nicht verwendet werden, da die Funktionsverlustmutante *gcm*^{N7-4} ein inaktives Gcm Protein synthetisiert, die initiale Transkription von *gcm* jedoch nicht von der Mutation betroffen ist. Die Runterregulation in den frühen Stadien 10 und 11 resultiert aus der fehlenden Autoregulation von *gcm*, für die ein funktionierendes Protein Voraussetzung ist. Ein besonderes Augenmerk galt Genen, die in den beiden Ansätzen eine antagonistische Regulation besaßen, also vergleichbar mit dem Profil von *gcm* in der GOF hochreguliert und in der LOF runterreguliert waren. Hierin wird der Vorteil dieses Microarray-Screens deutlich, nämlich die vergleichende Analyse von potentiell glialen Genen in der *gcm* Überexpressions- und der *loss-of-function* Situation. Weiterhin wurden Gene mit einer starken, differentiellen Regulation (Verhältnis-Werte größer 2.0) in den embryonalen Stadien 15 und 16 in der GOF analysiert. Umgekehrt wurden Gene aus der LOF, die in den frühen Stadien 10 und 11 stark runterreguliert waren, untersucht.

Insgesamt wurden durch diese manuellen Filterschritte aus ca. 2900 differentiell regulierten Genen ca. 400 potentielle *gcm*-abhängige Ziel-Gene ausgewählt. Eine Analyse dieser Gene begann mit einer Recherche in der Literatur, der *Drosophila* Flybase, der BDGP ISH-Datenbank (<http://www.fruitfly.org/cgi-bin/ex/insitu.pl>) und den bereits veröffentlichten Microarray-Screens (Egger *et al.*, 2003 und Freeman *et al.*, 2004). Für bisher unbeschriebene Kandidaten wurden EST-Klone aus der BDGP DGC-Kollektion verwendet, um Digoxigenin-markierte RNA-Sonden herzustellen und die Genexpression jedes potentiellen Zielgenes in Wildtyp-Embryonen aller Entwicklungsstadien durch ISH festzustellen.

3.1.7. Analyse der GOF

Für die ektopische Expression von *gcm* im Vergleich zum Wildtyp wurden 140 Gene als potentielle Kandidatengene herausgefiltert, RNA-Sonden hergestellt und ISH in Wildtyp-Embryonen aller Entwicklungsstadien durchgeführt. Informationen von Flybase oder der BDGP ISH-Datenbank ergaben, daß für 21 Kandidaten schon eine Expression in Glia und

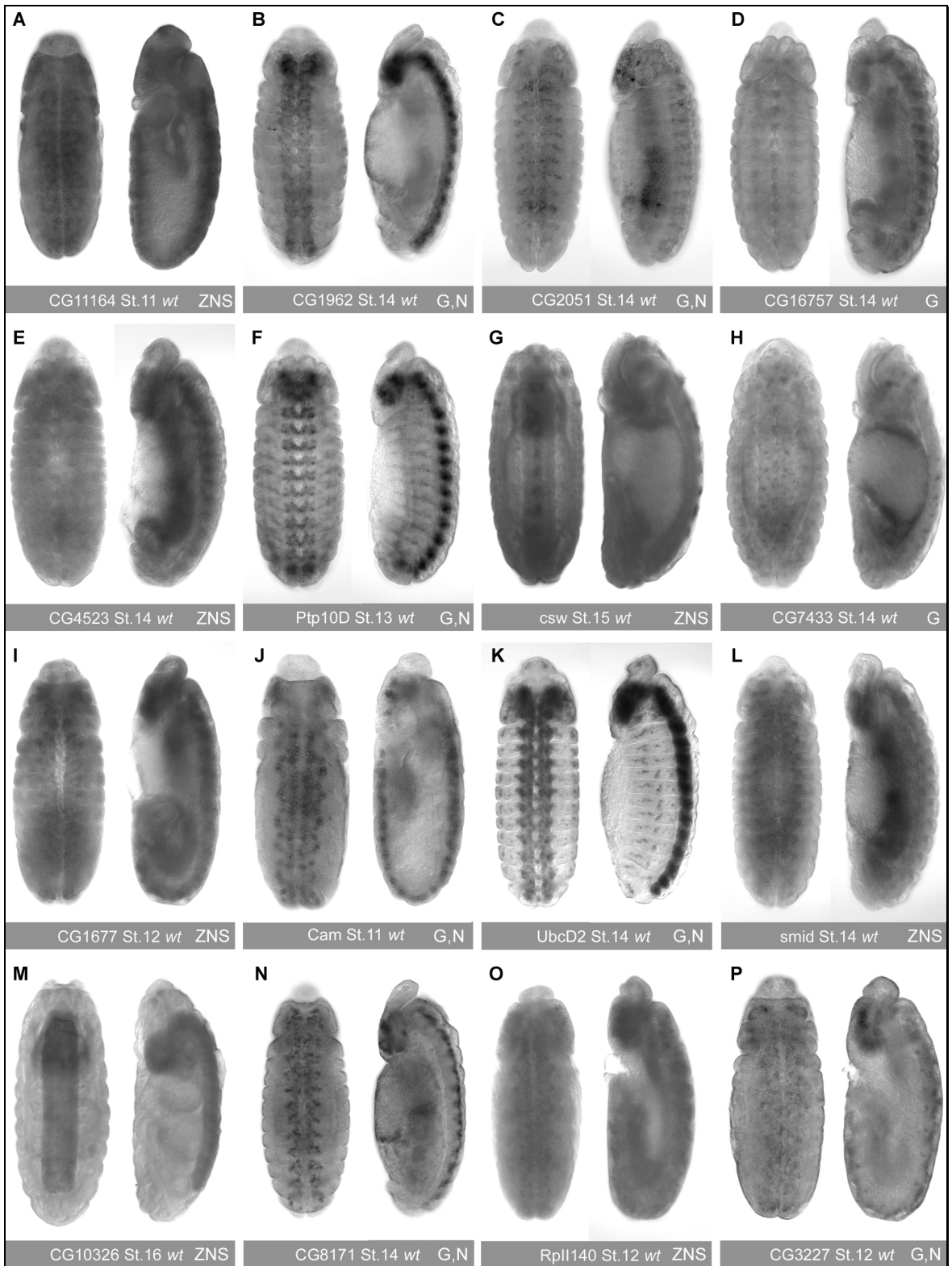
/oder Neuronen nachgewiesen worden war. Weitere 10 Gene stimmten mit den Microarray-Experimenten von Egger und Freeman überein. Mehr als die Hälfte (79 Gene) der getesteten Gene zeigten kein spezifisches Signal in der ISH. Hierbei bleibt unklar, ob das betreffende Gen zu schwach im Embryo exprimiert ist und folglich nicht nachgewiesen werden konnte, oder ob die Methode der ISH nicht funktioniert hat. Weitere 11 Gene zeigten ein spezifisches Signal in Geweben, in denen *gcm* nicht exprimiert wird und wurden somit als negatives Ergebnis vermerkt. Die Tabelle 7.2 im Anhang listet alle getesteten Gene mit ihrem Expressionsprofil und dem Ergebnis der ISH auf. Eine Übersicht aller getesteten Gene aus der GOF, die eine spezifische, positive ISH in Wildtyp-Embryonen zeigten, ist in Tabelle 3.4 zusammengefaßt. Zu den spezifischen, positiven ISH werden Färbungen im ZNS, in hämatopoetischen Zellen wie Makrophagen oder Kristall-Zellen (H) und in den Zellen der Muskel-Ansatzstellen, den sogenannten „tendon cells“ oder „Apodemen“, gezählt (T). In zahlreichen Veröffentlichungen wurde gezeigt, daß in diesen Geweben der Transkriptionsfaktor *gcm* exprimiert wird und unterschiedliche Aufgaben erfüllt. Die ZNS-positiven Gene wurden anhand ihres Expressionsmusters in 3 Gruppen unterteilt: Glia-spezifische Gene (G), in einzelnen Glia und Neuronen exprimierte Gene (G, N) und ubiquitär im ZNS exprimierte Gene (ZNS). Insgesamt wurden in der GOF 32 Gene identifiziert, die im Nervensystem exprimiert werden. Davon zeigen 12 eine Färbung des gesamten ZNS, 11 Gene sind in einzelnen Gliazellen und Neuronen exprimiert und 9 Gene konnten als spezifische, gliale Gene nachgewiesen werden. Zusätzlich konnte für ein Gen, CG1153, eine Expression in den „tendon cells“ nachgewiesen werden (T).

Die auf den nächsten Seiten folgenden Bildtafeln enthalten die positiv getesteten Kandidatengene der GOF mit Ausnahme von vier antagonistisch regulierten Genen, die in Kapitel 3.1.9 vorgestellt werden. Es wird für jedes Gen das charakteristische Expressionsmuster eines embryonalen Stadiums im Wildtyp gezeigt. Dabei wird eine Aufsicht auf das ZNS von ventral (links) und lateral (rechts) an „Whole-mount“-Präparaten gezeigt.

Gen	St. 9	St. 10	St. 11	St. 12	St. 13	St. 14	St. 15	St. 16	ISH
CG11164	+1.90	+2.17	+1.85	+2.28	+1.98	+1.81	+1.81	+1.89	ZNS,H
CG7433	+1.97	+2.14	+2.45	+2.78	+1.97	+2.00	+1.87	+2.07	G
CG1962	+3.29	+3.03	+3.02	+3.20	+2.14	+2.28	+2.28	+1.93	G, N
CG2051	+1.50	+1.52	+1.47	+1.69	+1.84	+1.50	+1.44	+1.44	G, N
CG16757	+1.73	+1.89	+2.04	+1.91	+1.77	+1.47	+1.35	+1.29	G
CG4523	+1.62	+1.82	+1.77	+1.84	+1.66	+1.48	+1.44	+1.37	ZNS
csw	+2.00	+2.18	+1.99	+1.56	+1.48	+1.44	+1.21	+1.25	ZNS
Ptp10D	+1.62	+2.04	+1.49	+1.51	+1.07	+1.21	+1.32	+1.04	G, N
CG10326	+1.59	+1.60	+1.37	+1.79	+1.47	+1.26	+1.42	+1.21	ZNS
<i>gcm</i>	+1.03	+1.60	+1.51	+2.36	+2.54	+2.57	+2.41	+2.97	
CG1677	+1.43	+1.62	+1.59	+1.80	+1.90	+1.46	+1.51	+1.56	ZNS
Cam	+1.44	+1.50	+1.82	+1.72	+1.94	+1.60	+1.62	+1.34	G, N
UbcD2	+1.37	+1.51	+1.51	+1.59	+1.94	+1.47	+1.56	+1.38	G, N
smid	+1.41	+1.56	+1.70	+1.89	+1.43	+1.46	+1.46	+1.38	ZNS
CG8171	+1.31	+1.43	+1.53	+1.79	+2.09	+1.72	+1.67	+1.89	G, N
CG6218	+1.00	+1.13	+1.43	+1.78	+1.63	+1.92	+2.23	+2.15	G
RpII140	+1.09	+1.48	+1.43	+1.58	+2.06	+1.68	+1.37	+1.53	ZNS
CG3227	+1.24	+1.09	+1.38	+1.64	+2.08	+1.41	+1.53	+1.20	G, N
glu	+1.43	+1.36	+1.34	+1.65	+1.76	+1.54	+1.44	+1.26	ZNS
Uba2	+1.15	+1.40	+1.39	+1.51	+1.89	+1.40	+1.47	+1.26	G, N
CG4584	+1.17	+1.04	+1.23	+1.38	+2.09	+1.59	+1.63	+1.88	G, N
CG15141	+1.43	+1.31	+1.29	+1.46	+1.60	+1.47	+1.64	+1.51	ZNS
Map60	+1.12	+1.08	+1.23	+1.39	+2.10	+1.35	+1.60	+1.47	ZNS
CG4266	+1.07	+1.30	+1.27	+1.36	+1.70	+1.21	+1.18	+1.26	ZNS
CG4936	+1.07	+1.08	+1.12	+1.25	+1.91	+1.10	+1.24	-1.06	G, N
CG6418	+1.08	+1.23	+1.33	+1.35	+1.60	+1.32	+1.36	+1.20	G, N
pnut	+1.26	+1.31	+1.29	+1.23	+1.78	+1.27	+1.35	+1.44	ZNS
CG1153	+1.12	-1.09	-1.07	-1.25	-1.67	-1.12	-1.42	+1.68	T
CG2893	+1.05	+1.00	-1.05	+1.00	+1.02	+1.10	+1.17	+1.65	G
CG9336	+1.00	+1.00	-1.07	-1.06	-1.07	-1.04	+1.12	+1.75	G
CG15860	+1.00	+1.00	+1.01	+1.00	+1.03	+1.17	+1.17	+1.77	G
CG6783	+1.02	+1.02	-1.23	-1.08	-1.15	-1.11	+1.09	+2.03	G
CG3168	+1.02	+1.00	-1.10	-1.03	-1.08	+1.02	+1.18	+2.07	G
CG4322	+1.04	+1.00	-1.03	+1.09	+1.10	+1.13	+1.20	+1.54	G

Tabelle 3.4 Positive Kandidaten der GOF

Die Tabelle enthält alle GOF-gefilterten Gene mit einer positiven ISH im Wildtyp. Durch M-CHiPS gefilterte Werte mit einer differentiellen Regulation größer als 1.5 sind rot unterlegt, die fehlenden Werte wurden der Gesamtliste entnommen (ohne Hintergrund). In der letzten Spalte ist das Ergebnis der ISH angegeben. Hierbei steht ZNS für eine ubiquitäre Färbung im ZNS, G, N für Färbung in einzelnen Gliazellen und Neuronen, G für eine Glia-spezifische Färbung und T für eine Färbung der „tendon cells“.



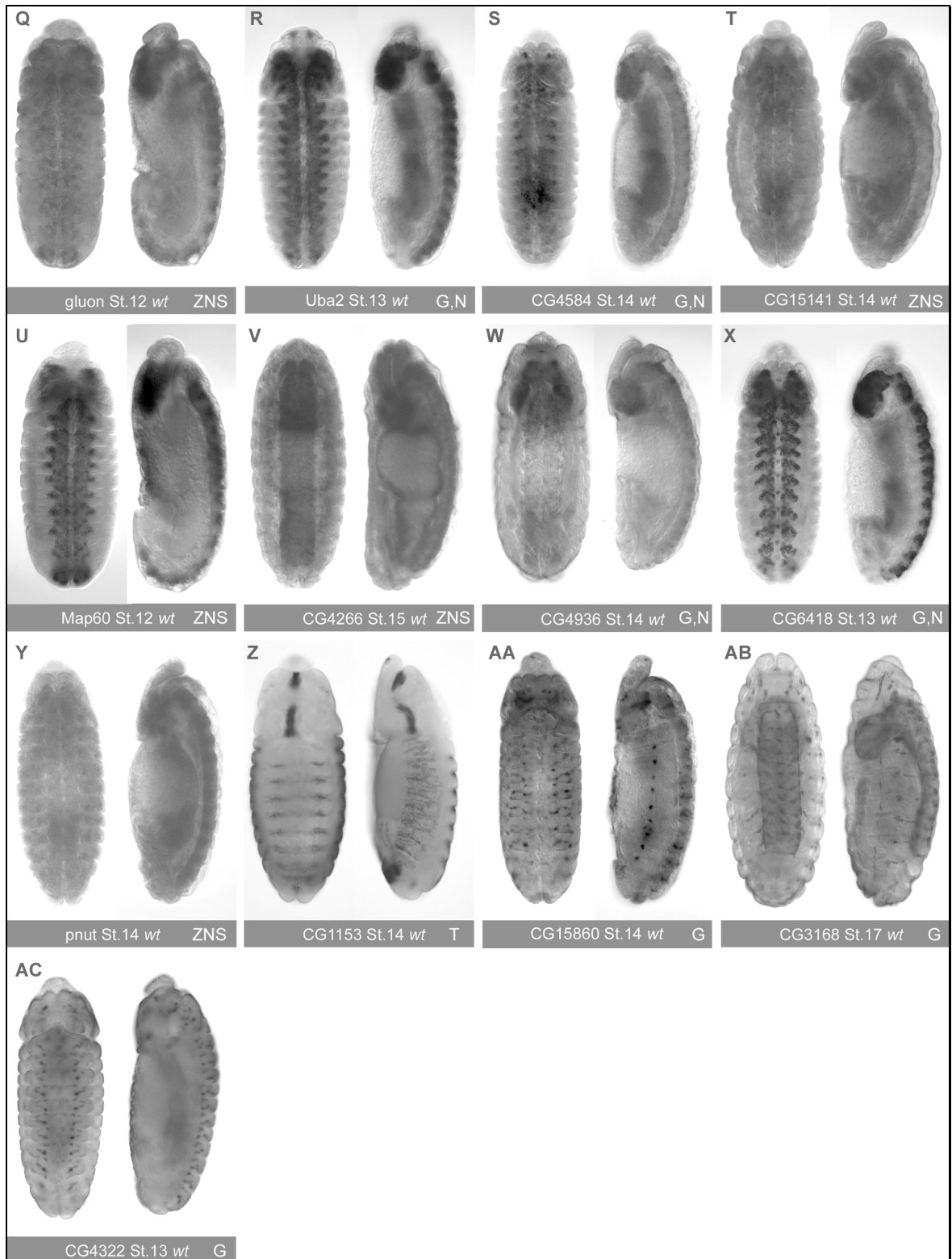


Abbildung 3.5 Expression der positiv getesteten GOF-Kandidaten

Die beiden Bildtafeln zeigen das wildtypische Expressionsmuster der positiv getesteten GOF-Kandidaten als „Whole-mount“-Präparat in einer ventralen (links) und lateralen (rechts) Aufsicht. Dargestellt ist ein charakteristisches Stadium, das Expression ubiquitär im ZNS (ZNS), in einzelnen Gliazellen und Neuronen (G, N), Glia-spezifisch (G) oder in „tendon cells“ (T) zeigt. Stadium und Kategorie der Expression (ZNS, G etc.) sind unter den Bildern angegeben. Anterior ist oben.

3.1.8. Analyse der LOF

Im Zuge der LOF-Analyse wurden 173 Gene untersucht, RNA-Sonden hergestellt und hybridisiert, um die Genexpression in wildtypischen Embryonen nachzuweisen. Eine Übersicht aller untersuchten Kandidaten der LOF findet sich im Anhang in Tabelle 7.3. Hier ergab eine Recherche in Flybase und der BDGP ISH Datenbank, daß für 33 Gene schon eine gliale Expression in der Literatur beschrieben worden war. Weiterhin waren 16 Gene von Egger *et al.*, 2002 und Freeman *et al.*, 2003 als potentielle, gliale Gene durch Microarray-Experimente entdeckt worden. Unter den schon beschriebenen Genen befindet sich auch *tramtrack (ttk)*, daß in allen lateralen Glia und Mittellinien-Glia exprimiert wird und dessen Regulation durch *gcm* bekannt ist (Badenhorst, 2001). Für 58 Gene konnte kein spezifisches Ergebnis in der ISH festgestellt werden und für 49 Gene wurde eine Expression in Geweben detektiert, in denen *gcm* nicht funktionell aktiv ist. Alle positiv getesteten Kandidatengene sind in der Tabelle 3.5 zusammengefaßt.

Insgesamt zeigten 26 Gene eine Färbung im Nervensystem. Als ubiquitär exprimiert wurden 8 Gene dokumentiert (ZNS), 7 Gene konnten in einzelnen Neuronen und Gliazellen nachgewiesen werden (G, N) und weitere 8 Gene werden ausschließlich in Gliazellen exprimiert (G). Drei weitere Kandidatengene zeigten eine Expression in zwei *gcm*-abhängigen Zelltypen: CG15015 ist sowohl in einzelnen Gliazellen, als auch in „tendon cells“ exprimiert (G, T). Zwei Gene, CG16876 und CG16971, zeigten Färbung in migrierenden Makrophagen und in Gliazellen (G, H).

Im Unterschied zur ektopischen Expression von *gcm* (GOF), konnten in der LOF vermehrt Gene identifiziert werden, die in den ebenfalls *gcm*-abhängigen, hämatopoetischen Zellen und den „tendon cells“ exprimiert werden. Insgesamt 7 Gene werden im Immunsystem von *Drosophila* exprimiert, davon 3 Gene spezifisch in den Kristall-Zellen, die in der Kopffregion entstehen und dort verbleiben (Lebestky *et al.*, 2000). Hierin enthalten ist das Gen *Black Cells (Bc)*, das allgemein als Markergen für diese Zellpopulation verwendet wird. Die Gene CG8222, *LanB1*, und *scf* werden in Makrophagen exprimiert. Die beiden letzteren sind in der Literatur in ihrer Funktion als Immunsystem-Gene beschrieben.

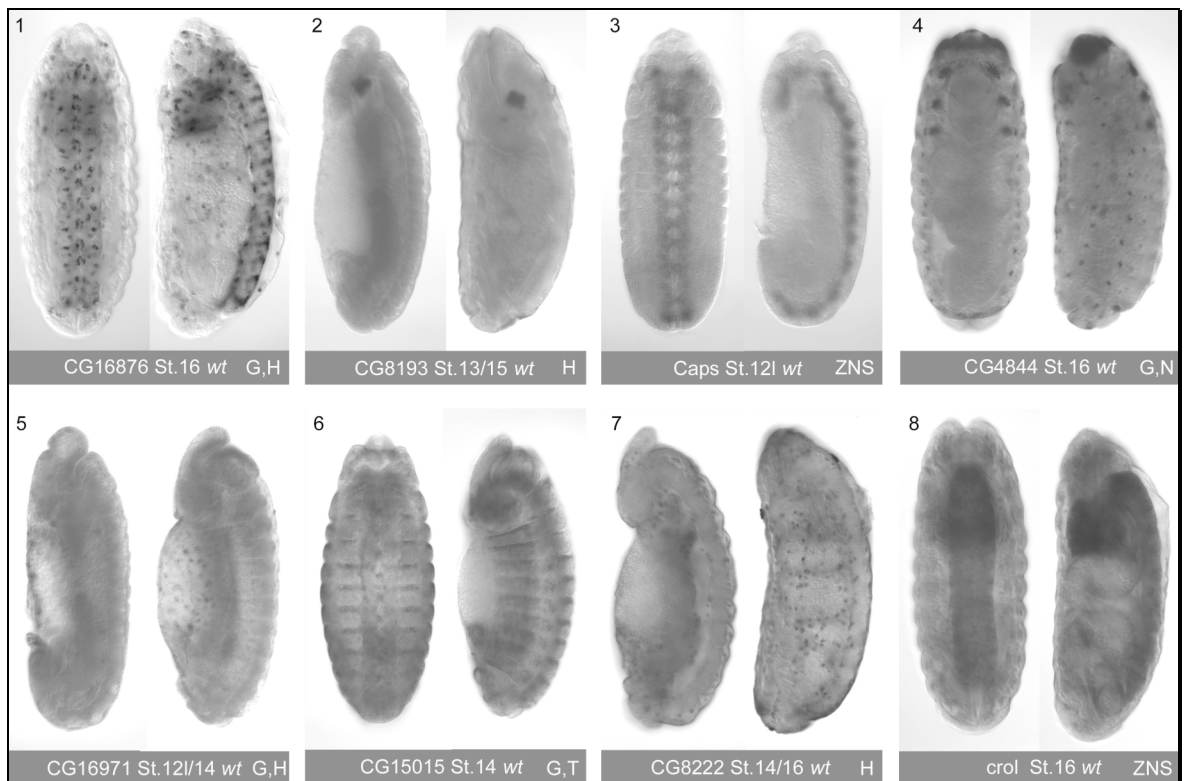
Eine spezifische Färbung der „tendon cells“ zeigte sich für sechs Gene. Da keine Doppelfärbung mit „tendon cell“ spezifischen Genen, wie *βPS-intergrin*, *stripe* und *alien* durchgeführt wurden (Soustelle *et al.*, 2004), basieren die Einschätzungen des Expressionsmusters nur auf Vergleichen mit bekannten Färbungen. Im Falle von CG10591 wurde eine Expression in den „tendon cells“ durch die BDGP-ISH Datenbank bestätigt.

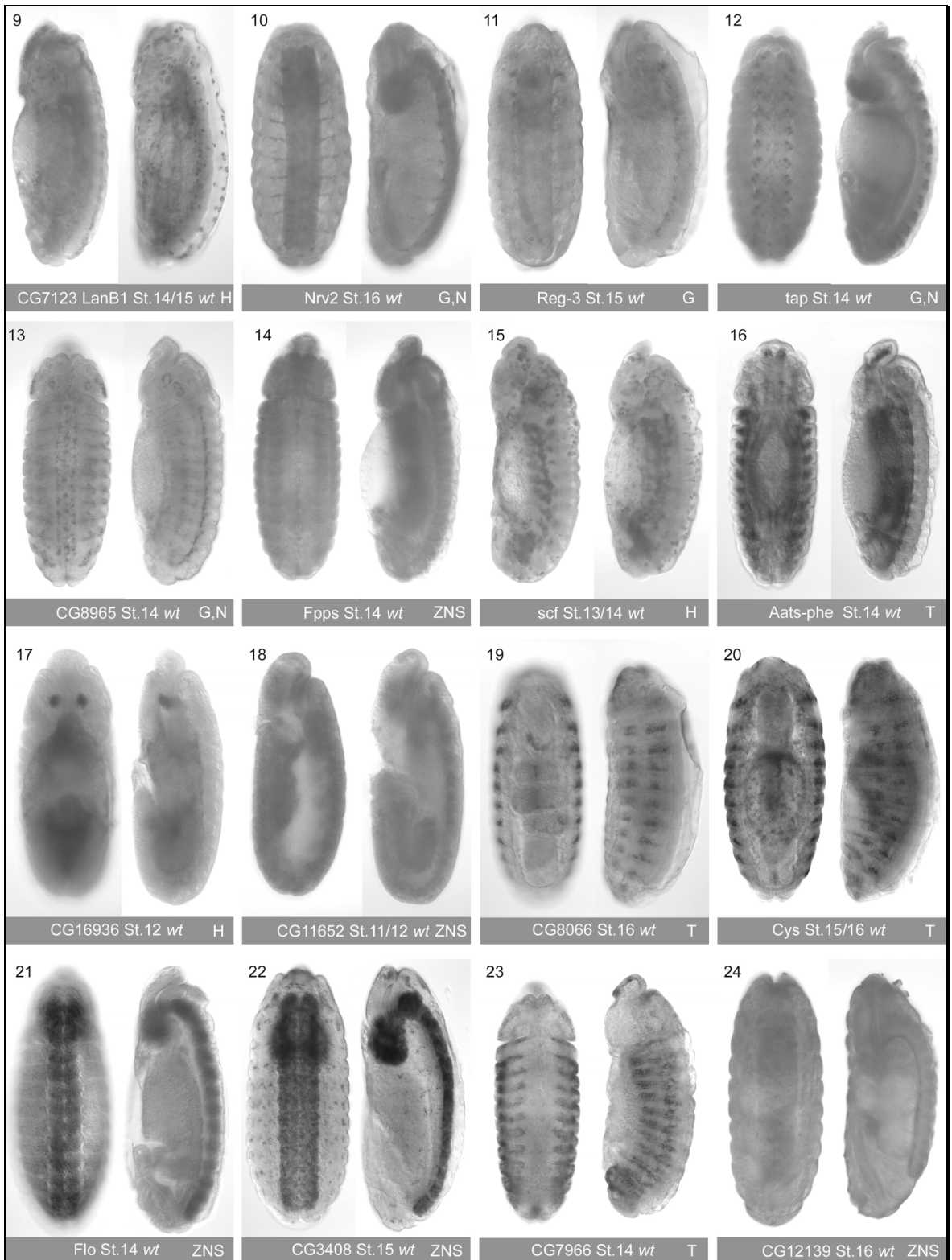
Gen	St. 9	St. 10	St. 11	St. 12	St. 13	St. 14	St. 15	St. 16	ISH
CG16876		-2.12	-2.61	-3.01	-3.34	-2.80		-2.05	G, H
CG8193		-1.97	-2.94	-1.88	-3.87	-4.20		-3.96	H
CG6218		-1.50	-1.77	-1.95	-2.41	-1.94		-1.57	G
Caps		-1.93	-2.91	-3.37	-2.71	-1.47		-1.68	ZNS
CG4844		-2.66	-3.71	-1.91	-1.51	-1.72		+1.64	G, N
LanB1		-1.54	-1.89	-1.03	-1.53	-1.18		-1.17	H
CG16971		-1.98	-2.29	-2.01	-1.46	-1.36		-1.38	G, H
CG15015		-1.64	-2.02	-1.22	-1.08	-1.03		-1.37	G, T
<i>gcm</i>		-2.04	-1.92	-1.43	-1.44	-1.45		-1.30	
CG8222		-1.50	-2.15	-1.03	-1.19	-1.14		+1.00	H
crol		-1.95	-1.69	+1.02	-1.11	-1.01		+1.37	ZNS
Nrv2		-1.90	-1.57	-1.28	-1.13	-1.04		-1.14	G, N
CG12139		-1.62	-2.24	+1.28	-1.06	+1.25		+1.47	ZNS
Reg-3		-1.80	-2.48	-1.38	-1.38	-1.18		+1.54	G
tap		-1.73	-3.22	-1.20	-1.20	-1.16		+1.11	G, N
CG8965		-1.65	-1.15	+1.20	-1.10	-1.11		-1.16	G, N
Fpps		-1.13	-2.00	-3.37	-2.53	-2.34		-1.52	ZNS
CG6783		-1.15	-2.43	-2.57	-2.71	-1.73		-1.59	G
CG11652		-1.06	-3.46	-3.47	-3.48	-3.18		-2.18	ZNS
scf		-1.79	-1.91	-1.85	-1.78	-1.56		-1.74	H
Bc		-1.01	-1.74	-1.35	-2.63	-2.95		-2.94	H
Aats-phe		-1.08	-1.89	-2.40	-2.54	-1.61		-1.17	T
CG16936		-1.18	-1.64	-1.68	-2.23	-1.43		+1.02	H
CG8066		-1.02	-1.56	-2.32	-2.98	-1.45		-1.04	T
Cys		-1.17	-1.67	-2.17	-2.28	-1.40		+1.01	T
Flo		-1.45	-2.40	-2.02	-2.18	-1.44		-1.41	ZNS
CG3408		+1.14	-1.72	-1.61	-1.60	-1.17		-1.12	ZNS
Argk		-1.13	-2.32	-1.34	-2.34	-1.38		+1.11	G, N
CG7966		-1.10	-2.13	-2.40	-1.37	-1.15		-1.18	T
ttk		-1.28	-1.75	-1.03	-1.06	+1.05		+1.18	
nerfin-1		-1.21	-1.50	-1.34	-1.16	-1.01		+1.03	G, N
CG2852		-1.32	-1.43	-1.51	-2.10	-1.62		-1.19	H
CG5080		+1.10	-1.44	-1.78	-2.85	-1.57		-1.21	G, N
Gdi		-1.17	-1.48	-1.83	-1.52	-1.34		-1.03	ZNS
CG11910		+1.00	+1.00	-1.09	-1.54	-1.72		-2.08	G
CG10591		-1.08	-1.10	+1.39	-3.52	-3.27		+1.17	T
CG9196		+1.01	-1.26	+1.40	-2.11	-1.53		-1.14	T
CG9336		+1.00	-1.06	-1.32	-2.25	-1.52		-1.40	G
CG9338		-1.05	-1.04	-1.12	-1.43	-1.58		-1.23	G
CG2893		+1.13	+1.01	-1.10	-1.41	-1.41		-1.66	G
CG18318		-1.04	+1.00	+1.11	-1.21	+1.05		-2.09	G

Tabelle 3.5 Positive Kandidaten der LOF

Die Tabelle enthält alle LOF-gefilterten Gene mit einer positiven ISH im Wildtyp. Durch M-CHiPS gefilterte Werte mit einer differentiellen Regulation kleiner als -1.5 sind blau unterlegt, die fehlenden Werte wurden der Gesamtliste entnommen (ohne Hintergrund). In der letzten Spalte ist das Ergebnis der ISH angegeben. Hierbei steht ZNS für eine ubiquitäre Färbung, G, N für Färbung in einzelnen Gliazellen und Neuronen, G für eine Glia-spezifische Färbung, T für Expression in „tendon cells“ und H für Färbung hämatopoetischer Zellen.

Die wildtypische Expression der positiven Kandidatengene der LOF ist exemplarisch für ein Entwicklungsstadium von ventral (links) und lateral (rechts) in den nachfolgenden Bildtafeln gezeigt. Der Aufbau der Tabelle entspricht der Tabelle für die GOF-Analyse. Kandidaten, die in hämatopoetischen Zellen exprimiert sind, werden in zwei lateralen Ansichten unterschiedlicher Stadien gezeigt, wie z. B. Bild 2, in dem Kristall-Zellen im Kopfbereich angefärbt sind oder Bild 7, das eine Färbung von Makrophagen darstellt.





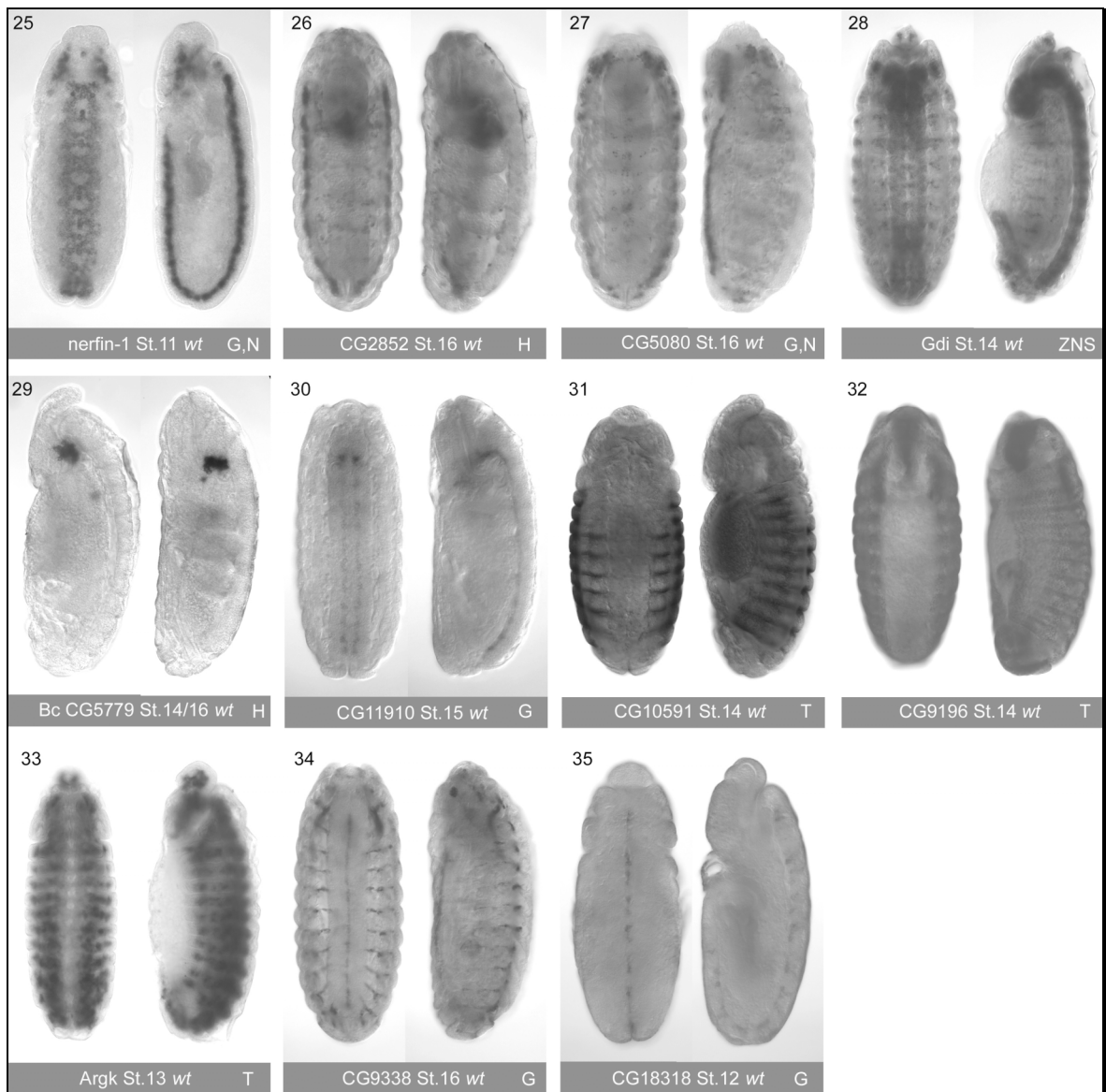


Abbildung 3.6 Expression der positiv getesteten LOF-Kandidaten

Die drei Bildtafeln zeigen das wildtypische Expressionsmuster der positiv getesteten LOF-Kandidaten als „Whole-mount“-Präparat in einer ventralen (links) und lateralen (rechts) Aufsicht bzw. zwei lateralen Ansichten. Dargestellt ist ein charakteristisches Stadium, das Expression ubiquitär im ZNS (ZNS), in einzelnen Gliazellen und Neuronen (G, N), Glia-spezifisch (G), in hämatopoetischen Zellen (H) oder in „tendon cells“ (T) zeigt. Stadium und Kategorie der Expression (ZNS, G etc.) sind unter den Bildern angegeben. Anterior ist oben.

3.1.9. Antagonistisch regulierte Gene

Neben der getrennten Betrachtung der Ergebnisse wurden auch Vergleiche zwischen den Expressionsprofilen der Kandidatengene der GOF und LOF gezogen. Dies erscheint nur logisch, würde man doch ein Glia-spezifisches, *gcm*-abhängiges Gen in der GOF hoch- bzw. in der LOF runterreguliert erwarten. Überraschenderweise konnten jedoch nur wenig antagonistisch regulierte Gene identifiziert und in der ISH verifiziert werden. Insgesamt wurden 16 Kandidatengene getestet, von denen 9 ein unspezifisches ISH-Ergebnis brachten. Es konnten 6 weitere Gene in Gliazellen detektiert werden. Das Gen CG8983 zeigte eine schwache Expression in Mittellinien-Glia. Zusätzliche Färbung in lateralen Gliazellen konnte aufgrund der anhaltenden schlechten ISH-Qualität nicht sicher festgestellt werden und so wurde auf eine weitere Analyse von CG8983 verzichtet. Ein weiteres Gen, CG9796, wird vermutlich in den Apodemen exprimiert, wurde aber ebenfalls nicht weiter verfolgt, da dieser Zelltyp außerhalb des Interessenschwerpunktes liegt. Die verbliebenen fünf Gene, CG6218, CG6783, CG2893, CG9336 und CG3847 konnten als Glia-spezifische Gene identifiziert werden. Letzteres ist bereits in der BDGP ISH Datenbank eingetragen und zeigte Expression in lateralen Gliazellen. Daher zeigt die folgende Bildtafel die wildtypische Expression der übrigen vier Glia-spezifischen Gene (Ansichten wie bereits eingeführt). Die Zahlenwerte des Expressionsprofil dieser 4 Antagonisten sind der GOF bzw. LOF-Tabelle zu entnehmen.



Abbildung 3.7 Antagonistisch-regulierte Kandidatengene

Die Bilder zeigen „Whole-mount“-Präparate von wildtypischen ISH der Gene, die ein antagonistisches Expressions-Profil besitzen. Alle zeigen ein Glia-spezifisches Expressionsmuster.

Zur Vervollständigung und Bestätigung der Microarray-Daten sind in der Tabelle 3.6 zwei Expressionsprofile von potentiellen neuronalen Kandidaten aufgeführt. Da ich mich auf die hochregulierten Gene aus der GOF bzw. auf die runterregulierten Gene in der LOF konzentrierte, wurden solche Gene, deren Expressionsprofil eine Runterregulierung in der ektopischen Situation und eine Hochregulierung in der *gcm loss-of-function* zeigt, anfangs herausgefiltert.

Gen	St. 9	St. 10	St. 11	St. 12	St. 13	St. 14	St. 15	St. 16	ISH
fne	-1.12	-1.01	-1.19	-1.39	-1.81	-1.59	-1.41	-1.37	N
fne		-1.03	-1.44	-1.08	-1.38	+1.05		+1.53	N
CG11849	-1.77	-1.65	-1.09	-1.13	-1.18	-1.16	-1.17	-1.21	N
CG11849		+3.22	+2.80	-2.55	+1.21	-1.08		-1.09	N

Tabelle 3.6 Potentiell neuronale Kandidaten

Die Tabelle enthält zwei Beispiele für Gene, die in der GOF runterreguliert und in der LOF hochreguliert waren. Die Darstellungsweise entspricht den bereits vorgestellten Listen. In der letzten Spalte ist das Ergebnis der ISH angegeben, wobei N für neuronale Färbung steht. Für jedes Gen wird zuerst das Expressionsprofil im GOF-Experiment und darunter für das LOF-Experiment dargestellt.

Die zwei antagonistisch regulierten Gene *fne* (Bild e) und CG11849 (Bild f) werden wie erwartet nur in neuronalen Zellen exprimiert, wie die „Whole-mount“-Aufnahmen in der folgenden Bildtafel zeigen. Fluoreszente Doppelfärbungen mit dem glialen Marker Repo zeigten für beide Gene keine Färbung in Gliazellen (Daten nicht gezeigt). Weiterhin ist das Gen *fne* („*found in neurons*“) in der Literatur als solches schon beschrieben worden.

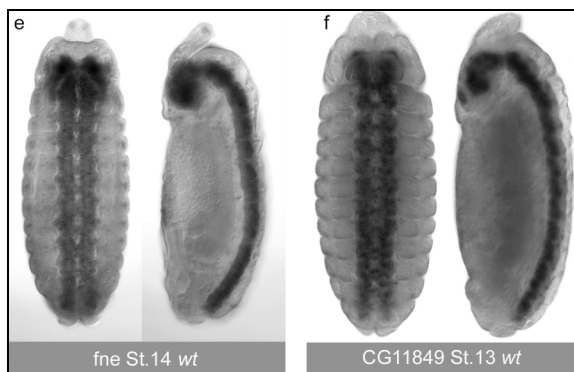


Abbildung 3.8 Expression der neuronalen Kandidaten

Die „Whole-mount“-Bilder zeigen ISH an wt Embryonen der auf dem Microarray in der GOF runter- bzw. in der LOF hochregulierten Gene *fne* und CG11849. Ansichten wie vorher beschrieben.

3.1.10. Abhängigkeit der positiven Kandidatengene von *gcm*

Potentielle Zielgene von *gcm* sollten, wie schon erwähnt, infolge einer ektopischen Expression von *gcm* stärker exprimiert werden. Entsprechend sollte die Expression dieser Gene in *gcm* Funktionsverlustmutanten fehlen. Um diese Abhängigkeit bei unseren getesteten, positiven Kandidatengenen *in vivo* zu zeigen, wurden ISH gegen die positiven Kandidaten in diesen zwei mutanten Hintergründen (*Mz1060::gcm* und *gcm⁻/gcm⁻* abgekürzt) durchgeführt. Diese Experimente wurden aufgrund der Masse in der Regel nur für Glia-spezifische und in einzelnen Glia (G) und Neuronen (G, N) exprimierte Gene aus der GOF und LOF gemacht. In der folgenden Tabelle 3.7 sind alle getesteten Gene mit der jeweiligen Angabe aus welchem Experiment sie stammen (zweite Spalte) enthalten, die

eine Veränderung der wildtypischen Expression in den mutanten Hintergründen zeigten. Hierbei ist eine beobachtete stärkere Expression des getesteten Genes in *gcm*-Überexpressionsembryonen (hier *gcm*⁺) als ++ vermerkt, eine fehlende Expression in *gcm*-Mutanten (hier *gcm*⁻) als -- und keine Veränderung gegenüber dem wildtypischen Muster als 0. Weiterhin sind Einträge aus verschiedenen Literaturquellen eingetragen.

Gen	Experiment	<i>gcm</i> ⁺	<i>gcm</i> ⁻	Literatur
CG1962	GOF	++	0	BDGP ISH Datenbank
Ptp10D	GOF	++	0	
CG7433	GOF	0	--	BDGP ISH Datenbank
Cam	GOF	++	0	
CG8171	GOF	++	0	
gluon	GOF	++	--	Egger <i>et al.</i> , 2002
pnut	GOF	++	--	
CG15860	GOF	++	--	
CG3168	GOF	++	--	BDGP ISH Datenbank
CG4322	GOF	++	--	Freeman <i>et al.</i> , 2003
CG16876	LOF	++	--	BDGP ISH Datenbank
CG4844	LOF	0	--	
CG8965	LOF	++	--	Freeman <i>et al.</i> , 2003
CG3408	LOF	0	--	BDGP ISH Datenbank
nerfin-1	LOF	0	--	BDGP ISH Datenbank
CG5080	LOF	++	--	
CG11910	LOF	0	--	BDGP ISH Datenbank
CG9338	LOF	++	--	
CG6218	GOF/LOF	++	--	Freeman <i>et al.</i> , 2003
CG6783	GOF/LOF	++	--	Freeman <i>et al.</i> , 2003
CG2893	GOF/LOF	++	--	BDGP ISH Datenbank
CG9336	GOF/LOF	++	--	

Tabelle 3.7 *In vivo* Abhängigkeit der positiven Kandidaten-Gene

Gezeigt wird die Zusammenfassung der ISH ausgewählter positiver Kandidatengene aus der GOF oder LOF bzw. beiden Experimenten (zweite Spalte) in *gcm* ektopischen (*gcm*⁺) (vierte Spalte) bzw. mutanten (*gcm*⁻) (fünfte Spalte) Embryonen. ++ verweist auf eine ektopische Expression, -- eine fehlende Expression des Gens in den mutanten Hintergründen. Weiterhin sind Literatureinträge (Lit) aus BDGP ISH Datenbank, den Veröffentlichungen von Freeman *et al.* oder Egger *et al.* angegeben.

Die Gene CG1962, *Ptp10D*, *Cam* und CG8171 aus der GOF zeigen entsprechend dem Expressionsprofil auf dem Microarray auch in *Mz1060::gcm* Embryonen eine verstärkte

Expression, während in Funktionsverlustmutanten von *gcm* keine Veränderung des wildtypischen Musters beobachtet wurde. Eine solche Übereinstimmung mit den Microarray-Daten zeigten auch die Nervensystem-spezifischen bzw. PNS-spezifischen Expressionsmuster der Gene CG4844, *nerfin-1* bzw. CG3408, die in der *gcm*-Mutante nicht mehr sichtbar waren, während in der ektopischen Situation keine Veränderung der wildtypischen Expression beobachtet wurde. Das spezifisch in longitudinalen Glia exprimierte Gen CG11910 entspricht ebenfalls *in vivo* den Microarray-Daten. Eine Bestätigung der antagonistischen Microarray-Daten konnte für alle vier Gene durch ISH *in vivo* festgestellt werden. Während die Expression der Gene CG6218 und CG6783 in der *gcm*-Mutanten vollständig verschwunden ist, verbleibt in den beiden anderen Antagonisten eine Färbung der Mittellinien-Glia, in denen CG2893 und CG9336 ebenfalls exprimiert sind. Eine massive Verstärkung der Expression im gesamten ZNS aller Antagonisten wurde in den *Mz1060::gcm* Embryonen beobachtet.

Es konnten allerdings auch Abweichungen zwischen den *in silico* und *in vivo* Daten gefunden werden. Hierzu zählen die fünf Gene *gluon*, *pnut*, CG15860, CG3168 und CG4322, die auf dem Microarray nur in der GOF differentiell reguliert erscheinen, jedoch *in vivo* ein antagonistisches Verhalten zeigen. Das in longitudinalen Glia exprimierte Gen CG7433 fehlt in *gcm⁻/gcm⁻* mutanten Embryonen, zeigte aber keine verstärkte Expression und steht somit in direktem Widerspruch zu dem Expressionsprofil des Microarrays. Ähnliche Ergebnisse wurden in der LOF-Analyse beobachtet. Entgegen den Expressionsdaten des Microarrays zeigt das Gen CG16876 in der ektopischen Mutante eine verstärkte Genexpression im ZNS. In der *gcm*-Mutante fehlt die Färbung der lateralen Gliazellen, die Expression in Makrophagen ist jedoch unverändert. Einen solchen Widerspruch zu den Microarray-Daten zeigen ebenfalls die Gene CG8965, CG5080 und CG9338. In den anschließenden Bildtafeln sind jeweils eine ventrale (links) und eine laterale Ansicht (rechts) für ein Entwicklungsstadium gezeigt. Die Bildtafeln sind nach der Analyse der GOF, LOF und Antagonisten sortiert.

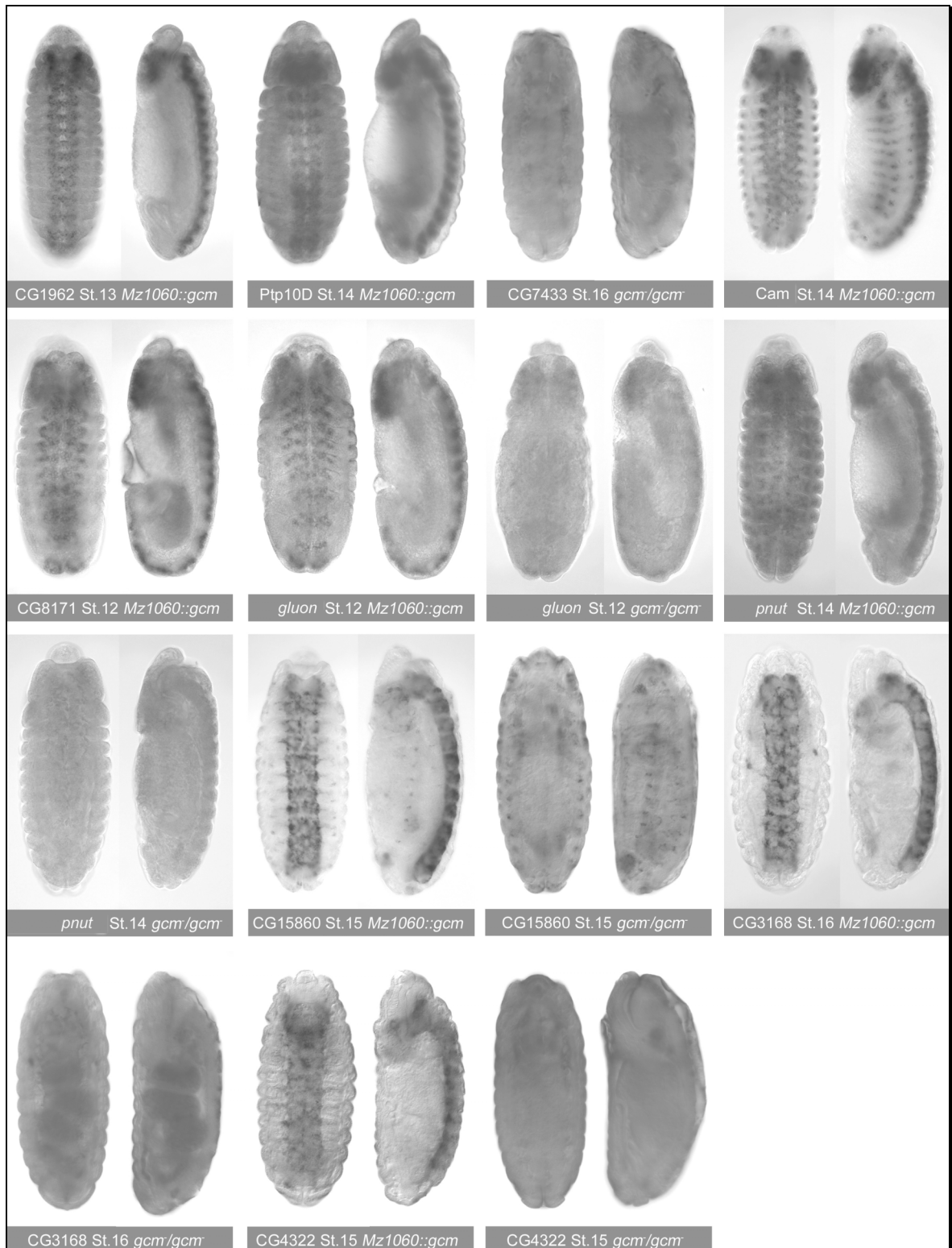


Abbildung 3.9 Expression der GOF-Kandidaten in *gcm*-mutanten Embryonen

Gezeigt werden „Whole-mount“-Präparate von ISH der GOF-Kandidaten an *gcm*-Überexpressions-embryonen (*Mz1060::gcm*) und *gcm* Funktionsverlustmutanten (*gcm⁻/gcm⁻*). Es ist ein Entwicklungsstadium in ventraler Ansicht (links) und lateraler Ansicht (rechts) dargestellt.

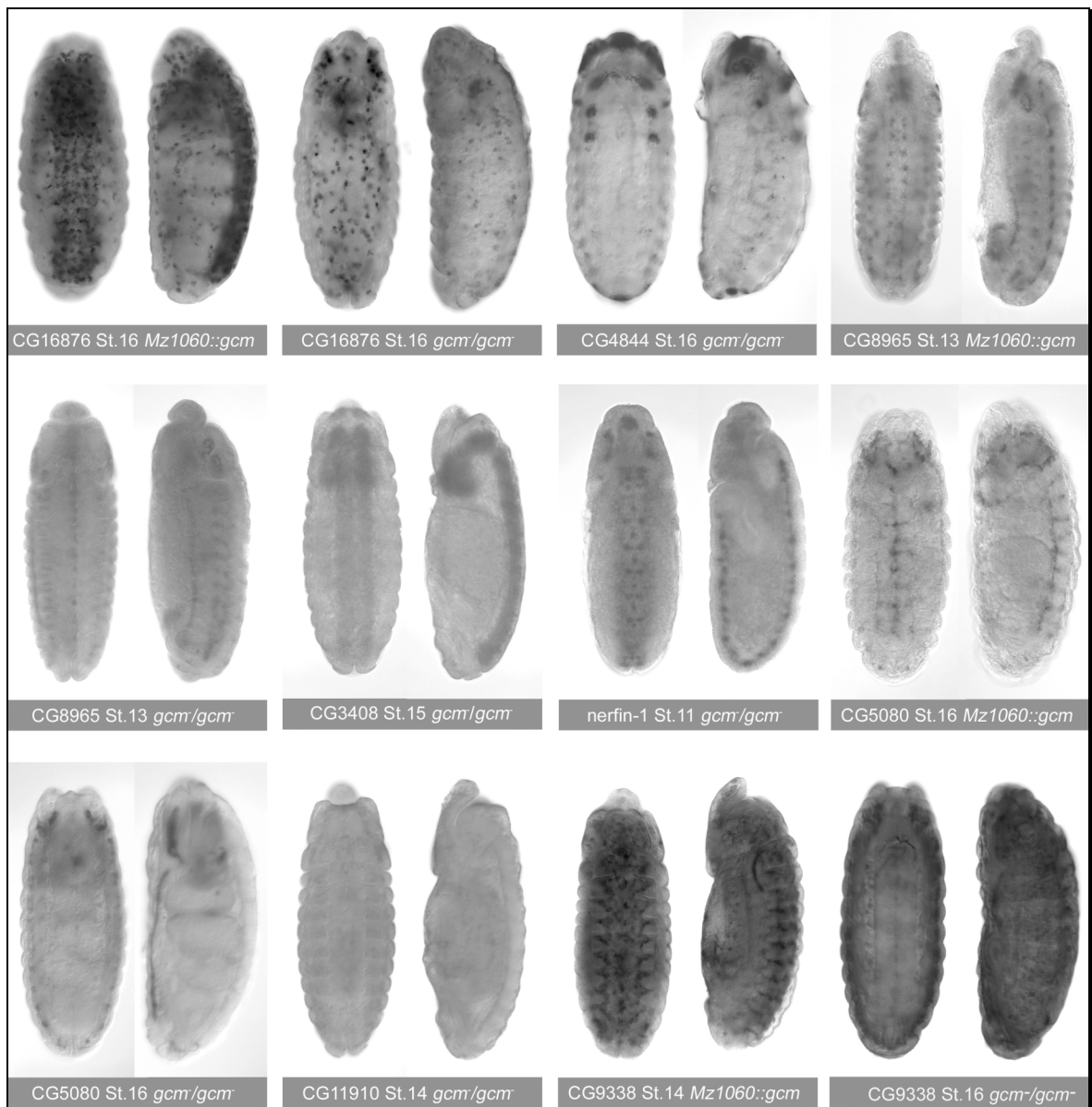


Abbildung 3.10 Expression der LOF-Kandidaten in *gcm*-mutanten Embryonen
 Abgebildet sind ISH der getesteten Kandidaten der LOF in *gcm* Überexpressions- und Funktionsverlustmutanten (*Mz1060::gcm*) (*gcm*⁻/*gcm*⁻).

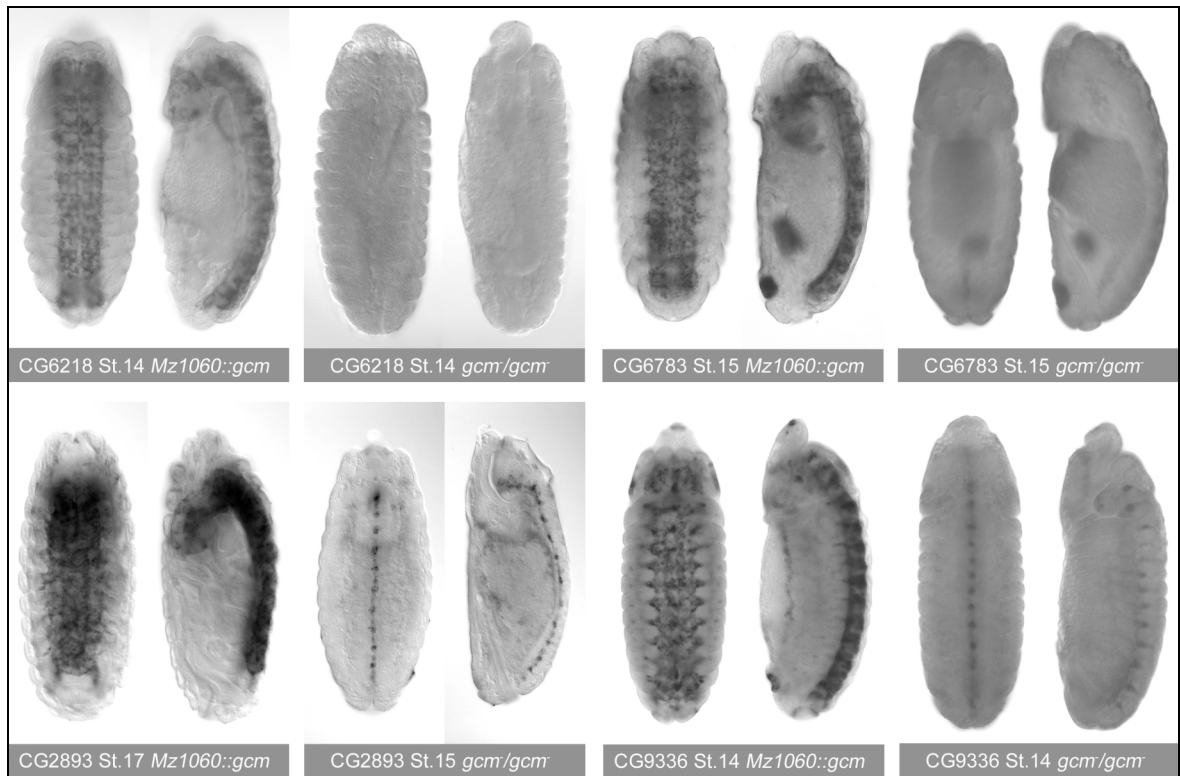


Abbildung 3.11 Antagonistisch regulierte Kandidaten in *gcm*-Mutanten

Die Bilder zeigen die ISH der antagonistisch regulierten Genen in Überexpressionsmutanten (*Mz1060::gcm*) und in *loss-of-function* Embryonen (*gcm/gcm*).

3.1.11. GO-Annotation

Die Datenbank FlyBase enthält für jedes annotierte Gen Informationen über die vermutete oder bekannte Funktion (**Gen-Ontologie**), die sogenannte GO-Annotation. Die manuell gefilterten und getesteten Gene, mit Ausnahme der Gene, die ein negatives ISH-Ergebnis zeigten, wurden nach den Angaben von FlyBase analysiert und in 11 funktionelle Gruppen eingeordnet. Das folgende Diagramm 3.12 zeigt die Verteilung innerhalb dieser Kategorien für alle potentiellen Kandidatengene. Ein Viertel aller getesteten Gene hat demnach keine bekannte Funktion. Die zweitgrößte Gruppe besteht aus Genen, die an metabolischen Prozessen beteiligt sind, darunter viele Enzyme. Mit gleichen Prozentsätzen von jeweils 10% sind die funktionellen Gruppen der Signaltransduktion, der posttranslationalen Protein-Modifikationen und am Nukleinsäure-Metabolismus beteiligte Gene vertreten. Die Gene innerhalb dieser drei Gruppen stammen zu vergleichbaren Anteilen sowohl aus der GOF als auch aus der LOF. Die Gruppe der Transkriptionsfaktoren zeigte eine differentielle Regulation in frühen Entwicklungsstadien (Stadium 9-12), während die Gruppe der Transporter und Ionen-Kanäle in späten Stadien differentiel reguliert waren. Die nicht in diesem Diagramm enthaltenen Gene, die ein negatives ISH Ergebnis zeigten, gehören hauptsächlich zur funktionellen Kategorie „Metabolismus, Enzyme“.

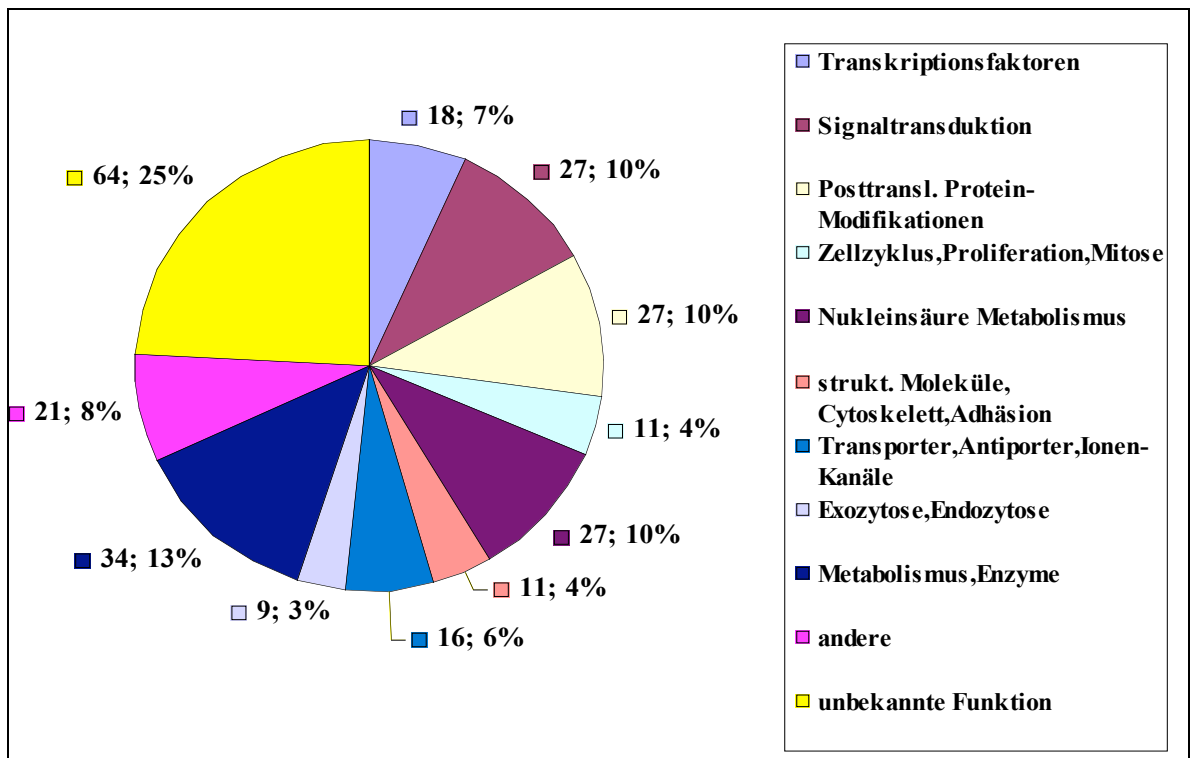


Abbildung 3.12 Funktionelle Kategorisierung

Das Diagramm zeigt die Verteilung der gefilterten potentiellen Kandidatengene entsprechend ihrer funktionellen Charakterisierung, die der FlyBase Datenbank entnommen wurde (GO-Annotation).

3.1.12. Microarray-Daten bekannter Zielgene

Das Expressionsprofil des direkten *gcm*-abhängigen Transkriptionsfaktors *repo* sollte als „Vergleichsprofil“ für Kandidatengene dienen, insbesondere für die LOF-Analyse. Überraschenderweise war *repo* jedoch nicht unter den gefilterten Kandidatengenen zu finden, da es zu keinem Zeitpunkt weder in der GOF noch in der LOF differentiell reguliert war. Auffällig war hierbei, daß *repo* in der LOF von Stadium 10 an in beiden miteinander verglichenen Ansätzen (*wt* gegen *gcm*-Funktionsverlustmutante) gleich stark exprimiert war. In der GOF konnte *repo* schon vor der *gcm*-Expression in Stadium 9 auf dem Microarray klar detektiert werden. Sowohl die Microarray-Daten der GOF wie auch der LOF widersprechen den Antikörperfärbungen, die vor den RNA-Präparationen durchgeführt wurden. Von jeder unabhängigen Kreuzung der ektopischen Expression (*Mz1060::gcm*), wie auch den sortierten homozygot mutanten Embryonen (*gcm⁻/gcm⁻*) wurden Embryonen entnommen, fixiert und gegen den glialen Marker Repo gefärbt. In allen Fällen konnte die verstärkte bzw. fehlende Expression von Repo nachgewiesen werden. Eine Sequenzierung des auf dem Microarray verwendeten PCR-Produktes bestätigte jedoch, daß es sich wie gewünscht um das Exon 1 von *repo* handelt. Weiterhin wurden Northern Blots mit wildtypischer und *Mz1060::gcm* Total-RNA verschiedener

Entwicklungsstadien mit einer *repo*-antisense Sonde hybridisiert. Die aufgrund der ektopischen Expression von *gcm* verstärkte *repo* mRNA Expression war deutlich sichtbar (Daten nicht gezeigt). Diese Ergebnisse lassen auf unspezifische Kreuzreaktionen einer anderen cDNA mit dem PCR-Produkt von *repo* schließen.

Auch im Falle der beiden anderen bekannten Zielgene *pnt* und *ttk* konnte fast keine differentielle Regulation in keinem der beiden Versuchsansätze gefunden werden. Lediglich *ttk* war in der LOF in Stadium 11 leicht runterreguliert. Auch hier bestätigte eine Sequenzierung beider PCR-Produkte, daß es sich um das Exon 5 für *pnt* bzw. Exon 7 für *ttk* handelt. Es gibt jedoch für beide Gene zwei Splicevarianten, die auch in Neuronen exprimiert werden. Die auf dem Microarray aufgetragenen Exons kommen in beiden Varianten vor. Daher könnte die Glia-spezifische Expression von *pnt* und *ttk* durch die Expression außerhalb von Gliazellen überlagert werden, so daß keine differentielle Regulation gemessen werden konnte. Die Sequenzierungen von *repo*, *pnt* und *ttk* sind im Anhang gezeigt.

3.1.13. Zusammenfassung des Microarray-Screens

Insgesamt konnten durch verschiedene Filterkriterien aus ca. 2900 differentiell regulierten Genen 400 potentielle Kandidatengene ausgewählt werden, von denen mehr als 300 durch ISH *in vivo* getestet wurden. In der folgenden Tabelle 3.8 ist eine Statistik aller untersuchten Gene gezeigt.

Insgesamt wurden in der GOF und in der LOF vergleichbar viele spezifisch positive Kandidatengene identifiziert (jeweils 20%). In der GOF zeigen 75% dieser Gene eine Expression in Neuronen und Gliazellen bzw. ubiquitär im ZNS. Dies unterscheidet sich deutlich von der LOF-Analyse in der nur ca. 40% der spezifisch positiven ISH zu diesen Kategorien gehören. Weiterhin ist auffällig, daß in der GOF deutlich weniger spezifisch negative ISH festgestellt wurden als in der LOF. Fast alle positiven Kandidatengene, die eine Expression in hämatopoetischen Zellen oder den „tendon cells“ zeigen, stammen aus der LOF-Analyse. Bei den wenigen antagonistisch regulierten Genen konnten 5 Glia-spezifische Gene identifiziert werden, die Expression in mehreren glialen Subtypen zeigen. Das temporale Microarray-Expressionsprofil stimmte für viele Gene der GOF wie auch der LOF mit den Entwicklungsstadien der ISH überein, jedoch konnten auch einige Unstimmigkeiten beobachtet werden.

	GOF	LOF	Antagonisten	Gesamt	Prozent
untersuchte Gene total	140	173	16	329	100%
unspezifische ISH	79	58	9	146	44,4%
spez. negative ISH	11	49	0	60	18,2%
spez. positive ISH	29	35	6	70	21,3%
Glia-spezifische ISH (G)	5	4	5	14	4,3%
Gliale/neuronale ISH (G,N)	11	7	0	18	5,5%
ZNS ubiquitäre ISH (ZNS)	11	8	0	19	5,8%
hämatopoetische ISH (H)	0	7	0	7	2,1%
tendon cell ISH (T)	1	6	1	8	2,4%
hämatopoetische/gliale ISH (G,H)	1	2	0	3	0,9%
tendon cell/gliale ISH (G,T)	0	1	0	1	0,3%
Literatur (*B,*F,*E)	27	36	1	74	22,5%

Tabelle 3.8 Zusammenfassende Statistik

Die Tabelle zeigt die statistische Verteilung der wildtypischen ISH aller untersuchten Kandidatengene in Zahlen und Prozenten. Zu den Literatureinträge (Lit) werden Einträge aus der BDGP ISH Datenbank (*B), den Veröffentlichungen von Freeman *et al.* (*F) oder Egger *et al.* (*E) gezählt.

Die angegebenen Prozentsätze zeigen deutlich, daß die Wahl und variable Benutzung der unterschiedlichen Filterkriterien eine Anreicherung von *gcm*-abhängigen Zielgenen innerhalb der Genlisten zur Folge hatte. Zusammen mit den in der Literatur bereits beschriebenen Genen konnten insgesamt ein Drittel der potentiellen Kandidatengene als spezifisch positive Zielgene bestätigt werden. Verglichen mit den Microarray-Daten von Freeman *et al.*, die nur ca. 12% ihrer getesteten Kandidaten als gliale Gene bestätigen konnten, ist dies ein hoher Prozentsatz.

3.2. Analyse von Kandidatengen

In diesem zweiten Ergebnisteil werden 12 positiv getestete Kandidatengene detailliert vorgestellt, die zu gleichen Teilen aus der GOF, aus der LOF bzw. aus beiden Ansätzen stammen. Alle Gene zeigten in der wildtypischen ISH eine vorwiegend Glia-spezifische Expression oder waren zusätzlich in Makrophagen exprimiert. Während die meisten der ausgesuchten Kandidatengene in vielen Subtypen von Gliazellen exprimiert werden, stellt das Expressionsmuster mancher Kandidaten eine spezifische Färbung in nur einer oder zwei glialen Subtypen dar. Eine zelluläre Charakterisierung des wildtypischen Expressionsmusters erfolgte mit Hilfe von ISH kombiniert mit Repo-Antikörperfärbungen an Fäulepräparationen verschiedener Entwicklungsstadien.

Weiterhin wurde die Abhängigkeit der Kandidatengene, neben der bereits gezeigten Regulation durch *gcm*, auch für die bekannten *gcm*-Zielgenen *repo*, *pnt* und *ttk* getestet. Dafür wurden ISH in den entsprechenden mutanten Hintergründen durchgeführt. Da bereits bekannt ist, daß diese Transkriptionsfaktoren miteinander kooperieren, um weitere gliale Gene, wie z. B. *loco* anzuschalten (Yuasa *et al.*, 2003), wurden *repo/pnt* und *repo/ttk* Doppelmutanten und die *repo/pnt/ttk* Dreifach-Mutante hergestellt. Auch hier wurden ISH in den jeweiligen mutanten Hintergründen durchgeführt, um Veränderungen des wildtypischen Expressionsmusters festzustellen.

Die Anwesenheit von *gcm*-Bindestellen (GBS) in der 5'-Region der Kandidatengene könnte ein weiterer Hinweis auf eine direkte Regulation durch *gcm* darstellen. Hierzu wurden die betreffenden Genregionen jedes Kandidatengens mit dem Programm "GenePalette" durchsucht (Rebeiz und Posakony, 2004). Als Konsensus-Sequenz wurde das Oktamer (A/G)CCCGCAT verwendet (Akiyama *et al.*, 1996; Ragone *et al.*, 2003; Schreiber *et al.*, 1997).

3.2.1. Zelluläre Charakterisierung

Ein erster Schritt zur Analyse der identifizierten Kandidatengene stellt eine zelluläre Bestimmung des wildtypischen Expressionsmusters dar. Dies erfolgte durch ISH (blaue AP-Färbung) kombiniert mit Repo Antikörperfärbungen (braune DAB-Färbung) an Filetpräparationen. Neben dem Verlauf des Expressionsmusters wurde das Expressionsmuster hauptsächlich an späten Entwicklungsstadien bestimmt. In diesen Stadien besitzen die Gliazellen eine charakteristische Position und Morphologie, durch die sie identifiziert werden können. Trotz der Beschreibungen des glialen Musters durch Halter *et al.* (1995) und Ito *et al.* (1995) ist in einzelnen Fällen eine genaue Zuordnung der Gliazellen nicht immer möglich gewesen. Zum besseren Verständnis des nächsten Abschnittes wird kurz das gliale Muster eines wildtypischen Hemineuromers von *Drosophila* in Stadium 16 wiederholt.

Insgesamt unterscheidet man im ZNS 25 Repo-positive Gliazellen pro Hemisegment, die aus den bereits vorgestellten 3 Hauptkategorien der „Surface-“, „Cortex-“ und „Neuropile-associated glia“ stammen. Zur ersten Hauptgruppe gehören jeweils eine ventrale und dorsale „channel-glia“ und insgesamt 6-7 subperineurial Glia, von denen 4 Zellen dorsal und 3 Zellen ventral liegen. Zu den dorsalen SPG gehören die A-SPG und die B-SPG, die in den abdominalen Segmenten in einer medialen Position liegen und beide aus dem NB1-1a stammen. Im Thorax hingegen wird nur noch die A-SPG gebildet, die aus dem NB2-2t stammt. Weiterhin läßt sich die L-SPG aufgrund ihrer lateralen Position und länglichen Morphologie sehr gut erkennen. Die vierte SPG ist die dorsale SPG (D-SPG), die medial im ZNS liegt. Diese genannten SPGs liegen alle dorsal im ZNS (auf Höhe und unterhalb der longitudinalen Glia). Zu den ventralen SPGs gehört die lateral liegenden VL-SPG und eine mehr medial liegende Zelle, die keine spezifische Bezeichnung besitzt. Da die dritte, trapezförmige SPG am auslaufenden Nerv zu finden ist, könnte es sich bei dieser Zelle auch um eine NRG handeln. Zu den Kortex-assoziierten Gliazellen gehört die Gruppe der „cell body glia“, die aus 3-4 Zellen besteht. Hier sind vor allem die MM-CBG und die M-CBG, die beide aus dem NB6-4 stammen, leicht aufgrund ihrer Position, Morphologie und des bereits beschriebenen Tagma-Unterschiedes zu identifizieren. Die letzte Hauptgruppe der Neuropil assoziierten Gliazellen setzt sich aus den beiden Untergruppen der longitudinalen Glia und den „nerve root glia“ zusammen. Alle 9 Zellen der ersten Untergruppe stammen aus einem neuralen Vorläufer, dem longitudinalen Glioblasten (LGB). Sie nehmen eine perlschnurartige Lage auf den longitudinal verlaufenden, axonalen Trakten ein, wobei eine Zelle oft leicht ventral außerhalb des Verbandes liegt.

Zur zweiten Untergruppe gehören nur 2-3 Zellen. Gerade die Gruppe der NRG ist nicht immer eindeutig von den SPG im Präparat abzugrenzen. Zusätzlich gibt es 2 „exit glia“ und 12 periphere Gliazellen, von denen 10 aus dem ZNS in die Peripherie wandern und zwei Zellen aus der Peripherie auf das ZNS zuwandern. Diese Zellen konnten in der folgenden Darstellung 3.13 nur angedeutet werden. Ein genaues Schema hierzu ist in Kapitel 3.2.4 gezeigt und am Beispiel von CG9336 erläutert.

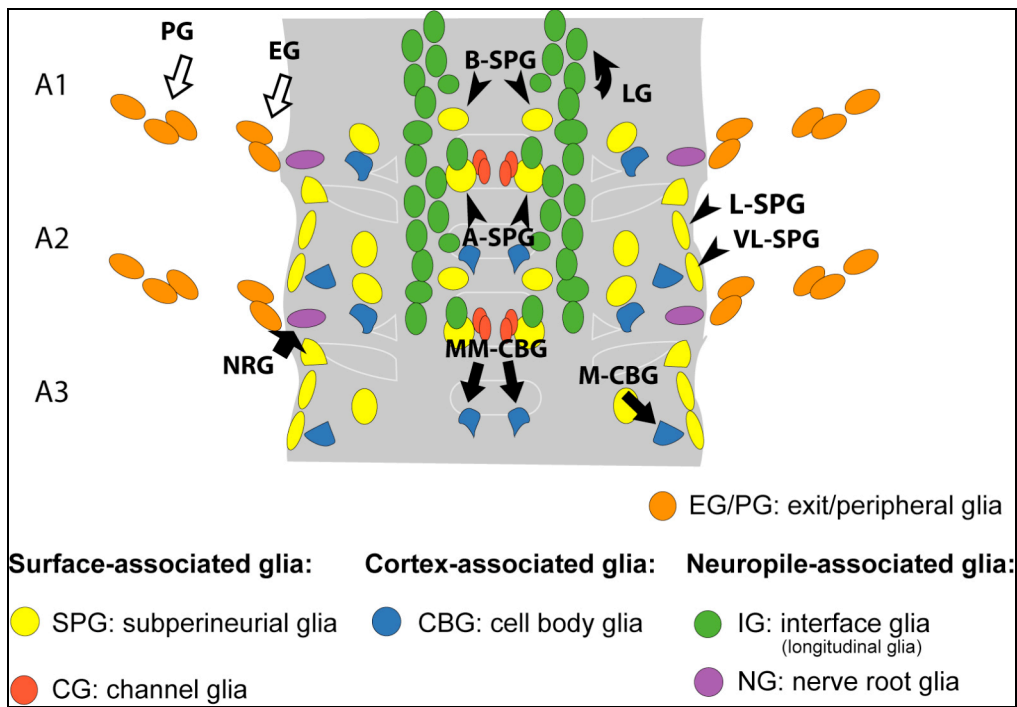


Abbildung 3.13 Wildtypisches Glia-Schema

Dargestellt sind alle Subtypen der lateralen Glia und ihre jeweilige Position im ZNS von *Drosophila*. Dieses Schema wurde anhand von Repo-Antikörperfärbungen eines wildtypischen Embryos Stadium 16 erstellt. Der Farbcode zeigt die Kategorie des Subtyps an und ist in der Legende zugeordnet. Die Form der Pfeile ist spezifisch für einen Subtyp und gilt auch für alle folgenden Abbildungen und Schemata.

3.2.2. Charakterisierung der GOF-Kandidaten

Alle dargestellten Expressionsprofile basieren auf den M-CHiPS gefilterten Listen, die einen Verhältnisfilter von +/- 1.5facher Regulation und einen MinMax-Filter von 0.0 aufweisen. Um den vollständigen Verlauf der Expression darzustellen, wurden fehlende Werte aus der Gesamtliste entnommen.

Aufgrund der Expressionsprofile (Abb. 3.15) können die vier ausgewählten Kandidaten der GOF hauptsächlich zu den spät regulierten Genen gezählt werden. Erst in Stadium 16 konnte eine differentielle Regulation beobachtet werden. Eine Ausnahme bildet CG7433, das seine maximale differentielle Regulation zu einem frühen Zeitpunkt (Stadium 12) hat, jedoch starke Diskrepanzen zu der beobachteten Situation *in vivo* aufweist. Auch im Expressionmuster unterscheidet es sich von den anderen Kandidaten. Während CG4322,

CG15860 und CG3168 in drei oder vier Subtypen exprimiert werden, wird CG7433 lediglich in zwei Subtypen exprimiert.

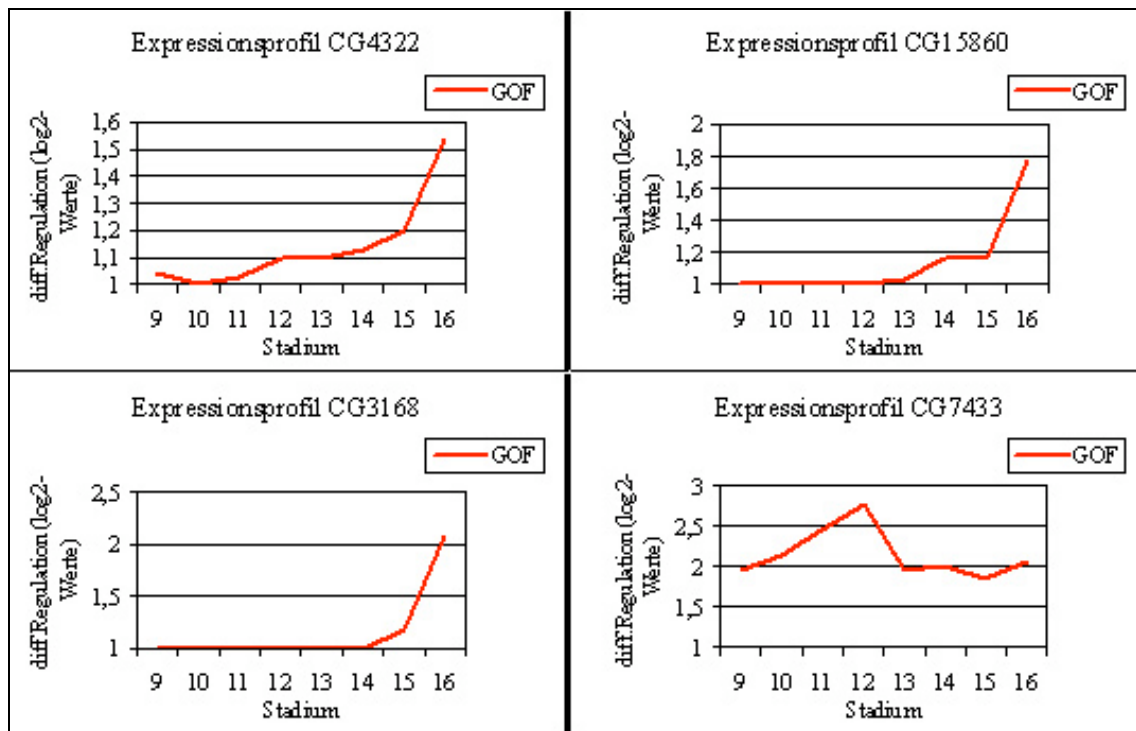


Abbildung 3.14 Expressionsprofile der GOF-Kandidaten

Mit Hilfe der M-CHiPS-gel filterten Listen bzw. der Gesamtliste wurde ein Verlaufsprofil der differentiellen Regulation für die vier GOF-Kandidaten erstellt.

- **CG4322 (EG:22E5.11)**

Nachdem mehrere ISH ein positives Ergebnis für Kandidatengene zeigten, die lediglich im letzten experimentellen Entwicklungsstadium differentiell reguliert waren, wurden die Genlisten nochmals unter diesem Aspekt gefiltert. Dadurch wurde auch dieses nur schwach differentiell regulierte Gen CG4322 *in vivo* getestet und zeigte eine Glia-spezifische Färbung hauptsächlich in den „Surface-associated“ Glia (Abb.3.17). Entgegen dem späten Microarray-Profil konnte CG4322 schon zu Beginn der glialen Entwicklung in Stadium 11 im Gehirn bzw. früh 12 im ZNS detektiert werden. Alle Repo-positiven Zellen im Gehirn waren auch CG4322-positiv und konnten so als Gliazellen identifiziert werden (Abb.3.17, Bild A). Im ZNS konnte schwach eine erste Doppelfärbung in den ersten SPG detektiert werden (Daten nicht gezeigt). In Stadium spät 15 (I15) wird CG4322 in allen dorsalen und ventralen SPG exprimiert, wobei die Expression in der A-SPG nur sehr schwach war. Zusätzlich ist es in den dorsalen und ventralen „channel glia“ exprimiert. Außerdem konnte es in vielen, jedoch nicht allen EG/ PG und einer dorsalen NRG detektiert werden (Abb.3.17, Bilder B-E). Lediglich die LG und die Gruppe der CBG zeigten keine Doppelfärbung. Die schematische Abbildung 3.17 faßt das wildtypische Expressionmuster von CG4322 nochmals zusammen. Dies deckt sich mit den Beobachtungen von Schwabe

et al. (2005), die im Laufe dieser Arbeit eine funktionelle Analyse dieses Gens unter dem Namen „*moody*“ veröffentlichten. Demnach spielt *moody* zusammen mit dem bereits bekannten glialen Gen *loco* eine wichtige Rolle in der Entwicklung der Bluthirnschranke, die in *Drosophila* von SPG gebildet wird. Funktionell ist es als G-Protein gekoppelter Rezeptor eingeordnet, der am Prozeß der Signaltransduktion beteiligt ist.

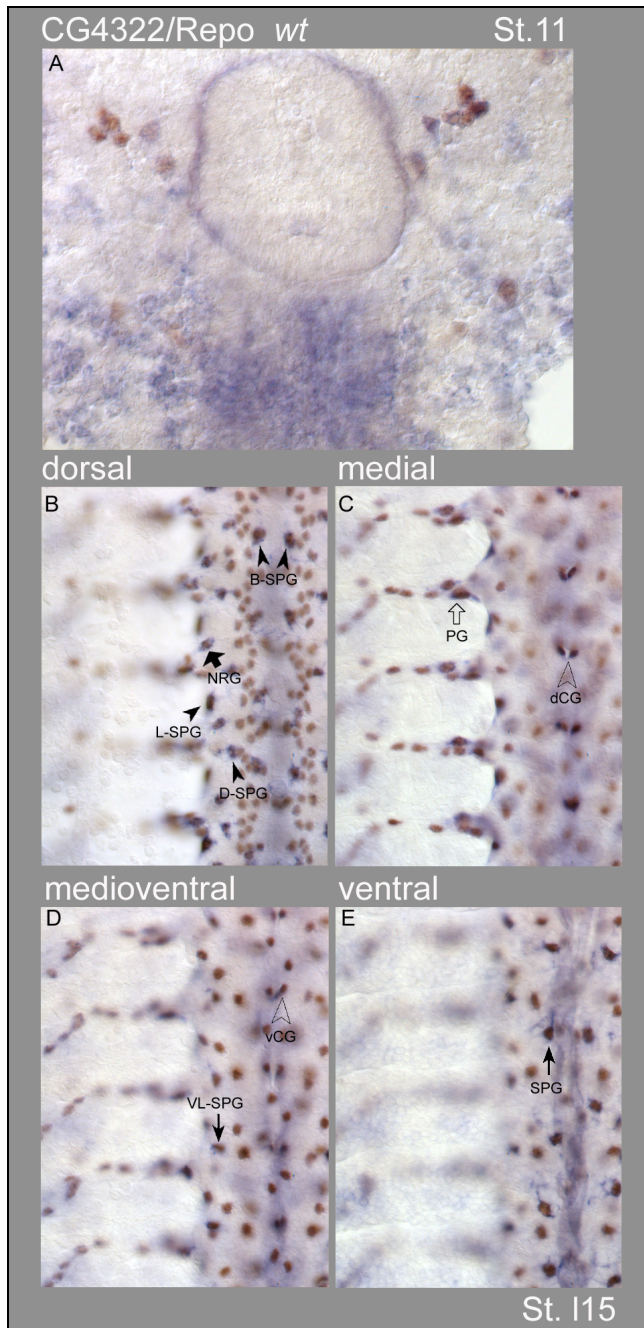


Abbildung 3.15 Expression von CG4322

Die cytoplasmatische AP-Färbung der ISH von CG4322 wurde mit einer nukleären DAB-Antikörperfärbung gegen Repo kombiniert. Bild A zeigt einen Ausschnitt aus dem embryonalen Gehirn in Stadium 11. Alle Repo-positiven Zellen exprimieren auch CG4322. Die Bilder B-E zeigen einzelne Ebenen eines Filepräparates in Stadium spät 15 von dorsal nach ventral. Doppelfärbungen sind in allen SPG und CG zu sehen, ebenso wie viele PG und einer NRG. Anterior ist oben. Diese und alle weiteren Färbungen im Abschnitt 3.2.2 erfolgten an *Oregon R wt*-Embryonen verschiedener Entwicklungsstadien.

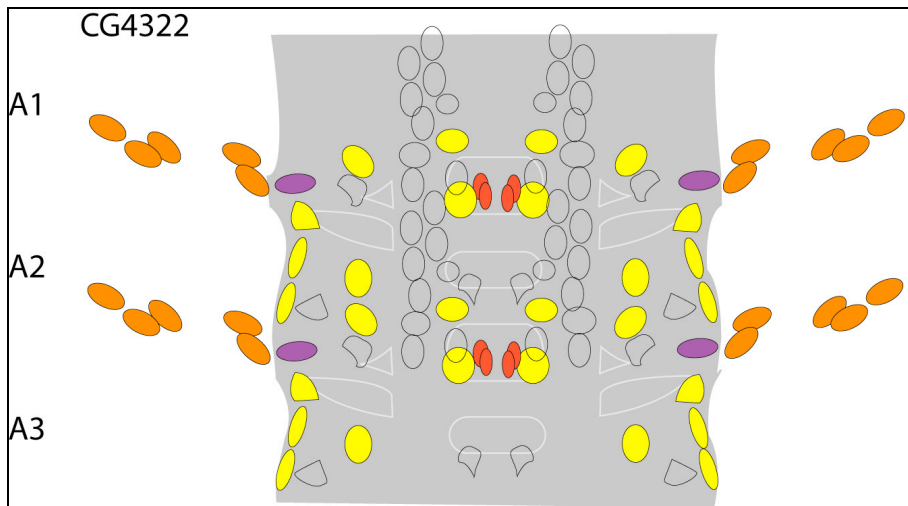


Abbildung 3.16 Glia-Schema CG4322

Schematisch dargestellt ist die Expression von CG4322 im Wildtyp entsprechend dem bereits vorgestellten *w^t*-Schema. CG4322 wird in allen „Surface-associated“ Glia und einer NRG exprimiert. Weiterhin konnte es in vielen und PG detektiert werden.

- **CG15860**

Auch das Gen CG15860 wurde schon vor einigen Jahren analysiert, wobei jedoch der Schwerpunkt auf der neuronalen Expression lag. Es wurde eine Funktion in der Signaltransduktion von mechanischen Reizen, wie Kälte und Schmerz nachgewiesen und daher „*painless*“ benannt (Tracey *et al.*, 2003). Es gehört zur Gruppe der so genannten TRP-Ionenkanäle (transient receptor potential). Auch hier decken sich die Beschreibungen in der Veröffentlichung mit den Beobachtungen in der ISH. Das Transkript von CG15860 wird zuerst im Stadium 13 in wenigen Zellen im ZNS und der Peripherie detektiert. Im ZNS zeigte die Doppelfärbung mit Repo, daß es sich hierbei um die dorsale und die laterale SPG handelt, sowie die ventral gelegene LV-SPG und eine weitere SPG (Abb.3.17, Bilder A-C). Dorsal waren 2-3 weitere Zellen im Exitbereich doppelt gefärbt, wovon nur eine NRG sicher benannt werden konnte. In manchen Präparaten war eine schwache Färbung in den vCG und den B-SPG zu erkennen, wobei dies auch unspezifische Hintergrundfärbung sein könnte. Die Zellen in der Peripherie (nicht gezeigt) waren Repo-negativ und waren von Tracey *et al.* als sensorische Vorläuferzellen von multidendritischen Neuronen identifiziert worden. Zusätzlich wird eine Expression von CG15860 in sensorischen Neuronen des „antennal maxillary complex“ und Neuronen des Chordotonal-Organ genannt. Außerhalb des ZNS konnte zusätzlich Färbung im Filzkörper und im „dorsal vessel“, dem Insekten Herz-Äquivalent, festgestellt werden. Das temporale Expressionsprofil des Microarray zeigt erste, schwache Regulation in Stadium 13 und stimmt somit mit den *in vivo* Daten überein.

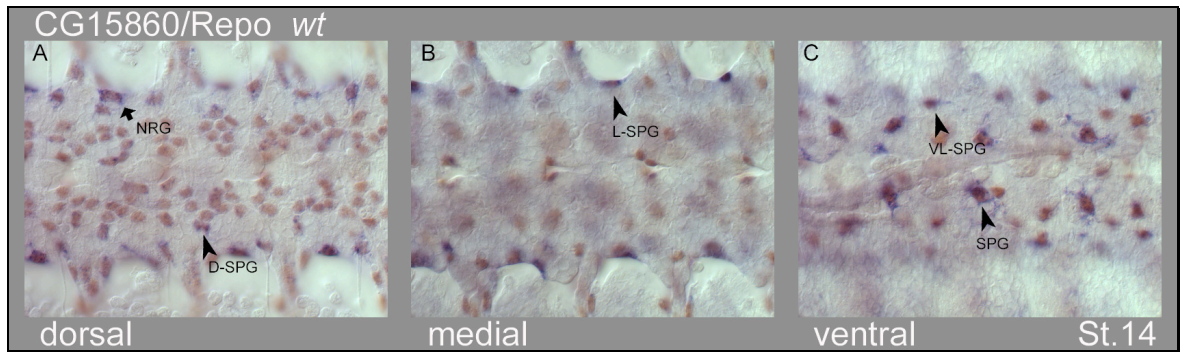


Abbildung 3.17 Expression von CG15860

Die Bilder zeigen eine Doppelfärbung von CG15860 (ISH) und dem glialen Marker Repo (Antikörper). Dorsal konnte eine Doppelfärbung für die D-SPG, die am auslaufenden Nerv liegende NRG und weitere Zellen festgestellt werden (Bild A). Weiterhin waren die lateral im ZNS gelegenen L-SPG (Bild B) und in ventraler Ebene weitere SPG doppelt gefärbt (Bild C). Anterior ist links.

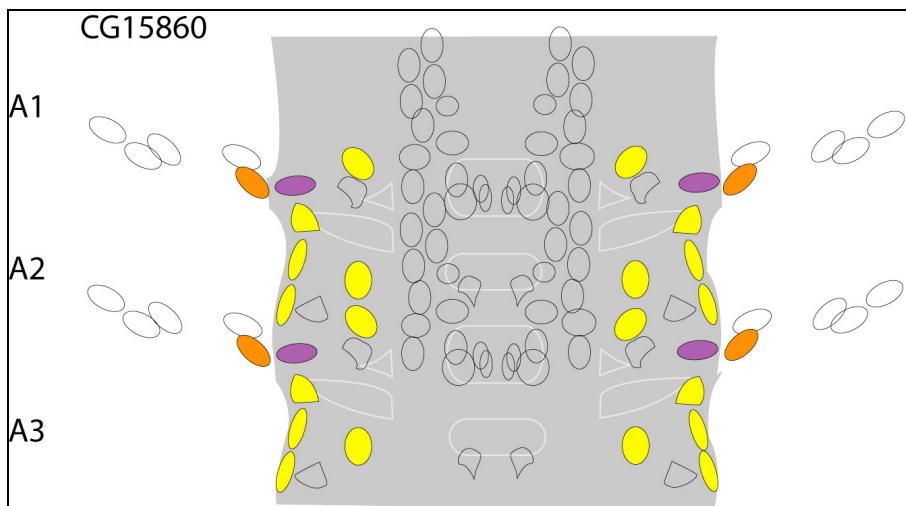


Abbildung 3.18 Glia-Schema CG15860

CG15860 wird im ZNS in vielen dorsalen und ventralen SPG, sowie 2-3 Zellen im Bereich des auslaufenden Nervs exprimiert, wovon nur eine als NRG sicher identifiziert werden konnte.

- **CG3168**

Bei diesem Gen handelt es sich um ein Glia-spezifisches Gen, das entsprechend dem Microarray-Profil erst in späten Stadien detektiert werden konnte. Das gliale Expressionsmuster wird an 4 verschiedenen Ebenen in einem Stadium 16 Embryo gezeigt (Abb. 3.20). Antikörperfärbungen gegen Repo bestätigten, daß es sich bei den CG3168-positiven Zellen um Gliazellen handelt (Daten nicht gezeigt). Dorsal wird dieses Gen in Zellen exprimiert, die an der Position der A-SPG und der D-SPG liegen, auch wenn letztere etwas weit lateral im ZNS positioniert ist (Abb. 3.20, Bild A). Eine deutliche Färbung zeigte sich in der L-SPG (Abb. 3.20, Bild B). Weiterhin sind sowohl die dorsalen als auch die ventralen CG gefärbt (Abb. 3.20, Bild B und C). In den ventralen Ebenen ist die eine medial liegende SPG CG3168 positiv (Abb. 3.20, Bild D). In der Peripherie zeigten viele, wenn nicht alle EG/PG Doppelfärbung (Abb. 3.19, Bild B und C). Durch die

GO-Annotierung in der FlyBase Datenbank wurde CG3168 als DNA-bindendes Protein charakterisiert, das am DNA-Metabolismus beteiligt ist.

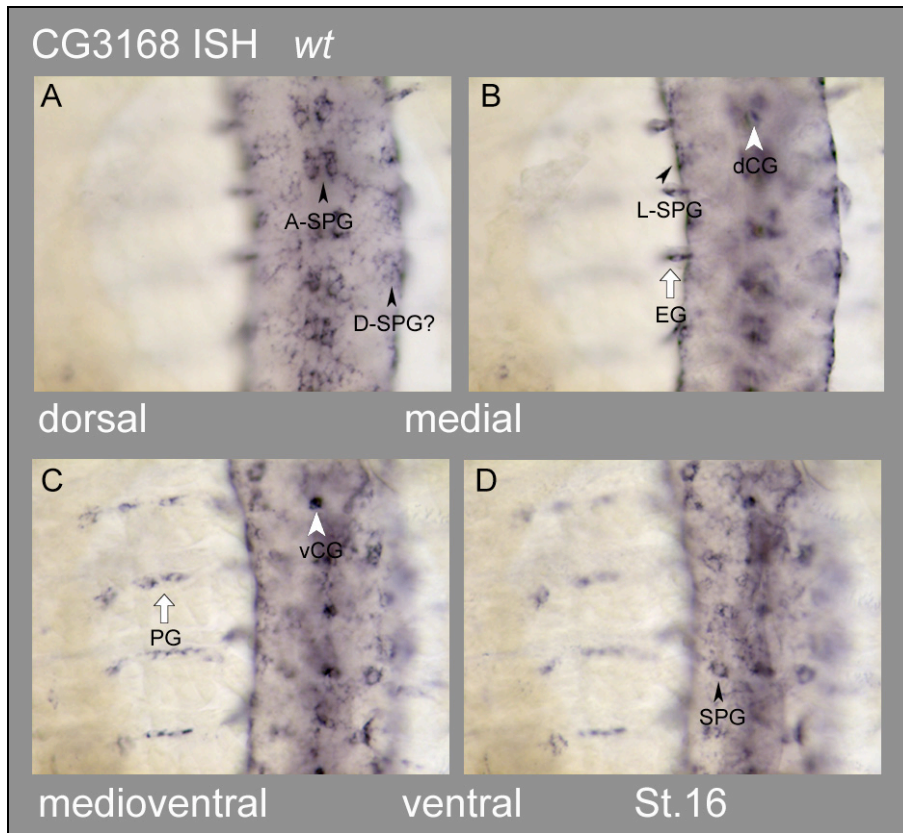


Abbildung 3.19 Expression von CG3168

Die ISH des Glia-spezifische Gens CG3168 wird in dorsal liegenden SPG sowie den dorsalen CG und 1-2 EG (Bild A und B) exprimiert. In ventralen Ebenen wird CG3168 in vielen PG, den ventralen CG und weiteren SPG exprimiert (Bild C und D). Anterior ist oben.

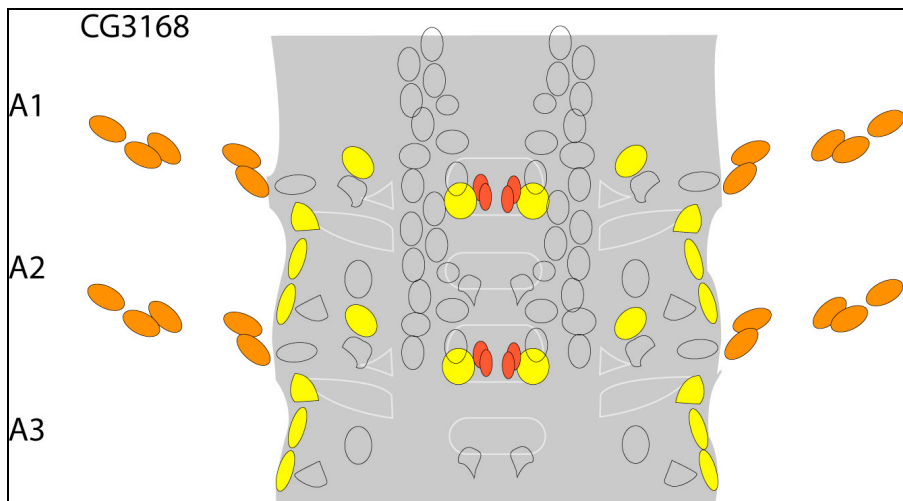


Abbildung 3.20 Glia-Schema CG3168

Das wildtypische Expressionsmuster von CG3168 zeigt Expression in nahezu allen SPG und PG. Weiterhin wird es auch in den dorsalen und ventralen CG exprimiert.

- **CG7433**

Die ISH von CG7433 zeigte nur eine sehr schwache Färbung und hatte häufig viel unspezifische Hintergrundfärbung. Trotz mehrfacher, erneuter Sondenherstellung konnte dieses Ergebnis leider nicht verbessert werden. Daher zeigt die Abb.3.21 nur eine ISH ohne Repo-Antikörperfärbung, damit die schwache ISH-Färbung nicht überdeckt wird. Die dorsal gelegenen longitudinalen Glia konnten aufgrund der charakteristischen Anordnung eindeutig identifiziert werden (Abb. 3.21, Bild A). Weitere 2-3 Zellen waren ventral im ZNS angefärbt, wobei es sich höchstwahrscheinlich um SPG handelt (Abb. 3.21, Bild B). Die Färbung konnte erst in den Stadien 14-16 beobachtet werden und steht somit im Gegensatz zu dem Expressionsprofil des Microarray, das die stärkste differentielle Regulation in Stadium 12 zeigt. Aus der GO-Annotation geht hervor, daß es sich bei CG7433 vermutlich um eine Transaminase handelt, die am Aminosäure-Metabolismus beteiligt ist.

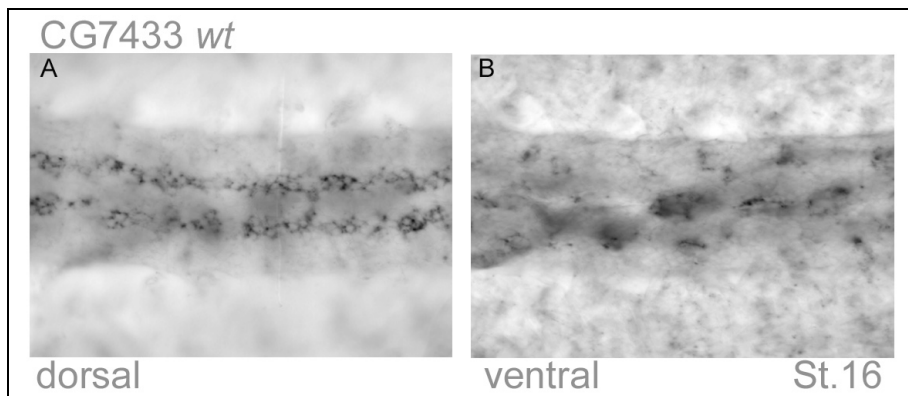


Abbildung 3.21 Expression von CG7433

Die Filetpräparation der ISH von CG7433 zeigt in dorsaler Ebene eindeutige Färbung in longitudinalen Glia (Bild A). Bei den gefärbten Zellen in Bild B handelt es sich höchstwahrscheinlich um ventrale SPG. Anterior ist links.

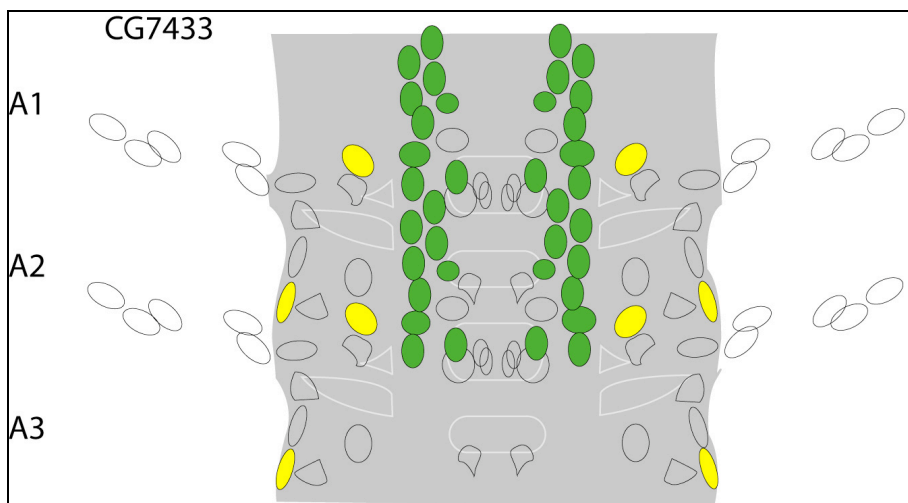


Abbildung 3.22 Glia-Schema CG7433

CG7433 wird in nur zwei glialen Subtypen exprimiert, den dorsal liegenden LG und den ventralen SPG.

3.2.3. Charakterisierung der LOF-Kandidaten

Für die Darstellung eines Verlaufprofils in der LOF wurde der Wert für das fehlende experimentelle Stadium 15 als Mittelwert zwischen den Werten des Stadiums 14 und 16 abgeschätzt, um die Kurven-Darstellung zu erleichtern. Differentielle Regulationen höher als -1.5 wurden ebenfalls aus der Gesamtliste entnommen.

Diese 4 Profile zeigen die drei unterschiedlichen Hauptkategorien von differentiell regulierten Genen, die in der LOF-Analyse gefunden werden konnten. Das typische Profil eines früh bzw. spät differentiell regulierten Genes konnte für CG8965 bzw. CG11910 beobachtet werden. Die mittlere Kategorie umfaßt Gene, die in Stadium 12/13 ihre maximale differentielle Regulation zeigten.

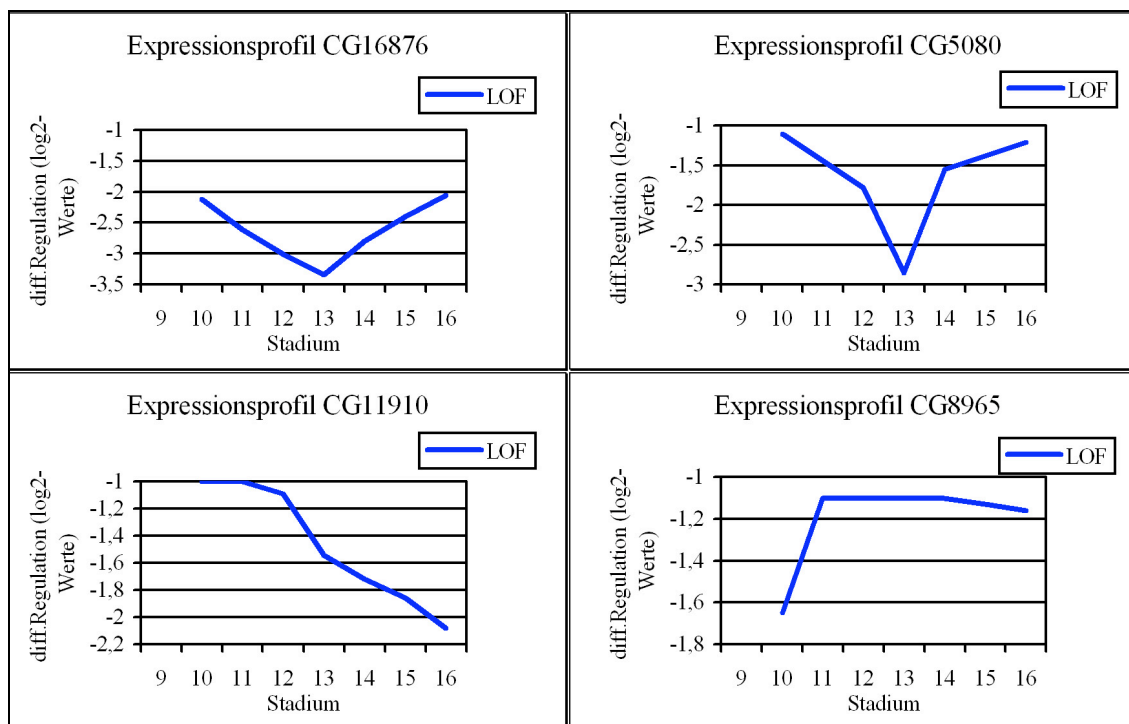


Abbildung 3.23 Expressionsprofile der LOF-Kandidaten

Mit Hilfe der M-CHiPS-gefilterten Listen bzw. der Gesamtliste wurde ein Verlaufsprofil der vier LOF-Kandidaten erstellt. Das fehlende experimentelle Stadium 15 wurde als Mittelwert der Stadien 14 und 16 abgeschätzt, um ein Verlaufsprofil zu zeigen.

- **CG16876 (BG:DS05899.3)**

CG16876 zeigte Expression in zwei *gcm*-abhängigen Zelltypen: den Gliazellen und den Plasmatozyten bzw. Makrophagen. Es ist auf dem Microarray in allen Stadien stark differentiell reguliert mit einem Tiefpunkt in Stadium 13. Die Expression von CG16876 beginnt in Stadium 10 in Plasmatozyten, die im Kopfbereich lokalisiert sind (Abb. 3.24, Bild A und B). Diese Blutzellen beginnen in Stadium 11/12 durch die dorsoventral Kanäle als nun entwickelte Makrophagen zu migrieren und verteilen sich bis Stadium 14 im

gesamten Embryo. Die Expression von CG16876 endet in Makrophagen in Stadium 15 und so konnte in Stadium 16 eine Glia-spezifische Färbung dieses Gens detektiert werden. Erstmals konnte diese Färbung in lateralen Gliazellen in Stadium 13 in den vom NB6-4 stammenden CBG beobachtet werden (Abb. 3.24, Bild C). Am Ende der Embryogenese wird CG16876 in der dorsolateralen SPG (L-SPG) und den CBG des NB6-4 exprimiert. Weiterhin waren dorsal zwei Gliazellen gefärbt, wobei es sich vermutlich um zwei der neun LG handelt (Abb. 3.24, Bild D und E).

Im Entwicklungsstadium 13, das die maximale differentielle Regulation zeigt, konnte die stärkste Färbung in den Blutzellen und erstmals Expression in Gliazellen detektiert werden. Da jedoch die Färbung der Makrophagen in ISH von CG16876 in *gcm* Funktionsverlustmutanten noch sichtbar war, entspricht das Microarray-Expressionsprofil nicht den Beobachtungen.

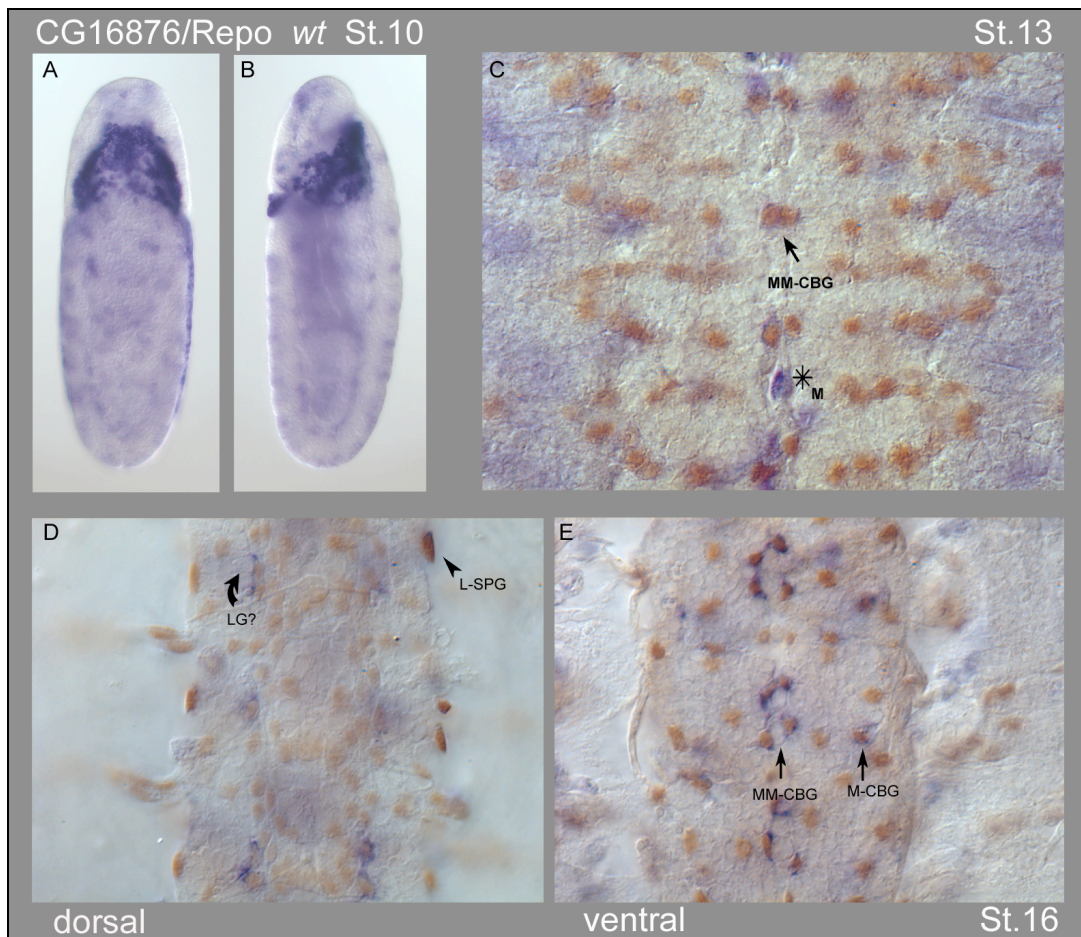


Abbildung 3.24 Expression von CG16876

Die Bilder A und B zeigen eine ventrale und laterale Ansicht eines *wt*-Embryos in Stadium 10. Die mRNA von CG16876 konnte durch ISH in Plasmatozyten detektiert werden, die in der Kopffregion lokalisiert sind. Die folgenden Doppelfärbungen mit Repo bestätigen die gliale Expression von CG16876. Im ZNS wird CG16876 erstmals in den MM-CBG detektiert. Die entwickelten Makrophagen (Stern) migrieren durch die dorsoventral Kanäle. Am Ende der Embryogenese wird CG16876 in der dorsal liegenden L-SPG und 2 Zellen neben den axonalen Trakten exprimiert, wobei es sich wahrscheinlich um LG handelt. Die ventrale Ansicht zeigt Doppelfärbung in den 4 MM-CBG in den thorakalen Segmenten T2 und T3 und in der weiter lateral liegenden M-CBG, die alle vom NB6-4t stammen. Anterior ist oben.

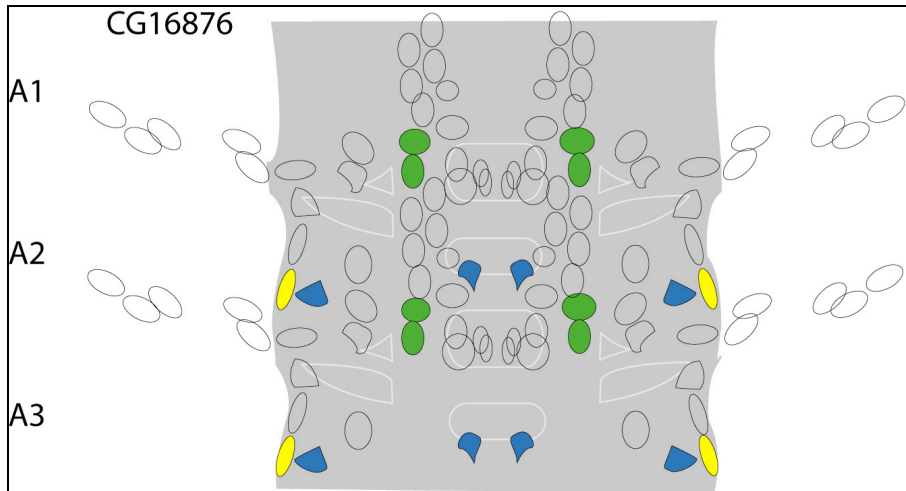


Abbildung 3.25 Glia-Schema CG16876

Im ZNS wird CG16876 in den vom NB-6-4 abstammenden CBG, sowie der L-SPG exprimiert. Von den auf den axonalen Trakten liegenden LG sind vermutlich nur zwei Zellen CG16876 positiv.

- **CG5080**

In der ISH konnten dorsal zwei medial liegende Zellen detektiert werden, bei denen es sich um die A-SPG handelt (Abb. 3.26, Bild A), wie Doppelfärbungen mit Repo bestätigten. Das Fehlen dieser spezifischen Färbung in der *gcm*-Funktionsverlustmutanten ist ein weiterer Hinweis, daß es sich hierbei um Gliazellen handelt. Eindeutig gefärbt war die laterale SPG und in ventraler Ebene die LV-SPG. Weiterhin war in manchen Präparaten die ventrale CG schwach angefärbt (Abb. 3.26, Bild B und C). Somit ist dieses Gen nur in der glialen Gruppe der "Neuropile-associated glia" exprimiert. Die subperineurale Färbung konnte erstmals in Stadium 12 detektiert werden. In den Stadien 13 und 14 konnte außerhalb des ZNS eine starke Färbung der Muskeln beobachtet werden, die in späteren Stadien noch schwach zu sehen war. Dies könnte das ab Stadium 13 ansteigende Expressionsprofil erklären, da in der Funktionsverlustmutante von *gcm* diese Färbung weiterhin deutlich sichtbar war und nur die Expression in den lateralen Glia fehlte. Somit wird die fehlende gliale Expression durch die starke mesodermale Expression überdeckt und die differentielle Regulation kann lediglich in frühen Stadien festgestellt werden, in denen CG5080 nur in Gliazellen exprimiert wird. Die Funktion dieses Gens ist bisher nicht bekannt.

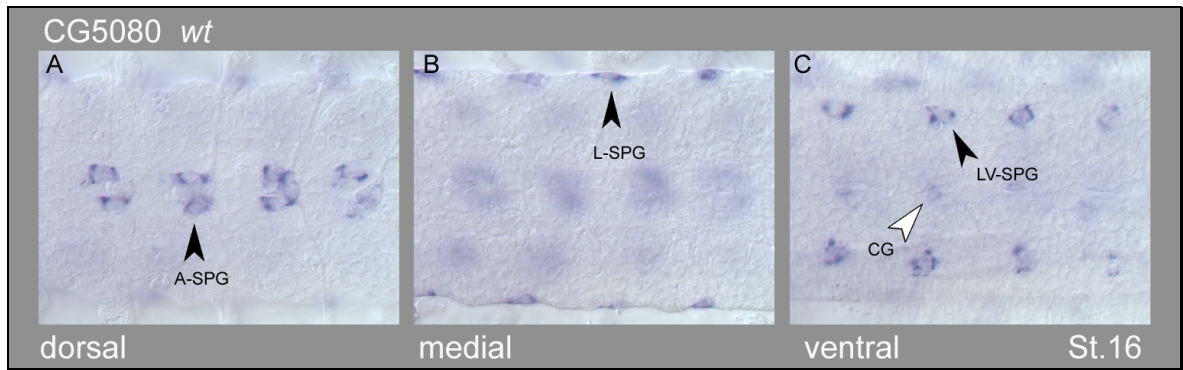


Abbildung 3.26 Expression von CG5080

Die ISH zeigte spezifische Färbung in zwei dorsal liegenden Zellen, bei denen es sich vermutlich um die A-SPG handelt (Bild A). Eindeutig konnte CG5080 in der L-SPG (Bild B) und LV-SPG (Bild C) detektiert werden. Schwache Färbung zeigten in diesem Präparat auch die vCG. Anterior ist links.

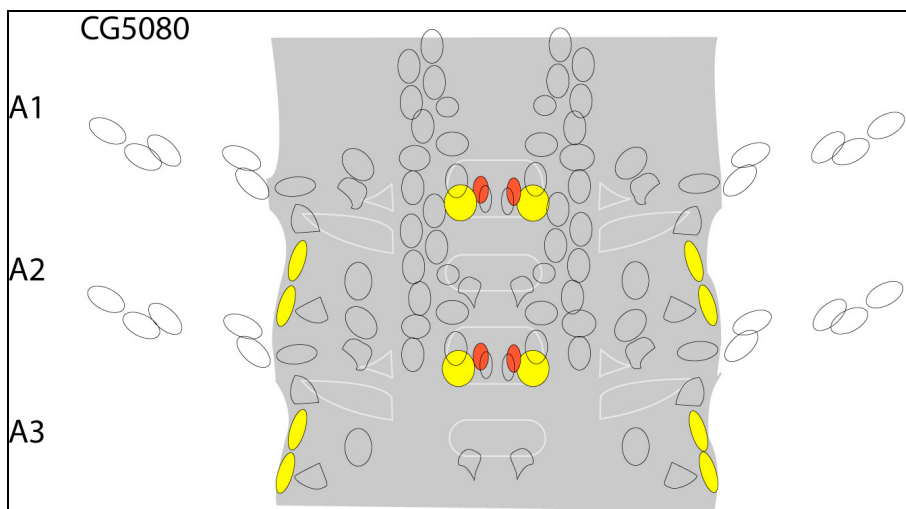


Abbildung 3.27 Glia-Schema CG5080

CG5080 wird in der L-SPG, den vCG und in einer ventralen CBG exprimiert. Bei den dorsal liegenden Zellen, die CG5080 positiv sind, handelt es sich vermutlich um die A-SPG.

• CG11910

Das Microarray-Profil von CG11910 zeigt differentielle Regulation in Stadium 13 und verläuft dann linear bis zum Tiefpunkt in Stadium 16. Dieses temporäre Profil stimmt vollständig mit den Beobachtungen *in vivo* überein. Erste Färbung konnte schwach in Stadium 13 detektiert werden, die sich dann bis Stadium 16 schrittweise verstärkt (Abb. 3.28, Bilder A-C). CG11910 ist das einzige identifizierte Kandidatengen, was nur in einem glialen Subtyp exprimiert wird, den longitudinalen Glia. Alle LG stammen, wie bereits erwähnt, aus dem LGB, der als erste *gcm*-positive Zelle in Stadium 10 detektierbar ist. Insgesamt bringt der LGB 8-10 Zellen hervor, die auch alle CG11910-positiv sind. Auf eine Doppelfärbung mit Repo wurde verzichtet, da eine Identifizierung der LG aufgrund der charakteristischen Position eindeutig ist und das schwache ISH-Signal der Sonde durch

die Repo-Färbung überdeckt wurde. Die GO-Annotation weist CG11910 eine Rolle in der Signaltransduktion zu.

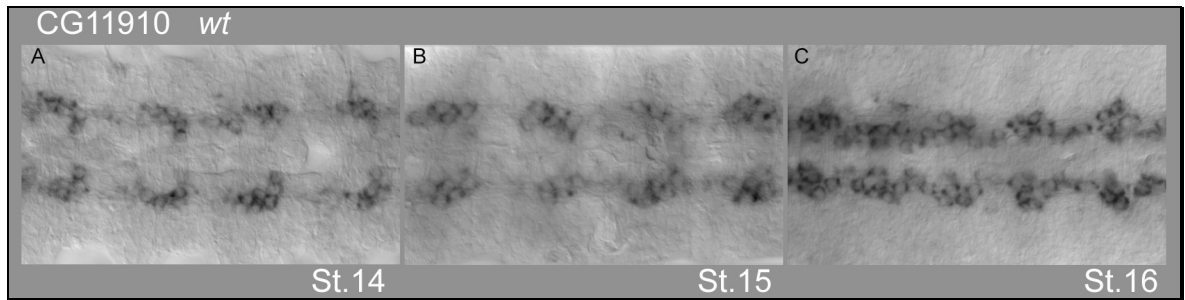


Abbildung 3.28 Expression von CG11910

Die Filetpräparationen zeigen eine ISH von CG11910 in den Stadien 14, 15 und 16. Dieses Gen wird exklusiv in allen longitudinalen Gliazellen exprimiert

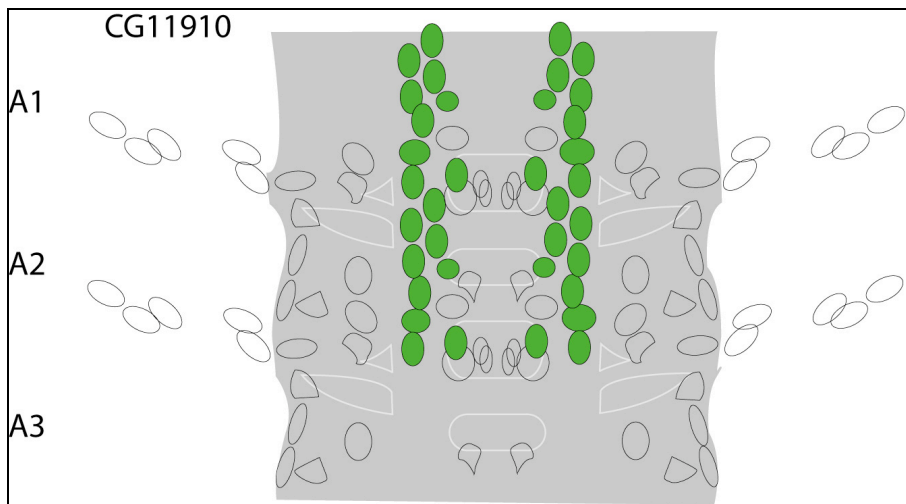


Abbildung 3.29 Glia-Schema CG11910

CG16876 wird nur in einem glialen Subtyp, den longitudinalen Glia, exprimiert.

- **CG8965**

Dieses in der Funktion unbekanntes Gen zeigte in der ISH ein sehr dynamisches Muster und war schon ab Stadium 9 stark in den trachealen Anlagen und den visceralen Muskelanlagen exprimiert. Ab Stadium 11 konnte neben den Mittellinien-Glia schwache Färbung in lateralen Glia detektiert werden. Wie die fluoreszente ISH gegen CG8965 (magenta) kombiniert mit der Repo-Antikörperfärbung (grün) in Abb. 3.30 Bild A zeigt, handelt es sich hierbei um longitudinale Glia. Dies bestätigt auch die AP-gefärbte ISH (Abb. 3.30, Bild B). Weitere Zellen in der Peripherie, wobei es sich um wenige PG handeln könnte, waren ebenfalls CG8965 positiv (Daten nicht gezeigt). Auch hier scheint die starke Färbung außerhalb des ZNS das Microarray-Expressionsprofil zu beeinflussen, das lediglich in Stadium 10, dem Beginn der glialen Expression in LG, leicht differentiell reguliert ist.

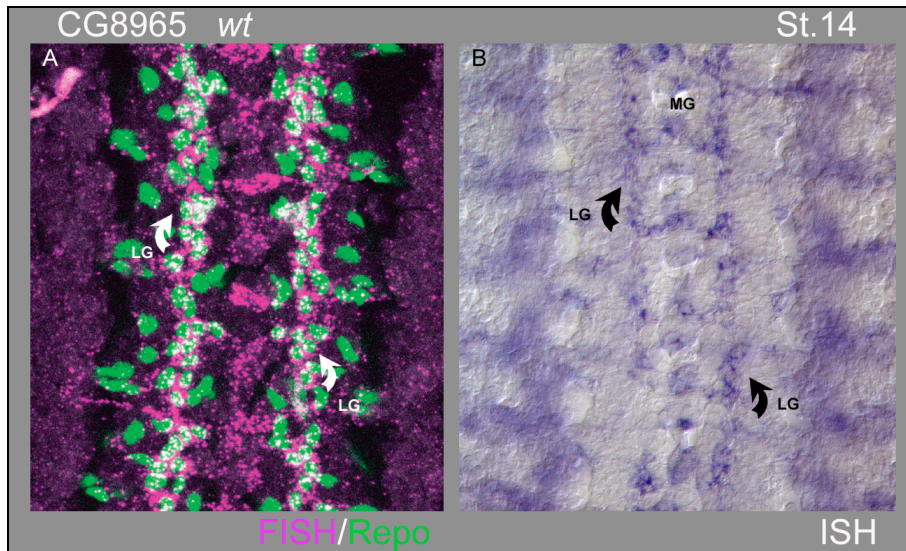


Abbildung 3.30 Expression von CG8965

Die fluoreszente ISH von CG8965 (magenta) wurde mit Repo-Antikörperfärbung (grün) kombiniert, so daß die doppelt gefärbten longitudinalen Glia weiß erscheinen. Gezeigt sind konfokale LSM-Bilder in denen 2-4 Ebenen (je 0,8 μm dicke Schnitte) übereinandergelegt wurden (Bild A). Bild B zeigt eine AP-gefärbte ISH gegen CG8965, die eine Expression in LG bestätigt. Medial sind in beiden Bildern Mittellinien-Glia (MG) gefärbt. Anterior ist oben.

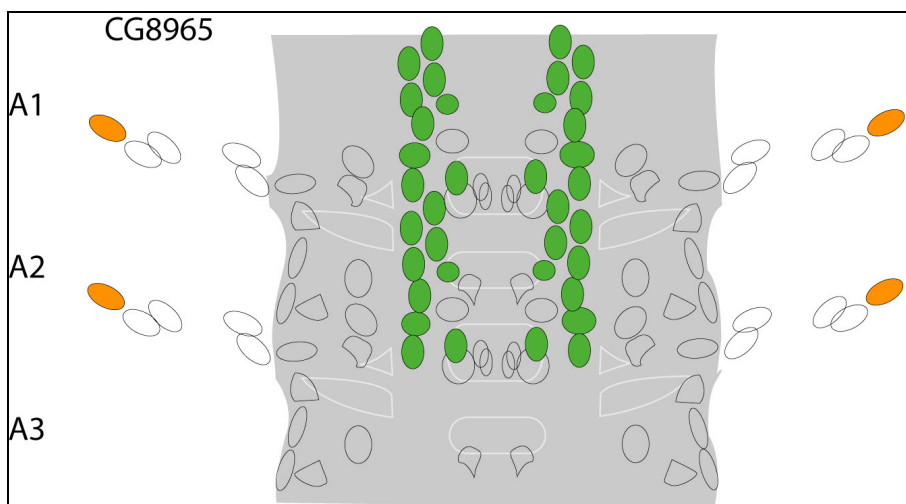


Abbildung 3.31 Glia-Schema CG8965

CG8965 wird im ZNS in allen longitudinalen Glia und vermutlich in der Peripherie in einzelnen PG exprimiert.

3.2.4. Charakterisierung der Antagonisten

In der folgenden Übersicht sind die Expressionsprofile der vier ausgewählten Antagonisten CG6218, CG6783, CG9336 und CG2893 in der GOF (rechts) und der LOF (links) dargestellt.

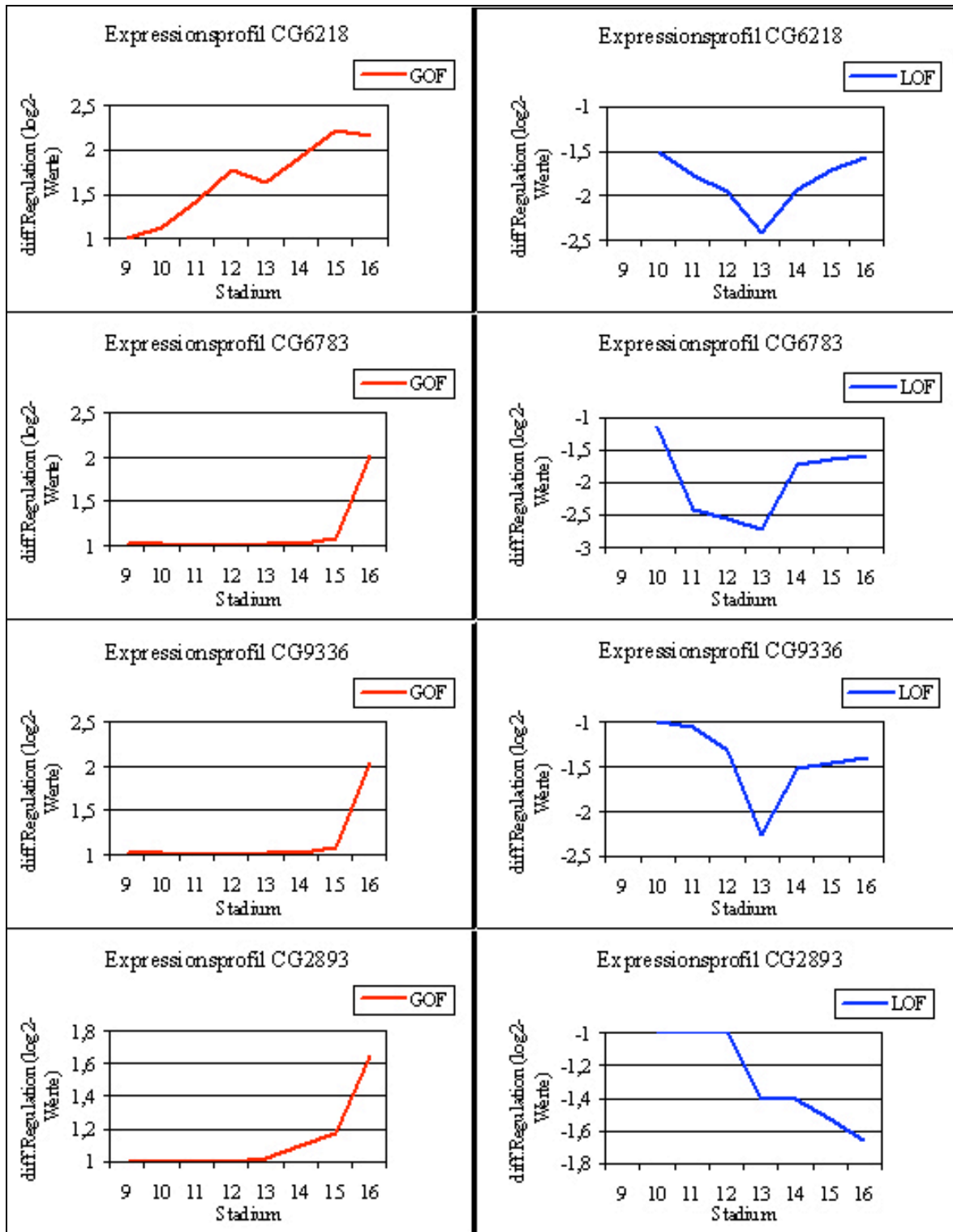


Abbildung 3.32 Expressionsprofile der Antagonisten

Mit Hilfe der M-CHiPS-gefilterten Listen bzw. der Gesamtliste wurde ein Verlaufsprofil der vier Antagonisten erstellt.

CG6218 zeigt in den GOF Microarray-Daten ab Stadium 11 differentielle Regulation und steigt an bis Stadium 16. Durch diesen Verlauf wird es zu den früh regulierten Genen gezählt, während die anderen drei Gene in der GOF zu den spät regulierten Genen gehören. In der LOF zeigen die drei Kandidaten CG6218, CG6783 und CG9336 ein vergleichbares Expressionsprofil, das sich durch einen maximalen Tiefpunkt der differentiellen Regulation in Stadium 13 auszeichnet. Lediglich CG2893 zeigt ein lineares Profil und bildet ein exaktes gegenläufiges Profil im Vergleich zur GOF-Analyse.

- **CG6218**

Am Beispiel des Antagonisten CG6218 wird das gliale Expressionsmuster im Entwicklungsverlauf erläutert (Abb. 3.33, Bilder A-E). Die ISH ist wiederum als cytoplasmatische AP-Färbung in blau zu sehen und mit kernständiger Repo-Färbung (DAB) in braun gefärbt. Zum ersten Mal detektiert wird die mRNA in Stadium 11 in den Nachkommenzellen des NB6-4, den MM-CBG. Während es in den abdominalen Segmenten nur eine MM-CBG gibt, sind es in den thorakalen Segmenten zwei MM-CBG. Weiterhin wird CG6218 im frühen Stadium 12 in den CBG des NB7-4, der SPG des NB5-6 und in einer Zelle des NB1-3 exprimiert, die vermutlich als PG in späteren Stadien aus dem ZNS auswandern wird. In Stadium 14 sind neben den MM-CBG, die durch ihre Position eindeutig identifiziert werden können, mindestens 5 weitere Zellen in medialer Schnittebene, 1-2 Zellen in dorsaler Ebene, sowie 2 Zellen ventral doppelt gefärbt. Eine genaue Zuordnung oder Benennung dieser Zellen ist in diesem Stadium leider nicht möglich. Anhand der Färbungen des Entwicklungsstadium 16 läßt sich zusammenfassen, daß CG6218 in allen CBG, in der anterioren SPG (B-SPG) und vermutlich in 1-2 NRG exprimiert wird, wobei es sich hierbei auch um LG handeln könnte. Weiterhin zeigen mehrere SPG, die in lateraler und dorsaler Position (L-SPG bzw. D-SPG) liegen, Doppelfärbung mit dem glialen Marker. In der Peripherie erscheinen sowohl 2 EG als auch 3-4 PG positiv für CG6218. CG und ventrale SPG sind eindeutig nicht gefärbt. In Abb. 3.34 ist wiederum eine schematische Gliakarte gezeigt, die die Expression von CG6218 in den im ZNS gelegenen Gliazellen widerspiegelt.

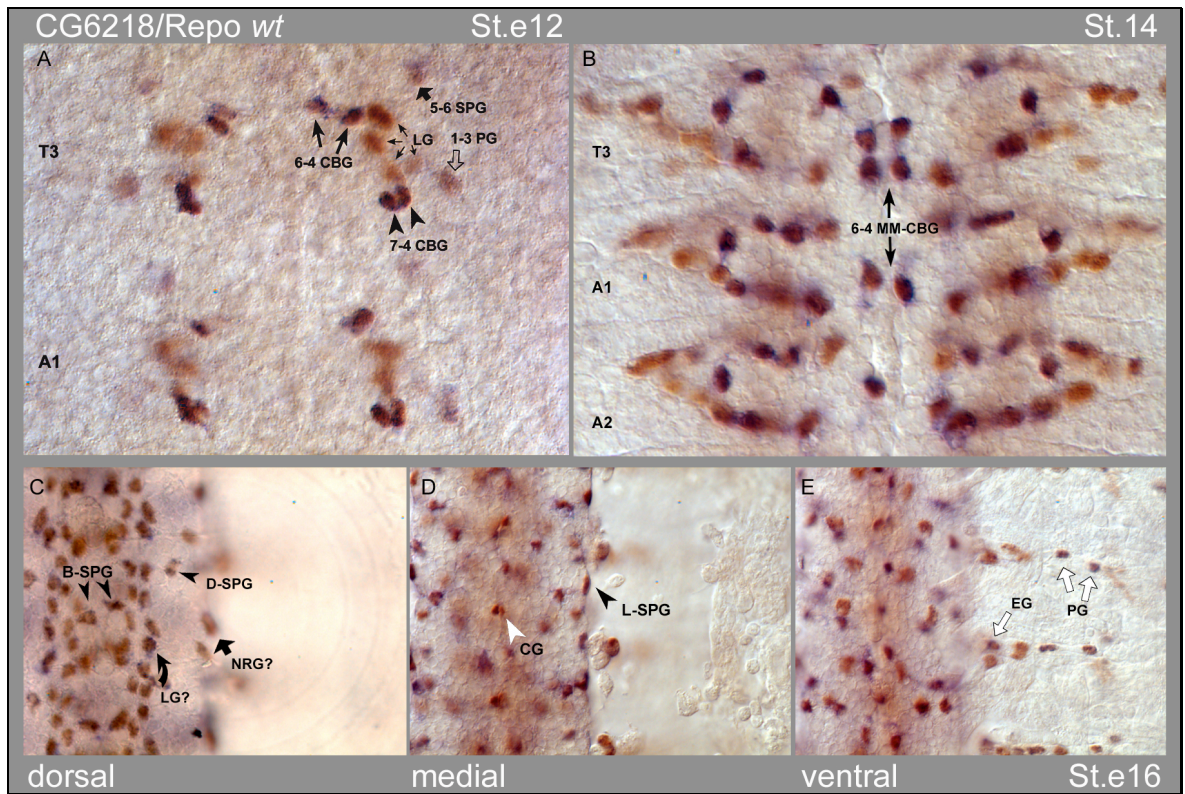


Abbildung 3.33 Expression von CG6218

Alle Bilder zeigen eine DAB-gefärbte ISH und eine nukleäre Repo-AP-Färbung. Bild A zeigt die zwei Neuromere T3 und A1 im frühen Stadium 12. Hier kann die ISH erstmals in den CBG des NB6-4 und NB7-4 sowie den SPG des NB5-6 detektiert werden. Schwach zeigt sich Expression im NB1-3, der PG ausbildet, während die 4 LG CG6218 nicht exprimieren. In Bild B ist die Tagma-Spezifität des NB6-4 deutlich zu sehen und alle Zellen exprimieren sowohl CG6218 als auch Repo. Im frühen Stadium 16 (Bilder C-E) kann ein ISH-Signal in den B-SPG und der D-SPG beobachtet werden. Expression in LG und der NRG konnte nicht sicher bestätigt werden. Weiterhin ist CG6218 in der L-SPG und mehreren EG/PG exprimiert. Anterior ist oben.

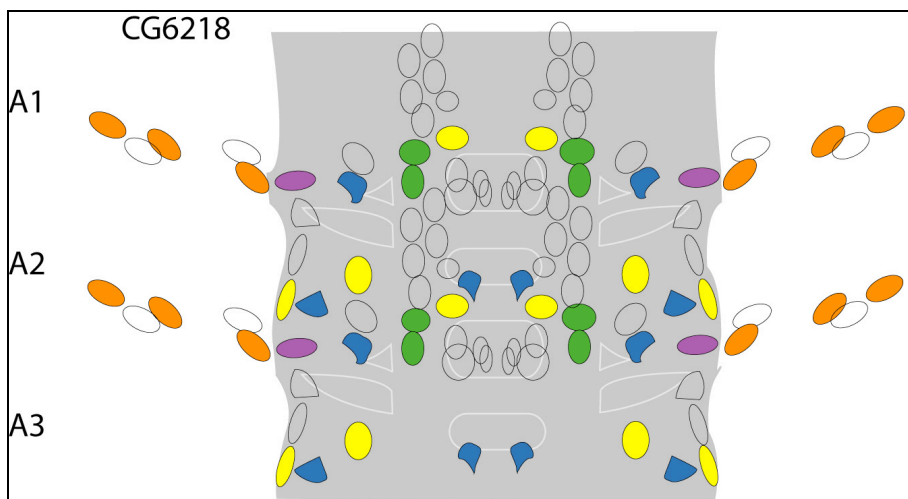


Abbildung 3.34 Glia-Schema CG6218

CG6218 wird dorsal in den B-SPG, der D-SPG, der lateralen NRG und vermutlich 2-3 LG exprimiert. Zusätzlich wurde es in allen 4 CBG und einzelnen EG/PG detektiert.

- **CG6783**

Auch CG6783 wird wie CG6218 in allen CBG exprimiert und zeigte auf den ersten Blick ein ähnliches Expressionsmuster. Die Expression in der dorsalen Ebene im ZNS stimmt vollständig überein und auch hier erscheinen einzelne LG in der ISH schwach gefärbt zu sein. Ventral sind zusätzlich die LV-SPG und eine weitere Zelle gefärbt, die nicht eindeutig zugeordnet werden kann (SPG?). Keine Expression von CG6783 konnte in den EG/PG detektiert werden (Abb. 3.35, Bilder A-C). Während in der LOF die beiden Expressionsprofile von CG6218 und CG6783 noch miteinander vergleichbar sind, unterscheiden sie sich doch deutlich in der GOF-Analyse. Für CG6218 stimmt das allmählich ansteigende Expressionsprofil mit dem Expressionsmuster *in vivo* vollständig überein. Zwar konnte CG6783 in der ISH zeitlich etwas später detektiert werden, aber die im Microarray-Profil gezeigte differentielle Regulation in Stadium 15/16 erscheint zu spät für das Glia-spezifische Expressionsmuster. In beiden Fällen ist der Anstieg des LOF-Profiles ab Stadium 13 nur schwer zu erklären. Funktionell können beide Gene unter dem Oberbegriff „Metabolismus“ eingeordnet werden. Die GO-Annotation sagt für CG6218 eine Funktion als Carbohydrat-Kinase voraus, während CG6783 als Transporter und „Fettsäure-bindend“ eingestuft wird.

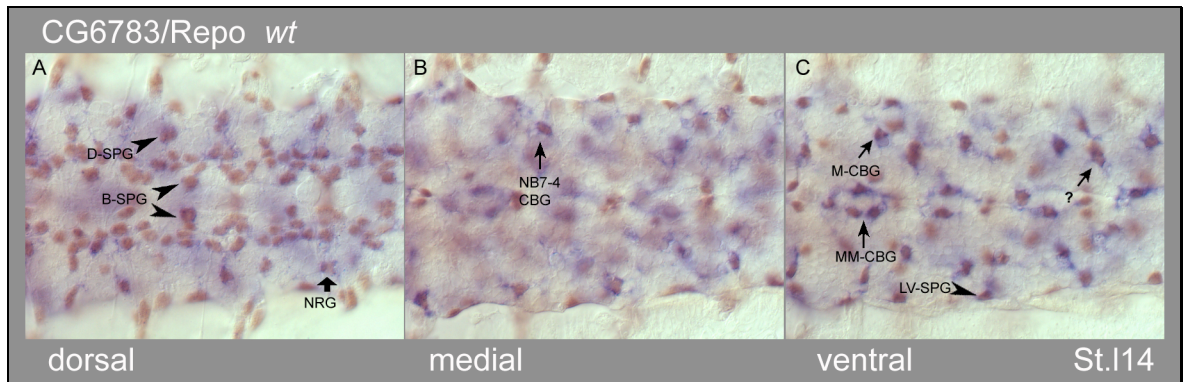


Abbildung 3.35 Expression von CG6783

Die Bilder A-C zeigen drei Ebenen einer Filetpräparation, in der eine ISH gegen CG6783 und eine Repo-Antikörperfärbung gezeigt werden. Eine Doppelfärbung konnte in den dorsal liegenden B-SPG, der D-SPG und der NRG (Bild A) detektiert werden. In den medialen und ventralen Ebenen sind alle CBG und die VL-SPG doppelt gefärbt, ebenso wie eine medial liegende Zelle, die nicht genau zugeordnet werden konnte. Anterior ist links.

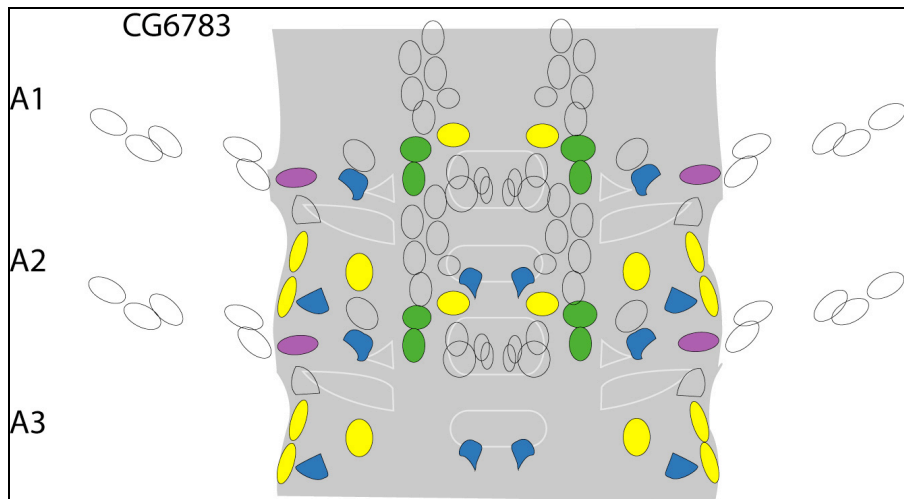


Abbildung 3.36 Glia-Schema CG6783

CG6783 wird in allen CBG, einzelnen dorsalen und ventralen SPG und der NRG exprimiert. Weiterhin konnte ein schwaches ISH in 2-3 LG detektiert werden.

- **CG9336**

Die Expression von CG9336 gibt Einblicke in die Migration der peripheren Gliazellen. Schon in Stadium 12 konnte Expression in den Mittellinien-Glia und einzelnen ZNS-Glia beobachtet werden. Diese Zellen konnten in Stadium früh 14 als 1-2 NRG und ventrale SPG identifiziert werden (Abb.3.37, Bild A und C). Die fluoreszenten Färbungen (Abb.3.37, Bild C-E) zeigen den Verlauf der glialen Wanderung von Stadium 14 bis Stadium 16. Mit Beginn der Wanderung in Stadium 13/14 konnten die ersten ISH-Signale am Rande des ZNS detektiert werden (Abb.3.37, Bild B). Dabei wandern die meisten PG am Intersegmental-Nerv (ISN) aus dem ZNS in die Peripherie. Das Schema in Abb.3.38 soll die Position und Bezeichnung der PG erläutern. Insgesamt liegen 11 periphere Glia am ISN, wovon in Stadium 16 zwei Zellen als EG bezeichnet werden. Danach folgt die ventrolaterale PG (vLPG). Die folgenden drei Zellen sind bisher nicht bezeichnet worden. Auf Höhe des lateralen Chordotonalorgans und den Oenozyten (Ö) liegen die mediolaterale (mLPG) und die dorsolaterale PG (dLPG). Letztere wandert ebenso wie die dorsale PG (dPG) aus der Peripherie in Richtung ZNS. Lediglich eine Zelle, die sogenannte ventrale PG (vPG), ist auf dem Segmental-Nerv (SN) positioniert. Die am Transversal-Nerv (TN) gelegene Zelle wird als TNPG bezeichnet. Die cytoplasmatische Färbung der ISH zeigt deutlich, wie die PG untereinander durch längliche Fortsätze Kontakt aufnehmen und den ganzen Nerv bedecken (Abb.3.37, Bild F). Hierbei konnte beobachtet werden, daß CG9336 nicht in der TNPG und zwei weiteren, unbenannten PG exprimiert wird. Während die Färbung der ZNS-Glia lediglich bis Stadium spät 14 sichtbar ist, sind die Mittellinien-Glia noch in Stadium 16 CG9336 positiv. In der Abbildung 3.38

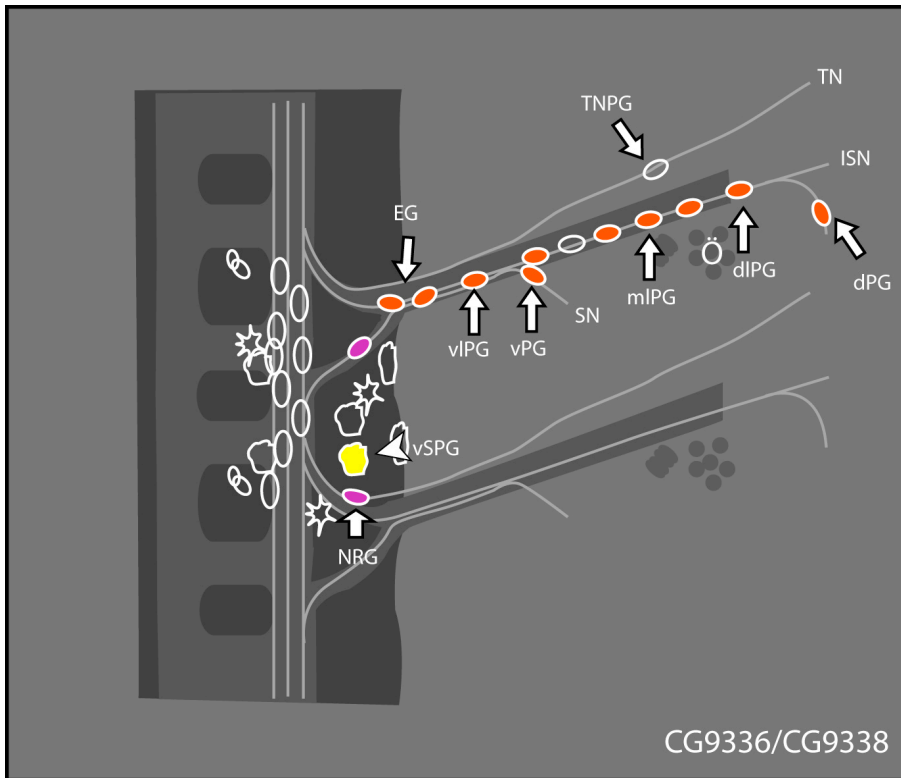


Abbildung 3.38 Glia-Schema CG9336

CG9336 wird in fast allen EG/PG exprimiert. Lediglich die am TN liegende PG (TNPG) und zwei weitere PG am ISN zeigten keine Expression. In den Stadien 12-14 wird CG9336 ebenfalls in 1-2 dorsal liegenden NRG und 1-2 ventralen SPG exprimiert.

- **CG2893**

Die zelluläre Charakterisierung von CG2893 zeigte, daß es sich um ein Glia-spezifisches Gen handelt, daß in mehreren Subtypen exprimiert wird. Entsprechend dem Microarray-Expressionsprofil konnte ein deutliches ISH-Signal erst in späteren Stadien detektiert werden, allerdings konnte der Beginn der Färbung in Stadium 13 festgestellt werden. Am Ende der Embryogenese konnte es in den dorsalen A-SPG, der D-SPG und der NRG detektiert werden. Weiterhin wird es in allen CBG exprimiert, die aus dem NB6-4 und NB7-4 stammen (Abb. 3.38, Bilder A-C). Ebenfalls konnte es von Stadium 13 an in den Mittellinien-Glia beobachtet werden. Die funktionelle Rolle von CG2893 wird in der FlyBase Datenbank als $\text{Ca}^{2+}/\text{Na}^{2+}$ -Antiporter beschrieben.

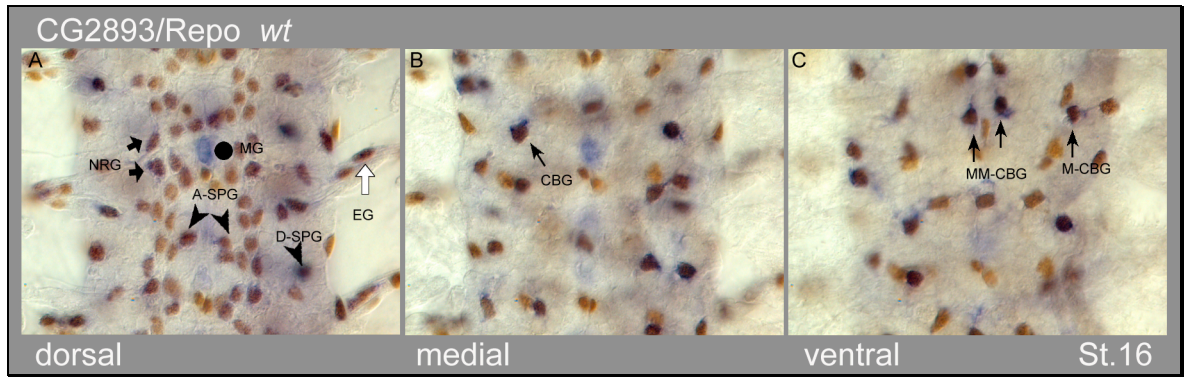


Abbildung 3.39 Expression von CG2893

Die nukleäre Antikörperfärbung gegen Repo zeigt, daß die mRNA von CG2893 in den dorsal liegenden A-SPG, der D-SPG und NRG detektiert werden konnte. Außerdem sind einzelne EG (Bild A) und PG doppelt gefärbt. In den medialen und ventralen Ebenen der Filetpräparation wird CG2893 in allen CBG exprimiert (Bilder B und C). Der schwarze Punkt in Bild A weist auf die Expression in den Mittellinien-Glia hin. Anterior ist oben.

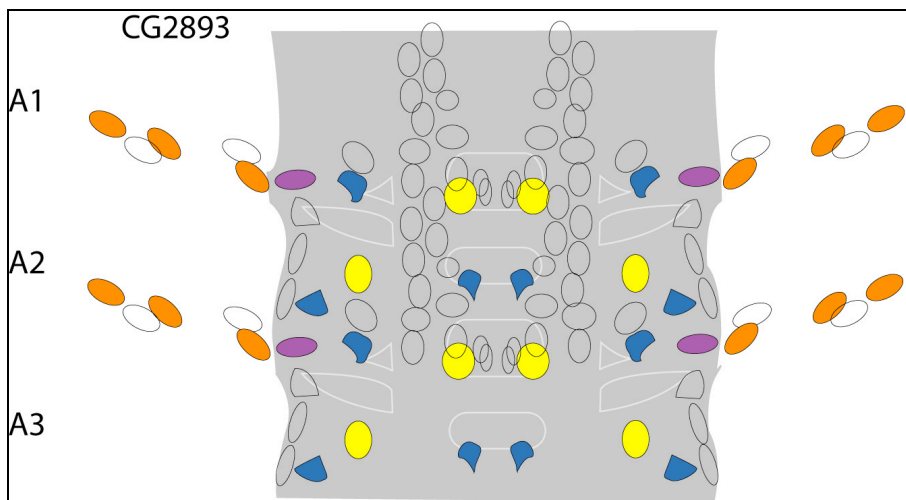


Abbildung 3.40 Glia-Schema CG2893

CG2893 wird in den dorsalen A-SPG und der D-SPG, sowie der NRG exprimiert. Außerdem wird es in allen CBG und einzelnen EG/PG exprimiert.

3.2.5. Abhängigkeiten der ausgesuchten Kandidaten von *gcm*

Der deutlich größere Anteil aller Kandidatengene zeigte nur in einem der beiden Ansätze differentielle Regulation und folglich konnte nur eine geringe Anzahl antagonistisch regulierter Gene identifiziert werden. Für die vier zellulär untersuchten Antagonisten konnte gezeigt werden, daß sie exklusiv in Gliazellen, im Falle von CG9336 und CG2893 auch in Mittellinien-Glia, exprimiert werden. Ihre Abhängigkeit durch *gcm* konnte durch ISH an Überexpressions- und Funktionsverlustmutanten von *gcm* gezeigt werden, in denen eine entsprechende Verstärkung bzw. ein Fehlen des ISH-Signals beobachtet wurde (siehe Abb.3.11).

Im Falle der GOF bzw. LOF-Kandidaten wurden ebenfalls ISH in beiden mutanten Hintergründen (*Mz1060::gcm* und *gcm⁻/gcm⁻*) durchgeführt, um das Microarray-Profil zu bestätigen. Für den temporalen Verlauf konnte im vorherigen Abschnitt gezeigt werden, daß in vielen Fällen das auf dem Microarray beobachtete Expressionsprofil mit der ISH im *wt* Embryo übereinstimmt. Nun sollte geklärt werden, ob die Gene auch *in vivo* nur in einem der beiden mutanten Hintergründe Veränderungen ihres Expressionsmusters zeigen. Bei der Überprüfung der LOF-Kandidaten konnte hierbei eine interessante Beobachtung gemacht werden. Die Gene CG11910 und CG8965, die beide in longitudinalen Gliazellen exprimiert werden, zeigten keine Verstärkung des Signals in Embryonen, in denen *gcm* ektopisch induziert worden war (Abb.3.41, Bilder A-D) und entsprechen somit den Microarray-Daten. Diese Beobachtung konnte auch für das Gen CG7433 gemacht werden, das aus ungeklärten Gründen in der GOF-Analyse differentiell reguliert auftauchte. Ebenso wie CG11910 und CG8965 fehlte die glia-spezifische Expression in *gcm* Funktionsverlustmutanten und so hätte dieses Gen in der LOF auftauchen müssen.

Kandidatengene der GOF (CG4322, CG15860) bzw. Antagonisten (CG6783), die in vielen Gliazellen und mehreren Subtypen exprimiert werden, zeigten eine deutliche Verstärkung des ISH-Signals in *gcm* Überexpressionsmutanten (Abb.3.41, Bilder E-H, K und L). Ähnliche Ergebnisse zeigten sich auch für die hier nicht gezeigten Gene CG3168 bzw. CG6783, CG9336 und CG2893. Sogar die im Wildtyp beobachtete Expression in einzelnen Gliazellen wurde durch die ektopische Expression von *gcm* verstärkt (Abb.3.41, CG5080 Bild I und J). CG5080 wurde jedoch nicht als Antagonist identifiziert, obwohl die ISH antagonistische Ergebnisse zeigten. Dies läßt sich durch die starke muskuläre Expression des Gens erklären, durch die die ektopische Expression in Gliazellen maskiert wurde, da sie im *wt* und den *Mz1060::gcm* Embryonen gleichermaßen vorhanden ist.

Somit läßt sich festhalten, daß für die analysierten Kandidatengene in den meisten Fällen sowohl das temporale Profil als auch die differentielle Regulation in nur einem der beiden Ansätze *in vivo* bestätigt werden konnte.

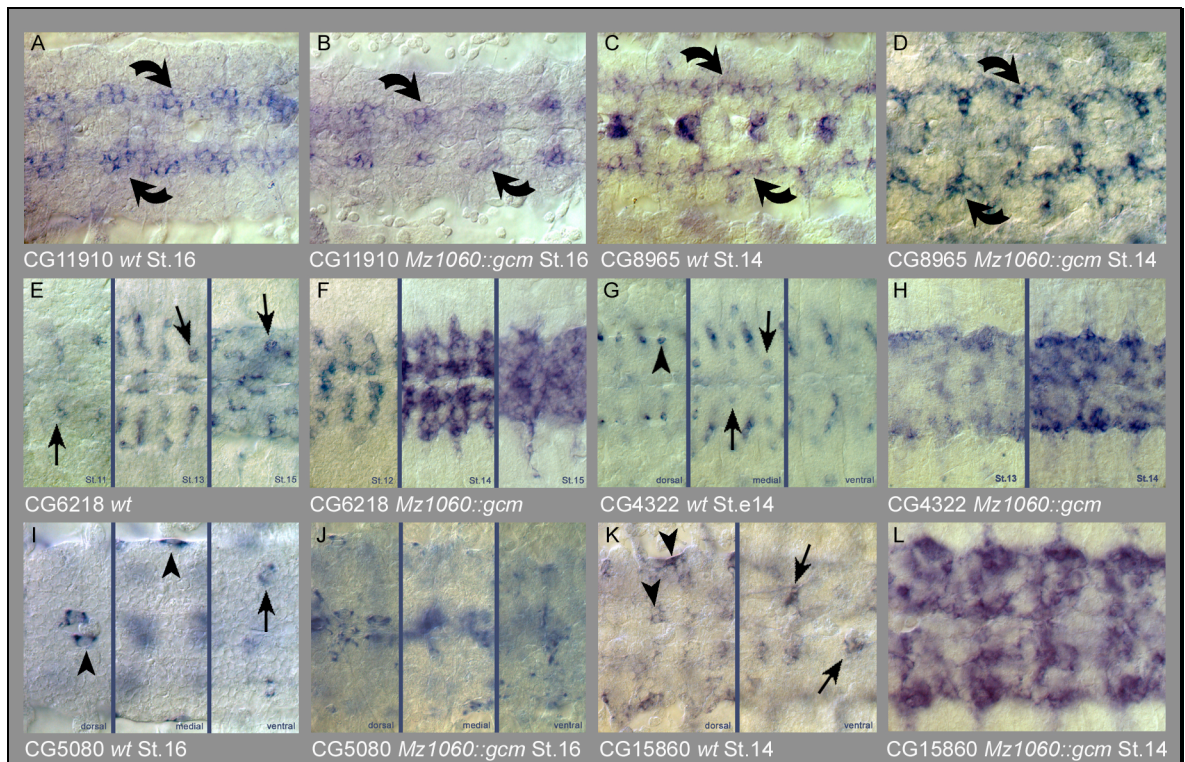


Abbildung 3.41 Abhängigkeit der Kandidaten von *gcm*

Die Abbildung zeigt ISH einzelner Kandidatengene an *wt* Embryonen und Überexpressionsembryonen (*Mz1060::gcm*). Wenn nötig wurden mehrere Ebenen und Stadien der Filetpräparationen miteinander kombiniert. Spezifische Expression in LG konnte durch ektopische *gcm*-Expression nicht verstärkt werden (CG11910 und CG8964, Bilder A-D). Im Gegensatz hierzu konnten alle anderen glialen Subtypen ektopisch induziert werden (Bilder E-L). Sogar Expression in einzelnen Gliazellen zeigte eine deutliche Verstärkung in *Mz1060::gcm* Embryonen (CG5080, Bild I und J). Anterior ist links.

3.2.6. Abhängigkeit der Kandidaten von bekannten glialen Genen

Nachdem die direkte oder indirekte Regulation durch *gcm* für alle ausgewählten Kandidatengene gezeigt werden konnte, wurde auch die Abhängigkeit von den bekannten *gcm* Zielgenen *repo*, *pointed* und *tramtrack* untersucht. Hierfür waren im Vorfeld, mit freundlicher Unterstützung von Olaf Vef und Benjamin Altenhein, Doppelmutanten von *repo* und *pnt*, *repo* und *ttk*, sowie die Tripelmutante, in der alle drei Gene betroffen sind, durch Rekombination hergestellt worden. Leider konnte die dritte Doppelmutante *pnt-ttk* im Laufe dieser Arbeit nicht generiert werden. Auch die Doppelmutante *repo-ttk* und die Tripelmutante standen erst am Ende dieser Arbeit zur Verfügung und so können die Ergebnisse hier nicht mehr aufgeführt werden. In der folgenden Tabelle sind die Ergebnisse der ISH aller Kandidaten in den jeweiligen mutanten Hintergründen aufgeführt. Es zeigte sich, daß nur für ein Gen, CG5080, eine Abhängigkeit von *repo* vermutet werden

kann. Alle übrigen Gene zeigten, mit Ausnahme von *gcm*, in keiner der Einzelmutanten oder der Doppelmutante eine Veränderung der Expressionsmusters, das in *wt* Embryonen beobachtet wurde.

Gen	Ansatz	<i>gcm</i> ⁺	<i>gcm</i> ⁻	<i>repo</i> ⁻	<i>pnt</i>	<i>ttk</i> ⁻	<i>repo</i> ⁻ , <i>pnt</i>
CG4322	GOF	++	--	0	0	0	0
CG15860	GOF	++	--	0	0	0	0
CG3168	GOF	++	--	0	0	0	0
CG7433	GOF	0	--	0	0	0	0
CG16876	LOF	++	--	0	0	0	0
CG5080	LOF	++	--	--	0	0	--
CG11910	LOF	0	--	0	0	0	0
CG8965	LOF	++	--	0	0	0	0
CG9338	LOF	++	--	0	0	0	0
CG6218	A	++	--	0	0	0	0
CG6783	A	++	--	0	0	0	0
CG9336	A	++	--	0	0	0	0
CG2893	A	++	--	0	0	0	0

Tabelle 3.9 Abhängigkeit der Kandidaten von glialen Genen

Die Tabelle beschreibt ISH der zellulär charakterisierten Kandidatengene aus der GOF, LOF bzw. aus beiden Ansätzen (A) in Überexpressions- (*gcm*⁺) (dritte Spalte) bzw. mutanten (*gcm*⁻) (vierte Spalte) Embryonen, in den Funktionsverlustmutanten *repo* (*repo*⁻, fünfte Spalte), *pointed* (*pnt*, sechste Spalte), *tramtrack* (*ttk*, siebte Spalte), sowie der Doppelmutanten für *repo* und *pointed* (*repo*⁻,*pnt*, achte Spalte). 0 steht für keine Veränderung der Expression, ++ verweist auf eine ektopische Expression, -- eine fehlende Expression des Gens in den jeweiligen mutanten Hintergründen.

CG5080 wird in nur wenigen Gliazellen im ZNS exprimiert, die ausschließlich aus der Gruppe der "Surface-associated" Glia stammen. Während die Expression im ZNS von CG5080 im *wt* und in den heterozygoten Mutanten deutlich sichtbar ist (Abb.3.42, Bilder A und B), fehlt diese Expression in den *repo*-Funktionsverlustmutanten (Bild C). Dies läßt eine Regulation durch *repo* vermuten.



Abbildung 3.42 Abhängigkeit von CG5080

Die Bilder zeigen die ISH von CG5080 (AP-Färbung) in *wt* Embryonen (A) und in heterozygoten *repo* Mutanten balanciert über *TM6b-AbdA-lacZ* (DAB-Färbung gegen β -Gal) (B). In beiden wildtypischen Hintergründen ist die bereits beschriebene glia-spezifische Färbung sichtbar. In den homozygoten *repo*-Mutanten (C) fehlt die Expression von CG5080. Anterior ist links.

Ebenso fehlte die Expression von CG5080 in der *repo-pnt* Doppelmutanten (Daten nicht gezeigt). Da jedoch in der Funktionsverlustmutante von *pnt* keine Veränderung beobachtet wurde, kann eine Regulation durch *pnt* ausgeschlossen werden und die fehlende Expression von CG5080 in der Doppelmutanten auf den Funktionsverlust von *repo* zurückgeführt werden.

3.2.7. Gcm-Bindestellen (GBS) Suche

Es konnte gezeigt werden, daß Gcm eine DNA-bindende Domäne enthält, die evolutiv konserviert ist. Akiyama *et al.* beschreiben, daß das Gcm Protein an die oktamere Konsensus-Sequenz 5'-ATGCGG(T/C)-3' mit hoher Spezifität bindet. Sie konnten 11 solcher Gcm-Bindestellen (GBS) in der 5'-Region des direkten Zielgenes *repo* finden. Als GBS werden alle Sequenzen auf beiden Strängen gewertet, die in mindestens 7 der 8 Nukleotide mit der Konsensus-Sequenz übereinstimmen. Auch die Häufigkeit dieser Sequenzen innerhalb eines Abschnittes (Clusterbildung) ist entscheidend. Während diese Sequenz in einem zufällig gewählten DNA-Abschnitt in Abständen von 0,7kb zu finden wäre, wurden alle 11 GBS in einem 4kb langen Bereich gefunden (Akiyama *et al.*, 1996). Diese Konsensus-Sequenz wurde u. a. auch von Freeman *et al.* zur Suche von Bindestellen verwendet, um mögliche *gcm* Zielgene zu identifizieren (Freeman *et al.*, 2003).

Mit Hilfe des Programms "GenePalette" wurde eine Suche nach GBS im 5'-Bereich aller 13 ausgewählten Kandidatengene durchgeführt. Als GBS wurden Sequenzen mit nur einer Fehlpaarung zur oben genannten Konsensus-Sequenz gewertet, die in einem max. 4kb großen Bereich vor dem jeweiligen Gen auf einem der beiden Stränge liegen.

Um zu zeigen, daß mit Hilfe dieses Programmes GBS vorhergesagt werden können, wurde die Suche nach GBS in der 5'-Region von *repo* wiederholt. Die grafische Darstellung der

Ergebnisse zeigt, daß "GenePalette" alle 11 GBS in dem 4kb langen 5'-Bereich bestätigen konnte.

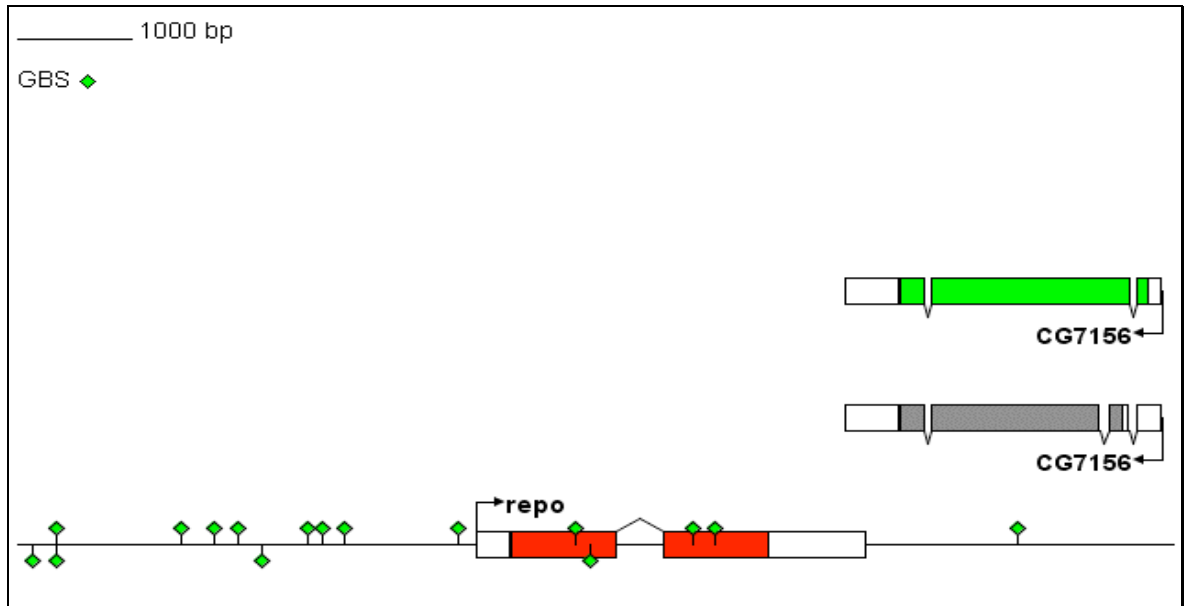


Abbildung 3.43 GBS-Suche im 5' Bereich von *repo*

Die schwarze Linie zeigen einen ca. 12kb großen Abschnitt des *repo* Locus mit dem benachbarten Gen CG7156, von dem zwei Transkriptvarianten existieren (grau und grün). Exons werden als Rechtecke dargestellt und die codierende Region des jeweiligen Gens ist farblich unterlegt. GBS mit der vorhergesagten Konsensus-Sequenz nach Akiyama *et al.* sind als hellgrüne Rauten eingezeichnet.

In der folgenden Tabelle sind die Ergebnisse der GBS-Suche eingetragen. Dabei wird zwischen den Bindestellen, die in allen acht Nukleotiden (GBS ohne Fehlpaarung) mit der Konsensus-Sequenz übereinstimmen und den GBS, die nur sieben der acht Nukleotide aufweisen, unterschieden (GBS mit Fehlpaarung). Manche Gene lagen in einer sehr genreichen Region, so daß gefundene GBS nur schlecht dem Kandidatengen zugeordnet werden konnten. Für CG2893 konnte keine Suche durchgeführt werden (n. d.), da die Sequenz nicht in dem von "GenePalette" angebotenen Genom von *Drosophila* enthalten war. Am Beispiel der Gene CG4322, CG16876 und CG5080 werden die Ergebnisse der GBS-Suche genauer erläutert.

Tabelle 3.10 GBS der Kandidatengene

Gen	GBS ohne Fehlpaarung	GBS mit einer Fehlpaarung
CG4322	--	4
CG15860	--	1
CG3168	--	--
CG7433	--	--
CG16876	1	8
CG5080	--	1
CG11910	--	--
CG8965	--	5
CG9338	--	1
CG6218	--	--
CG6783	--	2
CG9336	--	1
CG2893	n. d.	n. d.

- **CG4322**

Die glia-spezifische Expression von CG4322 konnte erstmals in Stadium 11 detektiert werden. Hierbei zeigten sich manche Parallelen zu der Expression von *repo*, das direkt durch *gcm* reguliert wird. Dazu zählt neben dem zeitlichen Expressionsprofil in vielen glialen Subtypen die Expression in Repo-positiven Zellen des Gehirns und des lateralen Chordotonalorgans, die für keines der untersuchten Kandidaten nachgewiesen wurde. Da die Expression von CG4322 jedoch noch in *repo* Funktionsverlustmutanten nachgewiesen wurde, während sie in *gcm* Funktionsverlustmutanten fehlt, könnte es sich ebenfalls um ein direktes Zielgen von *gcm* handeln. In der Suche konnten 4 GBS, die nur eine Fehlpaarung zu der Konsensus-Sequenz aufweisen, in einem ca. 1,5kb langen DNA-Abschnitt gefunden werden (Abb.3.44).

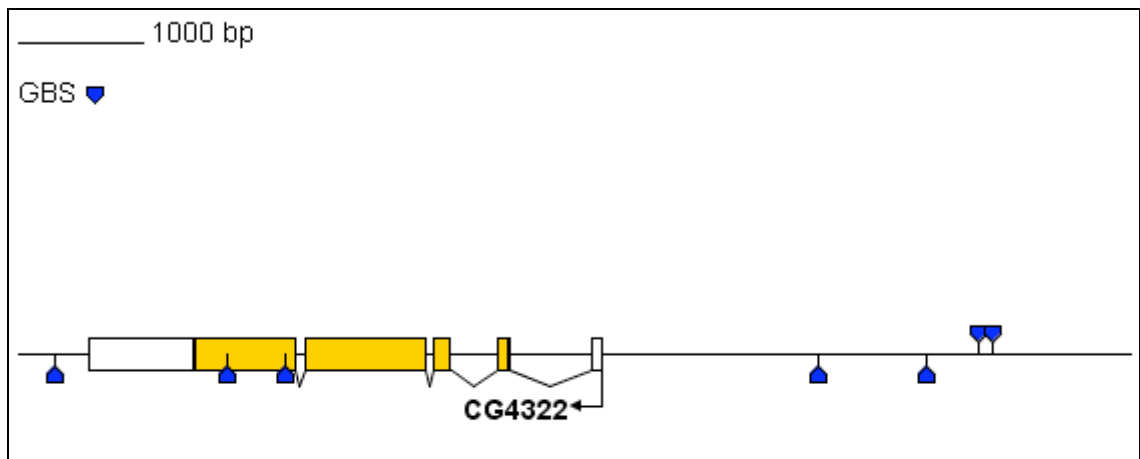


Abbildung 3.44 GBS-Suche im CG4322 Locus

Gezeigt wird ein ca. 8kb langer DNA-Abschnitt (Schwarze Linie) des CG4322 Locus. Exons sind als Rechtecke dargestellt, die codierende Region von CG4322 ist orange unterlegt. GBS mit keiner bzw. nur einer Fehlpaarung zur Konsensus-Sequenz sind als blaue Raute eingezeichnet.

- **CG16876**

In dem 4kb langen 5'-Bereich von CG16876 wurden insgesamt 9 GBS vorhergesagt, wobei eine Sequenz der Konsensus-Sequenz genau entspricht. Dies entspricht einer deutlichen Anhäufung von GBS.

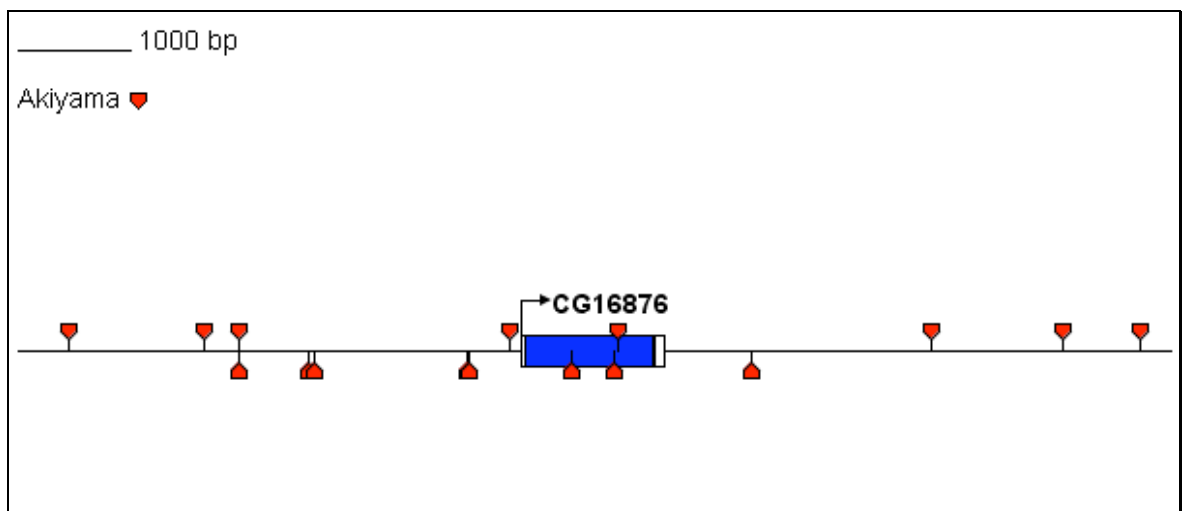


Abbildung 3.45 GBS-Suche im CG16876 Locus

Gezeigt wird ein ca. 10kb langer DNA-Abschnitt (Schwarze Linie) des CG16876 Locus. Exons sind als Rechtecke dargestellt, die codierende Region von CG16876 ist blau unterlegt. GBS mit keiner bzw. nur einer Fehlpaarung zur Konsensus-Sequenz sind als rote Raute eingezeichnet.

- **CG5080**

Da die Expression von CG5080 sowohl in *gcm* als auch in *repo* Funktionsverlustmutanten nicht detektiert werden konnte, wurde eine Bindestellen-Suche für beide Transkriptionsfaktoren durchgeführt. Für Gcm konnte nur eine GBS mit einer Fehlpaarung in direkter Nähe zum Transkriptionsstartpunkt von CG5080 gefunden werden. Repo gehört zur Klasse der Homöodomänen-Proteine und bindet an das CAATTA-Motiv, um als transkriptioneller Aktivator gliale Expression zu regulieren. Dieses Motiv ist jedoch nicht

spezifisch für Repo, da auch andere Homöodomänen Proteine wie Engrailed (EN) und Fushi-Tarazu (Ftz) an dieses Motiv binden (Desplan *et al.*, 1988; Schier und Gehring, 1992). Direkt vor der GBS (blaue Raute) konnte eine solche Homöodomänen Bindestelle (rotes Rechteck) identifiziert werden, die keine Fehlpaarung zur Motiv-Sequenz aufweist. Für eine Aktivierung von Zielgenen in Gliazellen benötigt Repo in der Regel Co-Faktoren, die ebenfalls eine spezifische Bindestelle in der Enhancer-Region des Zielgenes besitzen (Yuasa *et al.*, 2003).

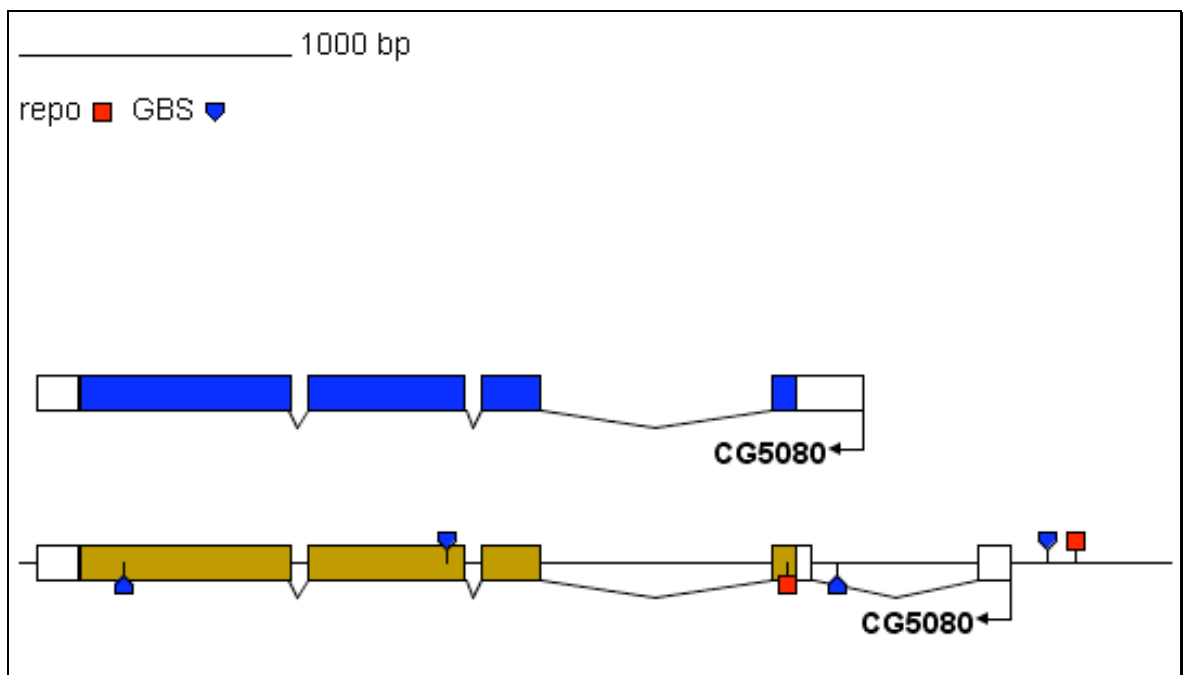


Abbildung 3.46 GBS-Suche im CG5080 Locus

Gezeigt wird ein ca. 4kb langer DNA-Abschnitt (Schwarze Linie) des CG5080 Locus. Dieses Gen besitzt 2 Transkriptvarianten. Exons sind als Rechtecke dargestellt, die codierende Region von CG5080 ist blau (Transkript A) bzw. braun unterlegt (Transkript B). GBS mit keiner bzw. nur einer Fehlpaarung zur Konsensus-Sequenz sind als blaue Raute eingezeichnet. Die Repo Bindestelle ist als rotes Rechteck dargestellt.

4. Diskussion

Die noch relativ junge Microarray-Technologie hat sich in einem Zeitraum von nur 10 Jahren zu einer Standardmethode der Untersuchung der Genexpression etabliert. Zahlreiche Veröffentlichungen belegen den erfolgreichen Einsatz von Microarray-Experimenten in den verschiedensten biologischen oder medizinischen Bereichen, die sich von Bakterien bis zum Menschen, von der Einzelzell-Analyse bis zum gesamten Individuum erstreckt. Rückblickend wurden viele Probleme der ersten Jahre der Microarray-Analyse offenbar, die die unterschiedlichen Labormethoden, die verschiedenen DNA-Chips und vor allem die Interpretation der riesigen Datenmengen betreffen. Beobachtete Diskrepanzen zwischen Microarray-Daten verschiedener Laboratorien und verwendeter DNA-Chips (Jordan, 2004; Tan *et al.*, 2003), führten zur Forderung von standardisierten Microarray-Analysen und einheitlichem Chip-Design. Diese Standardisierung sollte durch die Einführung des "MIAME Standard" (minimal information about a microarray experiment) und der "GEO" (Gene Expression Omnibus) Datenbank erreicht werden, in der Microarray-Daten in einem einheitlichen Konzept hinterlegt werden, um so für alle einen verständlichen Einblick in die Daten und ihre Interpretation zu bekommen. All diese Bemühungen führten zu deutlichen Verbesserungen der Microarray-Technologie und ihrer Vergleichbarkeit. Auch diese hier erläuterten Microarray-Experimente entsprechen dem "MIAME Standard" und sind unter der Bezeichnung GSE3257 in der "GEO" Datenbank einsehbar.

4.1. Die Microarray-Analyse

Ein entscheidender Abschnitt der Microarray-Analyse ist die Interpretation der großen Datenmengen. Ein wichtiger Ansatz im Vorfeld der Microarray-Analyse war die Bestimmung des methodischen und genetischen Hintergrundrauschens, wodurch eine Verminderung des Verhältnisfilters und somit eine höhere Sensitivität erzielt wurde. Hierdurch konnten Gene, wie z. B. das antagonistisch regulierte Gen CG2893 identifiziert werden, das nur in Stadium 16 in beiden Ansätzen eine schwache differentielle Regulation von +/- 1.65 zeigte. In der Regel wird ein Verhältnisfilter von 2facher differentieller Regulation verwendet. Dies stammt aus einer der ersten Microarray-Veröffentlichung und

wurde anschließend als allgemein gültig Grenze übernommen, obwohl diese Grenze nur für diese spezifische Microarray-Analyse gewählt worden war (DeRisi *et al.*, 1996). Hier wird deutlich, wie wichtig Qualitätskontrollen für eine leistungsstarke, aber auch fehleranfällige Methode, wie die Microarray-Technologie sind.

Es zeigte sich, daß einige Verbesserungen im experimentellen Aufbau dieses Microarray-Experimentes, wie z. B. der zeitliche Verlauf und die Analyse von GOF und LOF, Vorteile für die Auswertung der Daten brachten und sogenannte "falsch positive" Gene reduziert werden konnten. Von den mehr als 21.000 gespotteten Genen auf dem "FlyArray" waren im Vergleich der ektopischen Expression (GOF) und der *loss-of-function* Situation von *gcm* (LOF) mit dem Wildtyp insgesamt mehr als 2900 Gene differentiell reguliert. Der Versuch diese Daten mit einem statistischen Computerprogramm zu interpretieren (Genespring, Silicon Genetics), das speziell für die Analyse von Microarray-Daten konzipiert wurde, schlug fehl. Hierbei konnten keinerlei Parameter gefunden werden, die zur Bildung von Gengruppen mit vergleichbarem Regulationsprofil führten, welche sich in der späteren Verifizierung *in vivo* als Gruppen mit ähnlicher Expression (zeitlich oder auf zellulärer Ebene) zeigten. Weiterhin konnten vom Computer durchgeführte Filterschritte nicht eindeutig nachvollzogen werden und es fehlte die Überschaubarkeit aller Daten und ihre Verbindungen untereinander. Insgesamt entstand der Eindruck, daß eine statistische Analyse den biologischen Zielsetzungen des Experimentes nicht gerecht wurde. Aus diesem Grund wurden die Daten manuell gefiltert, wobei eine Konzentration auf den in der GOF hochregulierten und auf den in der LOF runterregulierten Genen lag. Das Sortieren aller differentiell regulierten Gene entlang der Zeitachse verschaffte einen übersichtlichen Einblick in die temporären Profile der potentiellen Zielgene und erlaubte ein manuelles Filtern, das zur gezielten *in vivo* Überprüfung von Kandidatengenen führte. Eine Negativ-Selektion, die Gene mit unverändertem Profil aus den Genlisten eliminierte, minimierte deutlich die Auswahl der in Frage kommenden Kandidaten. Die positive Selektion bestand sowohl aus einzelnen Schritten, als auch aus kombinierten Filterstufen, angefangen in der sehr stringenten Genliste (MinMax 0.5) bis zur MinMax 0.0 Liste. Die verschiedenen Filterschritte führten in beiden Ansätzen zur Bildung von Gengruppen, die ein ähnliches Regulationsprofil besitzen oder zu bestimmten Zeitpunkten differentiell reguliert waren. Als das wichtigste Filterkriterium stellte sich der Verlauf des Expressionsprofils in den untersuchten Stadien (Stadium 9-16 bzw. 10-16) heraus, das in mindestens zwei aneinandergrenzenden Stadien differentielle Regulation und in der GOF ein zu *gcm* vergleichbares bzw. zeitversetztes Expressionsprofil aufweisen mußte. Während in der LOF

die daraufhin positiv und negativ getesteten Gene in den Genlisten verteilt und ohne Schwerpunkte zu finden waren, zeichneten sich bei der GOF deutlich Anhäufungen von positiv getesteten Genen mit differentieller Regulation zu bestimmten Zeitpunkten und Verläufen ab. Eine solche Gruppenbildung fiel für Gene auf, die zum ersten Mal in den embryonalen Stadien 12 oder 13 differentiell reguliert waren, was sich in mindestens einem Stadium fortsetzte. Eine weitere Anhäufung wurde für Gene beobachtet, die nur in Stadium 16 differentiell hochreguliert waren. Durch diese „Gruppenbildung“ positiver Kandidaten in den Genlisten wurden weitere, bis dahin noch ungetestete Gene in die Analyse aufgenommen, die innerhalb dieser Gruppen lagen.

Die Analyse beider Ansätze im Einzelnen und der Vergleich zwischen den Profilen eines Genes in der GOF und LOF stellte einen weiteren Vorteil gegenüber den bereits veröffentlichten Analysen von Egger *et al.* und Freeman *et al.* dar. Hierdurch konnten neben Glia-spezifischen Genen auch Gene identifiziert werden, deren gliale Expression entweder durch neuronale Expression überdeckt wurden oder die vielleicht Co-Faktoren zur ektopischen Expression benötigen und daher in der GOF nicht ektopisch induziert werden konnten. Hierdurch zeigten diese Gene auf dem Microarray ein differentiell reguliertes Expressionsprofil in nur einem der beiden Ansätze.

Die unterschiedlichen, manuellen Filterschritte führten letztendlich zu einer Anzahl von ca. 400 potentiellen Kandidatengenen. Hieraus wurden insgesamt 74 Gene durch Informationen aus der *Drosophila* Datenbank Flybase bzw. der BDGP ISH-Datenbank und den zwei bereits veröffentlichten Microarray Screens von Egger *et al.* und Freeman *et al.* als gliale Gene bestätigt. Manche getesteten Kandidatengene wurden während der Microarray-Analyse in die Datenbanken aufgenommen. Besonders die schnell wachsende BDGP ISH-Datenbank, in der 47 der positiv getesteten Kandidaten aufgeführt sind, war von großer Hilfe. Zur Analyse der Expressionsmuster der unbekanntenen Gene standen mehr als 300 EST-Klone der BDGP-DGC zur Verfügung, von denen insgesamt 277 RNA-Sonden angefertigt wurden und ISH in wildtypischen, wie auch in ektopischen *gcm* Embryonen (*Mz1060::gcm*) und mutanten Embryonen (*gcm⁻/gcm⁻*) durchgeführt wurden. Für knapp die Hälfte aller wildtypischen ISH konnte kein spezifisches Ergebnis festgestellt werden. Hierbei bleibt unklar, ob es sich bei dem getesteten Gen möglicherweise doch um ein *gcm*-abhängiges Zielgen handelt, da vielleicht die Expression unterhalb der Detektionsgrenze liegt oder die Methode in einzelnen Fällen fehlerhaft war (z. B. Degradierung der Sonde). Aufgrund der großen Anzahl der zu untersuchenden Kandidatengene konnten diese Gene nicht im Rahmen dieser Arbeit untersucht werden.

Weitere Arbeiten werden zeigen, ob sich unter diesen Genen noch weitere Glia-spezifische Kandidaten befinden. Als spezifisch, negative Färbung wurden ISH mit Expression in *gcm*-unabhängigen Geweben wie dem Darm, den Tracheen oder der Epidermis festgehalten und konnte für etwa ein Fünftel aller getesteten Gene beobachtet werden. Das ungleiche Zahlenverhältnis an negativen ISH der GOF gegenüber der LOF (11:49) deutet an, daß die Auswahl potentieller Zielgene in der GOF scheinbar leichter fiel. Dies läßt sich durch das Expressionsprofil des Gal4-Treibers *Mz1060* erklären. Es wird erwartet, daß in der GOF direkte oder indirekte Zielgene ein ähnlich bzw. zeitlich verzögertes Regulationsprofil wie *gcm* zeigen, wonach die Genlisten manuell durchsucht wurden. In der LOF-Analyse hingegen werden potentielle gliale Gene zu unterschiedlichen Zeitpunkten runterreguliert erscheinen, wobei ein Verlaufsprofil über viele Entwicklungsstadien nicht unbedingt zu erwarten ist. Dies erschwerte die Auswahl an potentiellen Genen und führte zu einer höheren Anzahl an negativen ISH-Ergebnissen. Auch das in der LOF beobachtete Expressionsprofil von *gcm* konnte keine Hinweise geben, da nicht die initiale Transkription von *gcm* in dieser Funktionsverlust-Mutanten betroffen ist, sondern ein inaktives Gcm-Protein entsteht. Somit weist das Microarray-Profil fast keine differentielle Regulation auf. Lediglich in den Stadien 10 und 11 konnte eine schwache differentielle Regulation von *gcm* beobachtet werden, die durch die fehlende Autoregulation durch *gcm* selber erklärt werden kann, was zu einer verminderten Transkription im Gegensatz zum Wildtyp führt.

Ein positives ISH-Ergebnis konnte für mehr als 20% aller getesteten Gene festgehalten werden. Die spezifisch, positiven ISH Färbungen im ZNS werden in drei Kategorien unterteilt: Glia-spezifische Färbung (G), Expression in einzelnen Gliazellen und Neuronen (G, N) oder dem gesamten Nervensystem (ZNS). Alle drei Kategorien sind innerhalb der positiven ISH jeweils mit einer Anzahl von ca. 20 Kandidaten vertreten. Auffällig ist, daß nahezu alle positiv getesteten Antagonisten exklusiv in Gliazellen exprimiert werden. Weiterhin als spezifisch positiv werden ISH gewertet, die eine Expression in „tendon cells“ (T) oder in hämatopoetischen Zellen (H) zeigen, zu denen sowohl Kristall-Zellen als auch Makrophagen gehören. Die insgesamt 19 Gene, die in hämatopoetischen Zellen oder „tendon cells“ exprimierten werden, stammen fast ausschließlich aus den differentiell regulierten Genen der LOF. Dies läßt sich wiederum auf die ZNS-spezifische Gal4-Linie zurückführen, da sowohl die hämatopoetischen Zellen als auch die „tendon cells“ mesodermalen Ursprungs sind und der Gal4-Treiber für die GOF-Analyse in diesen Zellen nicht exprimiert wird. Dies deutet ebenfalls darauf hin, daß hämatopoetische oder "tendon

cell" spezifische *gcm*-Zielgene der drei unterschiedlichen Gewebe (ZNS, Blutzellen und "tendon cells") Kontext-abhängig reguliert werden. Folglich konnte *gcm* in diesen Zellen ektopisch nicht induziert werden und diese Gene nur durch eine Runterregulation gegenüber dem Wildtyp in der LOF gefunden werden.

Addiert man alle positiv getesteten ISH und alle aus der Literatur beschriebenen glialen Gene, für die keine Analyse durchgeführt wurde, erhält man insgesamt 123 positiv getestete oder bestätigte gliale Gene (37%).

4.2. Vergleich zu den bereits veröffentlichten Microarray-Analysen

Im Vergleich zu den bereits veröffentlichten Microarray-Analysen von Egger *et al.* (2002) und Freeman *et al.* (2003), die keine bzw. nur 12% der identifizierten Gene bestätigen konnten, ist der Prozentsatz von mehr als 30% positiv bestätigter *gcm*-Zielgene recht hoch. Dies weist daraufhin, daß der experimentelle Ansatz dieser Microarray-Analyse mit GOF und LOF, sowie die Datenanalyse anhand eines Zeitverlaufexperimentes, deutliche Vorteile zur Selektion potentieller Zielgene verschaffte. Der direkte Vergleich mit den Microarray-Experimenten von Egger *et al.* und Freeman *et al.* zeigte, daß sich innerhalb der getesteten ca. 400 Kandidaten nur ca. 25 Gene finden, die auch in den Ergebnissen der beiden Veröffentlichungen zu finden sind. Innerhalb aller differentiell regulierten Gene (ca. 2900) befinden sich insgesamt 39 Gene, die in einem der beiden Screens auch als *gcm*-abhängige Gene vermutet werden.

Die von Egger *et al.* publizierte Microarray-Analyse beruhte auf der ektopischen Expression von *gcm* mit dem *sca*-Gal4 Treiber und untersuchte die embryonalen Stadien 11 und 15/16. Von den ca. 14.000 Genen, die auf dem Oligonukleotid-Array vertreten waren, zeigten ca. 10% differentielle Regulation. Für all diese Gene wurde eine Beteiligung an den Prozessen der Gliogenese oder Neurogenese vermutet, aber keine Expression in Gliazellen oder eine Abhängigkeit von *Gcm in vivo* gezeigt. Der Vergleich mit unseren Microarray-Daten zeigt nur sehr geringe Überschneidungen. Von den 30 differentiell regulierten Genen, die in beiden Microarray-Experimenten zu finden sind, zeigten die Hälfte ein gegensätzliches Regulationsprofil im Bezug auf die Hoch- oder Runterregulation. Nur insgesamt drei Gene wurden auch durch unsere Filterkriterien erfaßt und positiv getestet (siehe Anhang Tab.7.2 und 7.3). Allerdings wären diese minimalen Übereinstimmungen auch bei zufällig ausgewählten Genen statistisch zu erwarten. Eine

Vergleichbarkeit von Microarray-Daten hängt entscheidend von den Gen-spezifischen Sequenzen auf dem DNA-Chip ab (Hoheisel, 2006). Daher könnte ein Grund der unterschiedlichen Ergebnisse die Verwendung verschiedener DNA-Chips sein.

Die zweite veröffentlichte Suche nach *gcm*-Zielgenen kombinierte eine Microarray-Analyse mit einer computergestützten Vorhersage für *gcm*-Bindestellen und einer Suche nach glialen Genen in der BDGP ISH-Datenbank (Freeman *et al.*, 2003). Die Microarray-Analyse stellte wiederum eine ektopische Expression von *gcm* dar, induziert durch den *sca*-Gal4-Treiber, jedoch wurde nur das Stadium 12/13 mit dem Wildtyp auf DNA-Chips miteinander verglichen, die 4386 spezifische *Drosophila* Gene enthielten. Insgesamt konnten durch diese dreifache Analyse 45 neue *gcm*-Zielgene identifiziert und *in vivo* bestätigt werden. Allerdings zeigten sich wenige Überschneidungen sowohl mit den Daten der ersten Microarray-Analyse, als auch zwischen den drei Ansätzen selber. Durch die GBS-Vorhersage und die Suche in der BDGP-Datenbank wurden insgesamt 35 Gene identifiziert, wovon jeweils 6 Gene innerhalb unserer gefilterten Genlisten vertreten sind und insgesamt 16 Gene (45%) eine differentielle Regulation in einem unserer Microarray-Experimente zeigten. Betrachtet man nur das Microarray-Experiment, so wurden insgesamt 153 Gene nach Stärke der differentiellen Regulation von Freeman *et al.* getestet, wovon lediglich 18 Gene Expression in Gliazellen zeigten und ihre Abhängigkeit von Gcm *in vivo* bestätigt wurde. Dies entspricht 12% aller getesteten Gene und die daraus resultierende hohe Anzahl an "falsch positiven" Genen (88%) wurde von Freeman *et al.* auch für die veröffentlichten Daten von Egger *et al.* vermutet.

Beide Autoren dieser bereits veröffentlichten Microarray-Analysen forderten daher eine Gcm *loss-of-function* Analyse zur Ergänzung des experimentellen Ansatzes und/oder die Verwendung von spezifischen Geweben (z. B. aufgereinigte Neurone vs. Glia), um eine Reduktion dieser "falsch positiven" Gene innerhalb der differentiell regulierten Gene zu erreichen. Egger *et al.* vermuteten, daß der Verlust von nur 35 Gliazellen pro Hemisegment, während 350 Neurone nicht betroffen sind, in einem Microarray-Experiment mit RNA-Präparation des gesamten Organismus keine meßbaren Veränderungen der differentiellen Regulation nach sich zieht. Unsere Daten belegen anhand mehrerer Beispielen (CG11910, CG8965, CG5080), daß die Isolierung und Aufreinigung von Zellpopulationen nicht zwingend nötig ist. Ein Beispiel hierfür ist CG11910, das lediglich in 9 Zellen pro Hemisegment, den longitudinalen Glia, exprimiert wird. Darüber hinaus konnte in der ISH gezeigt werden, daß CG11910 nur ein sehr schwaches Signal in den LG hervorrief, was auf eine vergleichbar schwache Expression

hinweist. Diese Expression fehlte in der *gcm* Funktionsverlustmutanten und rief auf dem Microarray eine deutliche 2fache differentielle Regulation hervor. Es zeigte sich, daß das auf dem Microarray beobachtete Regulationsprofil vollständig mit dem Expressionsmuster *in vivo* übereinstimmte.

4.3. *gcm*-Zielgene

Insgesamt konnten 44 neue Gene identifiziert werden, die bisher nicht als gliale Gene beschrieben worden sind. Hierbei konnten erstmals gliale Gene durch eine *loss-of-function* Analyse von *gcm* entdeckt werden. Zusätzlich konnten durch diesen Ansatz "tendon cell" spezifische Gene und in hämatopoetischen Zellen exprimierte Gene entdeckt werden. Überraschenderweise waren nur wenig Gene auf dem Microarray antagonistisch reguliert. Vielmehr konnten die meisten dieser neuen *gcm*-Zielgene in nur einem der beiden Ansätze als differentielle reguliert identifiziert werden. Dies wurde durch ISH in *gcm* Überexpressions- und Funktionsverlustmutanten überprüft und die Expressionsmuster mit dem Microarray-Profil verglichen. Die meisten Gene zeigten in dem mutanten Hintergrund, in dem sie auf dem Microarray differentiell reguliert waren, ein übereinstimmendes Expressionsmuster. Viele positiv getesteten Kandidatengene der GOF waren im gesamten ZNS oder in einzelnen Gliazellen und Neuronen exprimiert. Diese Gene zeigten eine Verstärkung der Expression durch die ektopische Induktion von *gcm*, aber keine deutliche Verminderung in *gcm*-Funktionsverlustmutanten. Durch die neuronale Expression wurde die fehlende Glia-spezifische Runterregulation in der LOF überdeckt und so konnten solche Gene nur in der GOF-Analyse identifiziert werden. Auf der anderen Seite konnte durch die zelluläre Analyse gezeigt werden, daß die spezifisch in longitudinalen Glia exprimierten Gene CG11910 und CG8965 keine Expressionsverstärkung in Embryonen zeigten, in denen *gcm* ektopisch induziert wurde. Folglich konnten CG11910 und CG8965 nur im LOF-Ansatz differentiell reguliert erscheinen und wurden daher z. B. auch nicht in den beiden Microarray-Analysen von Egger *et al.* (2002) oder Freeman *et al.* (2003) identifiziert. Alle übrigen Gene, die spezifische Expression in glialen Subtypen zeigten, konnten in *gcm* Überexpressionsmutanten ektopisch induziert werden.

Alle antagonistisch regulierten Gene, die ein positives ISH-Ergebnis zeigten, waren in mehreren Subtypen exprimiert und zeigten entsprechend ihrem Microarray-Profil das gewünschte Expressionsmuster in beiden mutanten Hintergründen. Allerdings zeigten einige LOF-Kandidaten keine differentielle Regulation in dem GOF-Ansatz, obwohl eine

verstärkte Expression in Überexpressionsmutanten *in vivo* nachgewiesen werden konnte (CG16876, CG9338). Diese Beobachtungen können nicht erklärt werden. Sie unterstreichen jedoch wie wichtig die Analyse beider Ansätze, der GOF und der LOF, und die anschließende Verifizierung von Microarray-Daten *in vivo* ist.

Neben den neu identifizierten glialen Genen tauchten auch einige bereits beschriebene Gene auf. Dies gilt jedoch nicht für die bekannten direkten *gcm*-Zielgene *repo* und *pnt*, die in keinem der beiden Ansätze eine differentielle Regulation zeigten. Lediglich *ttk* zeigte eine schwache Runterregulation in Stadium 11 in der LOF. Dies wurde auch bei den Microarray-Experimenten von Egger *et al.* und Freeman *et al.* beschrieben, in denen keine Hochregulation dieser *gcm* Zielgene erfolgte und sogar ein gegensätzliches Regulationsprofil für *ttk* beobachtet wurden. Die fehlende differentielle Regulation von *pnt* und *ttk* kann durch alternative Splicevarianten erklärt werden, die eine Expression in Neuronen oder anderen Zellen zeigen. Die auf dem Microarray enthaltenen spezifischen Gensequenzen für *pnt* und *ttk* repräsentieren jeweils ein Exon (Exon 7 und 5, Daten nicht gezeigt), das in allen Splicevarianten vorhanden ist. Daher wird die Glia-spezifische Expression durch die Expression in den anderen Zellen überdeckt und so konnte keine oder nur schwache differentielle Expression beobachtet werden. Eine solche Erklärung kann nicht für *repo* herangezogen werden, da *repo* ausschließlich in allen lateralen Gliazellen exprimiert wird. Die Regulationsprofile von *repo* in der GOF und der LOF zeigten keinerlei differentielle Regulation in allen untersuchten Stadien. Jedoch zeigte sich, daß *repo* sehr stark sowohl in der GOF als auch in der LOF exprimiert wurde und sogar schon vor der Expression von *gcm* detektiert werden konnte. Die mittels einer Antikörperfärbung gegen Repo durchgeführte Überprüfung der Embryonen, aus denen die RNA für beide Experimente extrahiert wurde, steht in direktem Gegensatz zu diesen Beobachtungen. Die Sequenzierung des auf dem Microarray enthaltenen PCR-Produktes belegte jedoch eindeutig, daß es sich wie gewünscht um das Exon 1 des *repo* Gens handelt (Daten nicht gezeigt). Daher wird eine unspezifische Kreuzreaktion einer anderen cDNA mit dem *repo* PCR-Produkt vermutet. Auch dies ist eine Fehlerquelle, die in der Microarray-Technologie berücksichtigt werden muß.

Neben einer Analyse zur Identifizierung Glia-spezifischer Gene, können die vorliegenden Daten ebenfalls zur Beschreibung neuronaler Gene herangezogen werden. Dies bestätigt sich durch bereits in Kapitel 3.1.9 (Seite 78) vorgestellten Gene CG11849 und *fne*. Diese zwei Kandidaten zeigten auf dem Microarray eine Runterregulation in der GOF und eine gleichzeitige Hochregulation in der LOF, also genau gegensätzlich zu Glia-spezifischer

Regulation. Auf weitere Suche nach ähnlich regulierten Genen in einem oder beiden Ansätzen wurde verzichtet, da die Identifizierung glialer Gene im Mittelpunkt dieser Arbeit stand.

4.4. Funktionelle Annotierung der neuen glialen Gene

Eine Übersicht der funktionellen Kategorisierung entsprechend der vorhergesagten oder bestätigten Funktion von FlyBase (GO-Annotierung) wird in Kapitel 3.1.11 gezeigt. Die Gruppe der Gene, die am Prozeß der Signaltransduktion beteiligt ist, stellt ca. 10% aller getesteten Gene mit positivem oder unspezifischem Ergebnis dar. Dies stellt eine 2,5fache Anreicherung gegenüber dem gesamten Genom von *Drosophila* mit nur 4% dar (Freeman *et al.*, 2003). Ähnliche Ergebnisse konnten auch von Freeman *et al.* beobachtet werden. Innerhalb der zellulär charakterisierten Kandidatengene finden sich 2 Gene, CG4322 (*moody*) und CG11910, die in diese Gruppe eingeordnet werden können, da beide für ein G-Protein gekoppeltes Rezeptor-Molekül kodieren. Sie weisen ein unterschiedliches Regulationsprofil auf und werden in verschiedenen glialen Subtypen exprimiert. *moody* wurde in einem weiteren Genom-weiten Microarray-Experiment identifiziert, das die verschiedenen Genexpressionen zwischen Neuronen und Gliazellen untersucht (Bainton *et al.*, 2005; Schwabe *et al.*, 2005). Schon früher wurde eine Beteiligung von G-Protein gekoppelten Rezeptoren für die gliale Zelldifferenzierung und den Aufbau der Blut-Hirn-Schranke vermutet (Granderath *et al.*, 1999). Schwabe *et al.* konnten insgesamt 4 Proteine nachweisen, den G-Protein-gekoppelten Rezeptor (GPCR) *Moody*, die G-Protein-Untereinheiten *Gai* und *Gao*, sowie der G-Protein Signal-Regulator *Loco*, die gemeinsam in subperineurial Glia exprimiert werden. Dieser gliale Zelltyp sorgt für eine ausreichende Isolierung des Gehirns. Dabei regulieren die genannten Proteine vermutlich in einem gemeinsamen Signalweg das Aktincytoskelett und stabilisieren so die langen Fortsätze der Gliazellen. Dadurch können die SPG untereinander enge Verbindungen über sogenannte "septate junctions" ausbilden, die das Nervensystem vor der Hämolymphe abdichten (Schwabe *et al.*, 2005) erfolgt. In *Drosophila* wird die Bildung dieser "septate junctions" u. a. durch die Gene *sinuous* und *neurexin* reguliert (Baumgartner *et al.*, 1996; Wu *et al.*, 2004). Beide Gene sind in unserem Microarray-Experiment differentiell reguliert, wurden jedoch nicht durch die beschriebenen Filterschritte identifiziert. Dies zeigt, daß eine erneute Durchsicht aller differentiell regulierten Gene unter dem Aspekt der funktionellen Kategorisierung weitere Glia-spezifische Kandidaten aufdecken könnte.

Die für CG11910 annotierte Funktion in der Signaltransduktion könnte auf eine Zell-Zell Interaktion dieses Genes mit den Neuronen der axonalen Trakte hinweisen. In diesem Zusammenhang konnten bereits mehrere Komponenten in Neuronen und Gliazellen identifiziert werden, die das Wachstum der Axone mit der Proliferation der LG verbindet (Griffiths und Hidalgo, 2004). Hierbei wird im glialen Vorläufer durch den Transkriptionsfaktor Prospero das mitotische Potential zur Zellteilung erhalten. Prospero reguliert hierbei durch *CycE* die Zellproliferation, wodurch die korrekte Anzahl an LG im Verhältnis zu wachsenden oder vorhandenen Axonen flexibel reguliert werden kann. Das von Pionier-Neuronen produzierte Neuregulin Vein aktiviert in den LG mit der höchsten Prospero-Expression den MAPKinase Signaltransduktionsweg. CG11910 könnte eine Komponente dieses Signaltransduktionsweges in LG darstellen. Hierfür spricht die in Stadium 14 beginnende Expression von CG11910, die mit der einsetzenden Proliferation der LG in Stadium 14 korreliert.

Eine weitere funktionelle Gruppe, die häufig unter den Kandidatengenen vertreten ist, sind Transporter-Proteine. Auch diese Gruppe zeigte eine auf das gesamte Genom bezogene Anhäufung. Solche Transporter regulieren u. a. den Austausch von Natrium- und Kaliumionen, wodurch unter anderem die Homöostase in der Umgebung von Synapsen und Axonen reguliert werden kann. Eine solche funktionelle Aufgabe ist für Vertebraten-Glia allgemein bekannt. Typ1 Synapsen der *Drosophila* "neuromuscular junction" (NMJ) benutzen, wie auch die meisten Synapsen im Säugerhirn, L-Glutamat als exzitatorischen Neurotransmitter. Dieser Neurotransmitter wird durch spezifische Proteine, die exzitatorischen Aminosäuren-Transporter (EAAT), abgebaut und recycelt. In *Drosophila* sind bisher zwei solcher Transporter (dEAAT1 und dEAAT2) identifiziert worden (Soustelle *et al.*, 2002). Beide Gene werden hauptsächlich in Gliazellen in späten embryonalen Stadien exprimiert, wobei die Expression von dEAAT1 deutlich stärker ist und in nahezu allen Gliazellen detektiert werden konnte. Für dEAAT1 konnte kürzlich gezeigt werden, daß es auch in der adulten Fliege in Gliazellen nahe der NMJ exprimiert wird und für die Aktivität der NMJ benötigt wird (Rival *et al.*, 2006). Keines der beiden Gene zeigte in den Microarray-Daten eine differentielle Regulation, obwohl *in vivo* eine Verstärkung bzw. eine Verminderung der Expression beider Gene in *gcm* Überexpressions- oder mutanten Embryonen dokumentiert worden war (Soustelle *et al.*, 2002). Dies könnte mit dem späten Zeitpunkt der Genexpression in Stadium 16 erklärt werden. Das Zeitverlaufsexperiment der GOF als auch der LOF endet in Stadium früh 16, so daß zu diesem Zeitpunkt noch keine differentielle Regulation beider Gene festgestellt

werden könnte. Die meisten der hier identifizierten Transporter-Gene sind noch nicht näher funktionell charakterisiert worden. Hier könnte eine Suche nach homologen Genen, entsprechend der gezeigten, verwandten Funktion zu Vertebraten-Glia, weitere Hinweise auf die Funktion liefern.

Eine Zielsetzung dieses Microarray-Experimentes behandelte eine mögliche Gruppierung von glialen Genen entsprechend ihres temporalen Expressionsprofils, das mit ihrer Subtypspezifischen Expression und /oder Funktion korrelieren könnte. Tendenzen, die diese Zusammenhänge bestätigen könnten, konnten nicht beobachtet werden. Die vielfältigen Funktionen der verschiedenen glialen Subtypen zu unterschiedlichen Zeitpunkten der Embryogenese stellen eine solche Korrelation in Frage. Zwar sprechen viele Parallelen zwischen LG und PG dafür, daß vergleichbare Mechanismen die Migration und die Proliferation dieser glialer Subtypen steuert und beide Glia-Typen ähnliche Funktionen erfüllen, allerdings konnten hier solche Verbindungen nicht mit Hilfe unseres Microarray-Experimentes aufgedeckt werden. Hierfür spricht neben den unterschiedlichen Zeitpunkten, in denen die vergleichbaren Funktionen ausgeführt werden, auch die Expression in unterschiedlichen Subtypen. Während z. B. die LG in Stadium 11 in Richtung Mittellinie migrieren und dort nach Kontakt mit den axonalen Projektionen in Stadium 14 mehrere Zellteilungen durchlaufen (Halter *et al.*, 1995), teilen sich PG schon in Stadium spät 12 und wandern erst ab Stadium 13/14 in die Peripherie aus. Es konnte jedoch in beiden Fällen eine Beteiligung des Neuregulin Vein nachgewiesen werden, das vom jeweiligen Pioneer-Neuron exprimiert wird und den MAPKinase Signalweg in Gliazellen aktiviert (Griffiths und Hidalgo, 2004; Parker und Auld, 2004). Somit könnten unbekannte gliale Gene, die bspw. zum MAPKinase Signalweg gehören, lediglich über dieselbe funktionelle Kategorie identifiziert werden, jedoch nicht über ihr temporales Expressionsprofil oder ihr zelluläres Expressionsmuster. Dies unterstreicht ein Filtern der differentiell regulierten Gene nach funktionellen Gesichtspunkten.

4.5. Analyse ausgewählter Kandidatengene

Für eine erste Charakterisierung der identifizierten *gcm*-Zielgene wurde eine grobe Bestimmung des Expressionsmusters durchgeführt. Hierfür wurden die Gene unter zwei Gesichtspunkten betrachtet. Zum einen der Beginn der Expression und zum anderen in welchen Zellen das jeweilige Gen exprimiert wird. Die meisten der identifizierten Gene konnten erstmals in den Stadien 12/13 detektiert werden. Anhand von ISH an "whole-

mount"-Präparaten wurden alle getesteten Gene in die bereits vorgestellten Kategorien, unspezifisch, spezifisch negativ und spezifisch positiv eingeordnet. Da in der Kategorie spezifisch positiv, die als ubiquitär im ZNS exprimierten Gene nicht durch Antikörperfärbungen gegen gliale oder neuronale Markergene überprüft wurden, ist ungewiß, ob diese Gene in allen Gliazellen oder nur in spezifischen Subtypen exprimiert werden.

Im zeitlichen Rahmen dieser Arbeit konnten insgesamt 12 positiv getestete Kandidatengene auf Einzelzellebene charakterisiert werden, die aus gleichen Teilen aus der GOF und LOF stammen bzw. antagonistisch reguliert waren. Es konnten Gene identifiziert werden, die in nahezu allen lateralen Gliazellen (CG4322), in nur wenigen glialen Subtypen (CG9336, CG7433) oder Subtyp-spezifisch exprimiert werden (CG11910, CG5080). Überraschenderweise konnte kein weiteres Gen gefunden werden, daß wie *gcm* oder *repo* in allen lateralen Gliazellen exprimiert wird. Dies könnte ein Hinweis darauf sein, daß die Induktion des glialen Schicksals in allen lateralen Glia durch *gcm* und die Aufrechterhaltung dieses Schicksals durch *repo*, möglicherweise verbunden mit einer Induktion der glialen Differenzierung, ausreichend ist. Verständlicherweise würden unter dieser Voraussetzung keine weiteren pan-glialen Gene zur Spezifizierung der glialen Subtypen benötigt werden.

Alle untersuchten Kandidatengene zeigten entweder eine ektopische Expression in *Mz1060::gcm* Embryonen und/oder keine Expression in *gcm* Funktionsverlustmutanten, was auf eine Regulation durch *gcm* hinweist. Gene, die schon in den frühen Stadien 11/12 exprimiert werden, wie z. B. CG4322, könnten sich als direkte Zielgene von *gcm* herausstellen. Ein Hinweis auf eine direkte Regulation für CG4322 sind die im Promoter/Enhancerbereich gefundenen vier GBS (siehe Abb.3.44, Seite 114), durch die *gcm* dieses Gen direkt aktivieren könnte. Da keine Veränderung der normalen Expression von CG4322 in den Einzelmutanten von *repo*, *pnt* oder *ttk* oder der Doppelmutanten *repo*, *pnt* gefunden wurde, läßt sich eine Regulation durch diese glialen Gene ausschließen. Bei später exprimierten Genen (Stadium 15/16) ist eine Kooperation von *gcm* mit weiteren glialen Faktoren denkbar, da *gcm* nur transient exprimiert wird. Eine direkte Regulation durch die bekannten glialen Gene *repo*, *pnt* oder *ttk* kann, mit Ausnahme von CG5080, ausgeschlossen werden, da keines der untersuchten Gene in einer dieser Einzelmutanten eine Veränderung der Expression zeigte. Es ist jedoch notwendig, die Expression der Gene in allen hergestellten Doppel- und vor allem der Tripelmutanten zu überprüfen, da eine Kooperation dieser Faktoren möglich ist (Yuasa *et al.*, 2003). Für CG5080 läßt sich eine

Regulation durch *gcm* und *repo* vermuten, da für beide Bindestellen im Promoter/Enhancerbereich gefunden wurden.

Es wird allgemein angenommen, daß *gcm* zur Aktivierung von Zielgenen sowohl Kontext-abhängige als auch temporale Co-Faktoren benötigt (zusammengefaßt in Jones, 2005). Dies bestätigt sich auch durch die hier präsentierten Daten zur regulatorischen Analyse einiger Kandidatengene. Alle in späten Stadien exprimierten Kandidaten der GOF zeigten in ISH in *gcm* Überexpressionsmutanten eine Auffälligkeit. Keines der analysierten Gene konnte vor ihrer herkömmlichen Expression in *gcm* Überexpressionsembryonen ektopisch induziert werden. Dies zeigte sich in der GOF beispielsweise an CG3168, das im *wt* erst in Stadium spät 14 detektiert werden konnte und seine maximale Expression in Stadium 16 zeigte. ISH an *Mz1060::gcm* Embryonen zeigten erste Hinweise auf eine ektopische Signalverstärkung erst in Stadium 15 (Daten nicht gezeigt). Dies steht im Gegensatz zu früher exprimierten Genen, die durch die Gal4-Triebelinie *Mz1060* schon ab dem Stadium 12 deutliche Signalverstärkung zeigen. Demnach ist für diese später exprimierten Gene *gcm* nicht ausreichend, um Expression in früheren Stadien zu induzieren, sondern benötigt weitere Faktoren, die erst zu einem späteren Zeitpunkt exprimiert werden. Dies weist auf eine Abhängigkeit von temporalen Co-Faktoren hin, die durch vergleichbare Ergebnisse von Freeman *et al.* bestätigt wird.

In der LOF-Analyse konnte ein Gen (CG16876) identifiziert werden, daß in zwei *gcm*-abhängigen Zelltypen exprimiert wird, den Gliazellen und hämatopoetischen Zellen. Es ist bekannt, daß *gcm* zusammen mit *gcm2* neben der Induktion des glialen Schicksals eine redundante Rolle in der Entwicklung von Makrophagen spielen und das *gcm/gcm2* Doppelmutanten (Def(2L)200) eine Verminderung und abnorme Entwicklung dieser migrierenden Blutzellen zeigen (Alfonso und Jones, 2002). Es ist jedoch nicht bekannt, wie Gcm Zielgene in der glialen Linie, jedoch nicht in der hämatopoetischen Linie oder den "tendon cells" aktiviert. Im Falle von CG16876 konnte beobachtet werden, daß in *gcm* Funktionsverlustmutanten die gliale Expression nicht mehr detektiert werden kann, aber weiterhin die Expression in migrierenden Makrophagen sichtbar ist. Daher wurde eine ISH in der *gcm/gcm2* Doppelmutante durchgeführt. Hier konnte neben der fehlenden glialen Expression jedoch keine Verminderung der Expression in Makrophagen beobachtet werden. Dies deutet daraufhin, daß dieses Gen möglicherweise nicht ausschließlich durch die beiden *gcm*-Gene in den Makrophagen reguliert wird. Durch die computergestützte Suche nach GBS konnten auch Freeman *et al.* insgesamt 5 Gene identifizieren, die in Makrophagen und Gliazellen exprimiert werden. Alle zeigten in der *gcm* Einzelmutante ein

vergleichbares Ergebnis zu CG16876, jedoch fehlte sowohl die gliale Expression als auch die Expression in Makrophagen in der *gcm/gcm2* Funktionsverlustmutanten. Hiermit handelt es sich um Gene, die vermutlich durch beide *gcm* Gene direkt reguliert werden. Eine Erklärung dieser unterschiedlichen Beobachtungen im Falle von CG16876 im Vergleich zu den von Freeman *et al.* entdeckten Genen könnte die *cis*-regulatorische Analyse des *gcm* Locus liefern. Es konnten zwei verschiedene Elemente identifiziert werden, die eine Expression von *gcm* in frühen und späten Plasmatozyten, sowie migrierenden Makrophagen reguliert (Jones *et al.*, 2004). Demnach könnten *gcm* und *gcm2* die Aktivierung von Genen, wie *draper* oder *akap200*, in Gliazellen und Makrophagen regulieren, während sie die Expression anderer Gene, wie CG16876, lediglich in Gliazellen regulieren.

Eine Subtyp-spezifische Regulation bzw. eine Zellstammbaum-spezifische Expression, für die es durch die bisherigen Analysen nur wenige Anzeichen gibt, konnte sich nur einem Fall nachweisen lassen. Das Gen CG11910 wird ausschließlich in longitudinalen Glia exprimiert, die vom LGB stammen. Allerdings stellt der LGB unter allen NBs bzw. NGBs eine Sonderrolle dar, da er möglicherweise nicht mehr im ventralen (neurogenen), sondern im dorsalen Ektoderm liegt (Aussage von J. Urban). Dies läßt auf eine spezifische Regulation des LGB schließen, die sich von den übrigen NBs unterscheidet.

4.6. Spezifizierung von Gliazellen

Die Identifizierung und funktionelle Charakterisierung bekannter und neuer glialer Gene offenbart eine wachsende Anzahl an Mechanismen, in denen Gliazellen eine entscheidende Rolle spielen. Hierbei erfüllen die unterschiedlichen glialen Subtypen aufgrund ihrer Position und Morphologie verschiedene Aufgaben, die für die Entstehung des Nervensystems entscheidend sind. Ungeklärt ist jedoch, durch welche Mechanismen gliale Spezifizierung entsteht. Die pan-gliale Expression von *gcm*, *repo* und *loco* schließt aus, daß diese Faktoren die Spezifizierung glialer Subtypen reguliert. Ebenso ist es unwahrscheinlich, daß die morphologische und positionelle Klassifizierung der Gliazellen eine einfache genetische Grundlage besitzt, in der die Expression eines spezifischen Gens die Differenzierung eines glialen Subtyps einleitet. Fast alle der bisher identifizierten Gene werden in mehreren Subtypen und in Gliazellen exprimiert, die aus unterschiedlichen NGBs stammen. In den letzten Jahren entstand ein Bild zur glialen Spezifizierung, in dem *gcm* im Mittelpunkt steht und durch die Aktivierung und Kooperation mit direkten und

indirekten Zielgenen, sowie mit Kontext-abhängigen und temporalen Co-Faktoren gliales Schicksal und Differenzierung reguliert. Es konnten bereits zwei Teilungsmodi der NGB beschrieben werden, die die asymmetrische Verteilung von *gcm* als gemeinsames Hauptmerkmal aufweisen. Ein sogenannter Typ I NGB wurde anhand des thorakalen NGB6-4t gezeigt (Akiyama-Oda *et al.*, 1999; Akiyama-Oda *et al.*, 2000; Bernardoni *et al.*, 1999). Hier wird *gcm* bereits im NGB asymmetrisch verteilt und bei der Teilung des NGB in den entstehenden GB weitergegeben. Dieser GB bringt typischerweise nur Gliazellen hervor, während der entstandene NB nur Neurone produziert.

Ein Beispiel für einen Typ II NGB ist der NGB1-1a, durch den auch ein möglicher Weg der glialen Spezifizierung für SPG beschrieben wurde (Udolph *et al.*, 2001). Dieser NGB bringt insgesamt 6-8 Neurone und drei Gliazellen hervor, die A-SPG, B-SPG und LV-SPG. Während durch die Teilung der ersten GMZ nur Neurone entstehen (aCC und pCC), werden aus den folgenden 3 GMZ durch asymmetrische Zellteilungen Neurone und Gliazellen als direkte Geschwisterzellen gebildet. Es wird vermutet, daß in diesem Kontext *gcm* durch Notch positiv reguliert wird und das weiterhin das terminale Lücken-Gen *huckebein (hkb)* für die gliale Entwicklung benötigt wird (Bossing *et al.*, 1996). De Iaco *et al.* konnten erst kürzlich zeigen, daß Gcm direkt mit Hkb kooperiert. Hier fungiert Hkb nicht als Transkriptionsfaktor, sondern reguliert durch Protein-Interaktion mit Gcm die Autoregulation von *gcm* (De Iaco *et al.*, 2006). Es wurde bereits vorher vermutet, daß die Autoregulation von *gcm in vivo* Co-Faktoren benötigt (Miller *et al.*, 1998). Dies wird unterstützt durch die Entdeckung eines cis-regulatorischen Elementes im *gcm* Locus, der die Expression in den NGB1-1a, 2-2t und 1-3 reguliert. All diese Beispiele belegen, daß die Regulation von *gcm* zum einen, sowie die Kooperation von Gcm mit Kontext-abhängigen und/oder temporalen Co-Faktoren die Entstehung und Spezifizierung von Gliazellen regulieren.

Diese Untersuchungen deuten viele Parallelen zur Spezifizierung der Neurone an, die durch die räumliche Expression von Musterbildungsgenen entlang der A/P und D/V Achse, sowie eine temporale Achse spezifiziert werden. Gliazellen könnten somit auch durch die Position und die differentielle Genexpression des NGB, aus dem sie entstehen, determiniert werden.

4.7. Weiterführende Analysen und Experimente

Die riesigen Datenmengen, die ein solches Microarray-Experiment produziert, können unter vielfachen Gesichtspunkten analysiert und bearbeitet werden. Die hier präsentierten variablen Filterschritte führten zu einer deutliche Anreicherung an *gcm*-abhängigen Zielgenen. Diese Filterschritte konzentrierten sich hauptsächlich auf das temporale Regulationsprofil der potentiellen Kandidatengene und stellen eine Möglichkeit dar, diese Daten erfolgreich zu bearbeiten. Die Suche nach funktionell verwandten Genen oder Komponenten, die gemeinsam an einem Prozeß beteiligt sind, verweist auf einen weiteren Ansatz, unter dem die differentiell regulierten Gene betrachtet werden können. Dies deutete sich schon durch die Identifizierung mehrerer G-Protein gekoppelter Rezeptoren an, die vermutlich am Aufbau der Blut-Hirn-Schranke beteiligt sind und die auf weitere Gene, wie *neurexin*, aufmerksam machten. Ebenso könnten die Daten unter dem Aspekt der Identifizierung neuronaler Gene betrachtet werden, der in dieser Analyse vernachlässigt wurde.

Die Wahl der Gal4-Linie *Mz1060* brachte gegenüber dem von Egger *et al.* und Freeman *et al.* verwendeten *sca*-Gal4 den Vorteil, daß die ektopische Expression von *gcm* gezielt nur im ZNS und in einem vergleichbaren Zeitfenster wie das endogene *gcm* induziert wurde. Hierdurch wurden künstliche Nebeneffekte außerhalb des ZNS vermieden, die schon bei der ektopischen Expression von *gcm* durch *sca*-Gal4 berichtet wurden (Akiyama-Oda *et al.*, 1998). Dennoch zeigte sich im Falle der longitudinalen Glia eine Besonderheit, die möglicherweise durch den Gal4-Treiber *Mz1060* hervorgerufen wurde. Um einen Hinweis darauf zu bekommen, ob die fehlende ektopische Induktion von LG in *Mz1060::gcm* Embryonen durch den Gal4-Treiber bedingt ist, sollte die ektopische Expression von *gcm* mit einer anderen Gal4-Linie wiederholt werden. Konfokale LSM-Aufnahmen zeigten, daß *Mz1060* nicht in den dorsalen Ebenen des Neuroektoderm exprimiert wird, in denen der LGB positioniert ist. Wenn *gcm* zur Aktivierung longitudinal-spezifischer Gene räumliche Co-Faktoren benötigt, die in der Nähe des LGB sehr weit dorsal im vNR oder im dorsalen Ektoderm liegen, könnte in diesen Zellen CG11910 nicht ektopisch induziert worden sein. Als Treiberlinie bietet sich hierfür "*scabrous*-Gal4" an, da sie im gesamten Neuroektoderm exprimiert wird. In diesem Hintergrund (*sca::gcm*) könnten dann die ISH der Gene CG11910, CG7433 und CG8965 wiederholt und ausgewertet werden. Die Identifizierung solcher Co-Faktoren, die sowohl räumlich als auch zeitlich mit Gcm und/oder Repo

subtyp-spezifische Identität der Gliazellen vermitteln, stellt einen wichtigen Aspekt bei der Aufklärung der molekularen Spezifizierung der Gliazellen dar.

Des Weiteren steht die Charakterisierung der neuen glialen Gene im Mittelpunkt zukünftiger Arbeiten. Zusätzlich zu den bereits zellulär charakterisierten Genen werden weitere Glia-spezifische und in einzelnen Glia und Neuronen exprimierte Gene untersucht, um letztendlich eine Gliakarte in Anlehnung an die Neuroblastenkarte (Abb.1.3) zu erstellen, in denen die Expressionskombinatorik jeder einzelnen Gliazelle dargestellt wird. Dies könnte ebenfalls zur Klärung der Subtypen-Spezifizierung beitragen. Ebenso wird die regulatorische Analyse weiterer Gene in den Einzelmutanten bekannter glialer Gene fortgesetzt. Um die hier dargestellte regulatorische Analyse der zwölf untersuchten Gene abzuschließen, werden ISH in der nun zur Verfügung stehenden Doppelmutanten für *repo* und *ttk* und vor allem in der Tripelmutanten durchgeführt.

Ein weiterer Schritt zur funktionellen Analyse der neuen glialen Gene stellt die Mutantenanalyse dar. Im Laufe der Arbeit konnten defiziente Fliegenstämme, in denen u. a. die identifizierten Gene betroffen sind, bestellt und erste Untersuchungen durchgeführt werden. Anhand von Antikörperfärbung gegen Repo und Fasziklin 2, das in allen Axonen exprimiert wird, konnten in den Mutanten Unregelmäßigkeiten im glialen Expressionsmuster und Beeinträchtigungen des axonalen Netzwerkes sichtbar gemacht werden. Da aber in diesen defizienten Fliegenstämmen mehrere Gene deletiert sind, konnten beobachtete Phänotypen nicht eindeutig zugeordnet werden. Durch die Technik der gezielten homologen Rekombination könnten nun Einzelmutanten der Kandidatengene hergestellt werden (Oberstein *et al.*, 2005; Rong und Golic, 2000; Wimmer, 2005). Hier beobachtete gliale Phänotypen lassen sich eindeutig auf das deletierte Gen zurückführen. Die Herstellung eines Überexpressionsvektors komplementiert den dualen Ansatz einer funktionellen Analyse, die typischerweise eine *loss-of-function* und *gain-of-function* Analyse beinhaltet.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, daß mit den bereits publizierten und den in dieser Microarray-Analyse neu identifizierten Genen eine große Anzahl an Glia-spezifischen Genen beschrieben ist, deren detaillierte Charakterisierung die molekularen Grundlagen glialer Spezifizierung und Funktionen in *Drosophila* weiter ermöglichen wird.

5. Zusammenfassung

Im embryonalen Nervensystem von *Drosophila* wird gliales Schicksal durch den Transkriptionsfaktor *gcm* induziert. Es konnte gezeigt werden, daß die ektopische Expression von *gcm* im Nervensystem einen Überschuß an Gliazellen generiert, während Funktionsverlustmutanten von *gcm* nahezu keine Gliazellen mehr besitzen. Im Gegensatz zu der beschriebenen Funktion von *gcm* als binäres Schaltergen zwischen neuronalem und glialem Schicksal, gibt es nur wenig Hinweise auf Mechanismen zur weiteren Spezifizierung und Differenzierung der verschiedenen glialen Subtypen und den daran beteiligten Genen. Die vorliegende Arbeit beschreibt die auf Microarray-Experimenten basierende Genom-weite Suche nach neuen *gcm*-abhängigen glialen Genen.

Diese Analyse vergleicht die ektopische Expression von *gcm* im gesamten Nervensystem und zum ersten Mal die *gcm* Funktionsverlustmutante mit dem Wildtyp. Beide Ansätze wurden als Zeitverlaufsexperimente durchgeführt, die den Zeitraum der Gliogenese in *Drosophila* umfassen. Im Vorfeld durchgeführte Kontrollexperimente ermöglichten die Bestimmung des methodischen und genetischen Hintergrundrauschens, die eine Reduktion von "falsch positiven" Genen ermöglichte und die Sensitivität der Microarray-Auswertung erhöhte. Durch manuelle Filterschritte wurde der Schwerpunkt der Daten-Interpretation eher auf biologische Aspekte als auf eine rein statistische Auswertung gelegt und dies brachte deutlich Vorteile in der Auswahl der potentiellen Zielgene. Insbesondere die Analyse der temporalen Expressionsprofile, der Vergleich der antagonistischen Ansätze sowie eine ausführliche Recherche der vorhandenen Datenbanken im Hinblick auf bekannte Expression und Funktion der differentiell regulierten Gene, ermöglichten die Identifizierung von etwa 400 potentiellen Zielgenen. Für mehr als 30% dieser Gene konnte Expression in den *gcm*-abhängigen Gliazellen, hämatopoetischen Zellen oder den "tendon cells" nachgewiesen werden. Hierunter befinden sich mehr als 50 Gene, deren Abhängigkeit von *gcm* bisher nicht bekannt war.

Eine zelluläre Analyse ausgewählter Kandidatengene auf Einzelzellebene, ihre Abhängigkeit von *gcm* sowie eine regulatorische Analyse in verschiedenen mutanten Hintergründen bekannter glialer Gene, geben Einblick in die verschiedenen Mechanismen glialer Regulation. An einigen Beispielen wird eine mögliche Funktion der aus dieser

Analyse hervorgegangen Gene in den bekannten Kontext glialer Differenzierung und Funktion für *Drosophila* diskutiert.

6. Literaturverzeichnis

- Akiyama, Y., Hosoya, T., Poole, A. M. und Hotta, Y.** (1996). The gcm-motif: a novel DNA-binding motif conserved in *Drosophila* and mammals. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 14912-6.
- Akiyama-Oda, Y., Hosoya, T. und Hotta, Y.** (1998). Alteration of cell fate by ectopic expression of *Drosophila* glial cells missing in non-neural cells. *Dev Genes Evol* 208, 578-85.
- Akiyama-Oda, Y., Hosoya, T. und Hotta, Y.** (1999). Asymmetric cell division of thoracic neuroblast 6-4 to bifurcate glial and neuronal lineage in *Drosophila*. *Development* 126, 1967-74.
- Akiyama-Oda, Y., Hotta, Y., Tsukita, S. und Oda, H.** (2000). Mechanism of glia-neuron cell-fate switch in the *Drosophila* thoracic neuroblast 6-4 lineage. *Development* 127, 3513-22.
- Alfonso, T. B. und Jones, B. W.** (2002). gcm2 promotes glial cell differentiation and is required with glial cells missing for macrophage development in *Drosophila*. *Dev Biol* 248, 369-83.
- Altenhein, B., Becker, A., Busold, C., Beckmann, B., Hoheisel, J. D. und Technau, G. M.** (2006). Expression profiling of glial genes during *Drosophila* embryogenesis. *Dev Biol*.
- Arendt, D. und Nubler-Jung, K.** (1999). Comparison of early nerve cord development in insects and vertebrates. *Development* 126, 2309-25.
- Awasaki, T. und Ito, K.** (2004). Engulfing action of glial cells is required for programmed axon pruning during *Drosophila* metamorphosis. *Curr Biol* 14, 668-77.
- Badenhorst, P.** (2001). Tramtrack controls glial number and identity in the *Drosophila* embryonic CNS. *Development* 128, 4093-101.
- Bainton, R. J., Tsai, L. T., Schwabe, T., DeSalvo, M., Gaul, U. und Heberlein, U.** (2005). moody encodes two GPCRs that regulate cocaine behaviors and blood-brain barrier permeability in *Drosophila*. *Cell* 123, 145-56.
- Bataille, L., Auge, B., Ferjoux, G., Haenlin, M. und Waltzer, L.** (2005). Resolving embryonic blood cell fate choice in *Drosophila*: interplay of GCM and RUNX factors. *Development* 132, 4635-44.
- Baumgartner, S., Littleton, J. T., Broadie, K., Bhat, M. A., Harbecke, R., Lengyel, J. A., Chiquet-Ehrismann, R., Prokop, A. und Bellen, H. J.** (1996). A *Drosophila* neurexin is required for septate junction and blood-nerve barrier formation and function. *Cell* 87, 1059-68.

- Beissbarth, T., Fellenberg, K., Brors, B., Arribas-Prat, R., Boer, J., Hauser, N. C., Scheideler, M., Hoheisel, J. D., Schutz, G., Poustka, A. et al.** (2000). Processing and quality control of DNA array hybridization data. *Bioinformatics* 16, 1014-22.
- Bernardoni, R., Kammerer, M., Vonesch, J. L. und Giangrande, A.** (1999). Gliogenesis depends on glide/gcm through asymmetric division of neuroglioblasts. *Dev Biol* 216, 265-75.
- Bernardoni, R., Vivancos, V. und Giangrande, A.** (1997). glide/gcm is expressed and required in the scavenger cell lineage. *Dev Biol* 191, 118-30.
- Bhat, K. M.** (1998). Cell-cell signaling during neurogenesis: some answers and many questions. *Int J Dev Biol* 42, 127-39.
- Bhat, K. M.** (1999). Segment polarity genes in neuroblast formation and identity specification during Drosophila neurogenesis. *Bioessays* 21, 472-85.
- Bossing, T. und Technau, G. M.** (1994). The fate of the CNS midline progenitors in Drosophila as revealed by a new method for single cell labelling. *Development* 120, 1895-906.
- Bossing, T., Technau, G. M. und Doe, C. Q.** (1996). huckebein is required for glial development and axon pathfinding in the neuroblast 1-1 and neuroblast 2-2 lineages in the Drosophila central nervous system. *Mech Dev* 55, 53-64.
- Bourouis, M., Heitzler, P., el Messal, M. und Simpson, P.** (1989). Mutant Drosophila embryos in which all cells adopt a neural fate. *Nature* 341, 442-4.
- Brand, A. H. a. P., N.** (1993). Targeted gene expression as a means of altering cell fates and generating dominant phenotypes. *Development* 118, 401-15.
- Brody, T. und Odenwald, W. F.** (2005). Regulation of temporal identities during Drosophila neuroblast lineage development. *Curr Opin Cell Biol* 17, 672-5.
- Brody, T., Stivers, C., Nagle, J. und Odenwald, W. F.** (2002). Identification of novel Drosophila neural precursor genes using a differential embryonic head cDNA screen. *Mech Dev* 113, 41-59.
- Campos-Ortega, J. A. a. H., V.** (1997). The embryonic development of *Drosophila melanogaster*. Berlin, Heidelberg, New York: Springer Verlag.
- Campuzano, S. und Modolell, J.** (1992). Patterning of the Drosophila nervous system: the achaete-scute gene complex. *Trends Genet* 8, 202-8.
- Casso, D., Ramirez-Weber, F. und Kornberg, T. B.** (2000). GFP-tagged balancer chromosomes for Drosophila melanogaster. *Mech Dev* 91, 451-4.
- Casso, D., Ramirez-Weber, F. A. und Kornberg, T. B.** (1999). GFP-tagged balancer chromosomes for Drosophila melanogaster. *Mech Dev* 88, 229-32.

- De Iaco, R., Soustelle, L., Kammerer, M., Sorrentino, S., Jacques, C. und Giangrande, A.** (2006). Hucklebein-mediated autoregulation of *Glide/Gcm* triggers glia specification. *Embo J* 25, 244-54.
- DeRisi, J., Penland, L., Brown, P. O., Bittner, M. L., Meltzer, P. S., Ray, M., Chen, Y., Su, Y. A. und Trent, J. M.** (1996). Use of a cDNA microarray to analyse gene expression patterns in human cancer. *Nat Genet* 14, 457-60.
- Desplan, C., Theis, J. und O'Farrell, P. H.** (1988). The sequence specificity of homeodomain-DNA interaction. *Cell* 54, 1081-90.
- Doe, C. Q.** (1992). Molecular markers for identified neuroblasts and ganglion mother cells in the *Drosophila* central nervous system. *Development* 116, 855-63.
- Dumstrei, K., Wang, F., Nassif, C. und Hartenstein, V.** (2003). Early development of the *Drosophila* brain: V. Pattern of postembryonic neuronal lineages expressing DE-cadherin. *J Comp Neurol* 455, 451-62.
- Ebens, A. J., Garren, H., Cheyette, B. N. und Zipursky, S. L.** (1993). The *Drosophila* anachronism locus: a glycoprotein secreted by glia inhibits neuroblast proliferation. *Cell* 74, 15-27.
- Egger, B., Leemans, R., Loop, T., Kammermeier, L., Fan, Y., Radimerski, T., Strahm, M. C., Certa, U. und Reichert, H.** (2002). Gliogenesis in *Drosophila*: genome-wide analysis of downstream genes of glial cells missing in the embryonic nervous system. *Development* 129, 3295-309.
- Evans, C. J., Hartenstein, V. und Banerjee, U.** (2003). Thicker than blood: conserved mechanisms in *Drosophila* and vertebrate hematopoiesis. *Dev Cell* 5, 673-90.
- Fellenberg, K., Hauser, N. C., Brors, B., Hoheisel, J. D. und Vingron, M.** (2002). Microarray data warehouse allowing for inclusion of experiment annotations in statistical analysis. *Bioinformatics* 18, 423-33.
- Fellenberg, K., Hauser, N. C., Brors, B., Neutzner, A., Hoheisel, J. D. und Vingron, M.** (2001). Correspondence analysis applied to microarray data. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 10781-6.
- Freeman, M. R., Delrow, J., Kim, J., Johnson, E. und Doe, C. Q.** (2003). Unwrapping glial biology: *Gcm* target genes regulating glial development, diversification, and function. *Neuron* 38, 567-80.
- Furlong, E. E., Profitt, D. und Scott, M. P.** (2001). Automated sorting of live transgenic embryos. *Nat Biotechnol* 19, 153-6.
- Giesen, K., Hummel, T., Stollewerk, A., Harrison, S., Travers, A. und Klämbt, C.** (1997). Glial development in the *Drosophila* CNS requires concomitant activation of glial and repression of neuronal differentiation genes. *Development* 124, 2307-16.
- Granderath, S., Bunse, I. und Klämbt, C.** (2000). *gcm* and pointed synergistically control glial transcription of the *Drosophila* gene *loco*. *Mech Dev* 91, 197-208.

- Granderath, S., Stollewerk, A., Greig, S., Goodman, C. S., O'Kane, C. J. und Klämbt, C.** (1999). *loco* encodes an RGS protein required for *Drosophila* glial differentiation. *Development* 126, 1781-91.
- Greenacre, M. J.** (1984). Theory and applications of correspondence analysis. London: Academic Press.
- Griffiths, R. L. und Hidalgo, A.** (2004). Prospero maintains the mitotic potential of glial precursors enabling them to respond to neurons. *Embo J* 23, 2440-50.
- Halter, D. A., Urban, J., Rickert, C., Ner, S. S., Ito, K., Travers, A. A. und 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, 317-32.
- Hartenstein, V. und Campos-Ortega, J. A.** (1985). Fate-mapping in wildtype *Drosophila melanogaster*. *Roux's Arch. Dev. Biol.* 194, 181-195.
- Hild, M., Beckmann, B., Haas, S. A., Koch, B., Solovyev, V., Busold, C., Fellenberg, K., Boutros, M., Vingron, M., Sauer, F. et al.** (2003). An integrated gene annotation and transcriptional profiling approach towards the full gene content of the *Drosophila* genome. *Genome Biol* 5, R3.
- Hirata, J., Nakagoshi, H., Nabeshima, Y. und Matsuzaki, F.** (1995). Asymmetric segregation of the homeodomain protein Prospero during *Drosophila* development. *Nature* 377, 627-30.
- Hoheisel, J. D.** (2006). Microarray technology: beyond transcript profiling and genotype analysis. *Nat Rev Genet* 7, 200-10.
- Hosoya, T., Takizawa, K., Nitta, K. und Hotta, Y.** (1995). glial cells missing: a binary switch between neuronal and glial determination in *Drosophila*. *Cell* 82, 1025-36.
- Isshiki, T., Pearson, B., Holbrook, S. und Doe, C. Q.** (2001). *Drosophila* neuroblasts sequentially express transcription factors which specify the temporal identity of their neuronal progeny. *Cell* 106, 511-21.
- Ito, K., Urban, J. und 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.
- Jones, B. W.** (2005). Transcriptional control of glial cell development in *Drosophila*. *Dev Biol* 278, 265-73.
- Jones, B. W., Abeysekera, M., Galinska, J. und Jolicoeur, E. M.** (2004). Transcriptional control of glial and blood cell development in *Drosophila*: cis-regulatory elements of glial cells missing. *Dev Biol* 266, 374-87.
- Jones, B. W., Fetter, R. D., Tear, G. und Goodman, C. S.** (1995). glial cells missing: a genetic switch that controls glial versus neuronal fate. *Cell* 82, 1013-23.

- Jordan, B. J.** (2004). How consistent are expression chip platforms? *Bioessays* 26, 1236-1242.
- Kaltschmidt, J. A., Davidson, C. M., Brown, N. H. und Brand, A. H.** (2000). Rotation and asymmetry of the mitotic spindle direct asymmetric cell division in the developing central nervous system. *Nat Cell Biol* 2, 7-12.
- Kambadur, R., Koizumi, K., Stivers, C., Nagle, J., Poole, S. J. und Odenwald, W. F.** (1998). Regulation of POU genes by castor and hunchback establishes layered compartments in the Drosophila CNS. *Genes Dev* 12, 246-60.
- Kammerer, M. und Giangrande, A.** (2001). Glide2, a second glial promoting factor in Drosophila melanogaster. *Embo J* 20, 4664-73.
- Klaes, A., Menne, T., Stollewerk, A., Scholz, H. und Klämbt, C.** (1994). The Ets transcription factors encoded by the Drosophila gene pointed direct glial cell differentiation in the embryonic CNS. *Cell* 78, 149-60.
- Klämbt, C.** (1993). The Drosophila gene pointed encodes two ETS-like proteins which are involved in the development of the midline glial cells. *Development* 117, 163-76.
- Lebestky, T., Chang, T., Hartenstein, V. und Banerjee, U.** (2000). Specification of Drosophila hematopoietic lineage by conserved transcription factors. *Science* 288, 146-9.
- Lehmann, R., Dietrich, U., Jimenez, F. und CamposOrtega, J. A.** (1981). Mutations of early neurogenesis in Drosophila. *Roux's Archives of Developmental Biology* 190, 226-229.
- Meister, M.** (2004). Blood cells of Drosophila: cell lineages and role in host defence. *Curr Opin Immunol* 16, 10-5.
- Meister, M. und Lagueux, M.** (2003). Drosophila blood cells. *Cell Microbiol* 5, 573-80.
- Miller, A. A., Bernardoni, R. und Giangrande, A.** (1998). Positive autoregulation of the glial promoting factor glide/gcm. *Embo J* 17, 6316-26.
- Novotny, T., Eiselt, R. und Urban, J.** (2002). Hunchback is required for the specification of the early sublineage of neuroblast 7-3 in the Drosophila central nervous system. *Development* 129, 1027-36.
- Oberstein, A., Pare, A., Kaplan, L. und Small, S.** (2005). Site-specific transgenesis by Cre-mediated recombination in Drosophila. *Nat Methods* 2, 583-5.
- Parker, R. J. und Auld, V. J.** (2004). Signaling in glial development: differentiation migration and axon guidance. *Biochem Cell Biol* 82, 694-707.
- Prokop, A. und Technau, G. M.** (1991). The origin of postembryonic neuroblasts in the ventral nerve cord of Drosophila melanogaster. *Development* 111, 79-88.

- Ragone, G., Van De Bor, V., Sorrentino, S., Kammerer, M., Galy, A., Schenck, A., Bernardoni, R., Miller, A. A., Roy, N. und Giangrande, A.** (2003). Transcriptional regulation of glial cell specification. *Dev Biol* 255, 138-50.
- Rebeiz, M. und Posakony, J. W.** (2004). GenePalette: a universal software tool for genome sequence visualization and analysis. *Dev Biol* 271, 431-8.
- Rival, T., Soustelle, L., Cattaert, D., Strambi, C., Iche, M. und Birman, S.** (2006). Physiological requirement for the glutamate transporter dEAAT1 at the adult *Drosophila* neuromuscular junction. *J Neurobiol*.
- Romani, S., Campuzano, S. und Modolell, J.** (1987). The achaete-scute complex is expressed in neurogenic regions of *Drosophila* embryos. *Embo J* 6, 2085-2092.
- Rong, Y. S. und Golic, K. G.** (2000). Gene targeting by homologous recombination in *Drosophila*. *Science* 288, 2013-8.
- Schier, A. F. und Gehring, W. J.** (1992). Direct homeodomain-DNA interaction in the autoregulation of the fushi tarazu gene. *Nature* 356, 804-7.
- Schreiber, J., Sock, E. und Wegner, M.** (1997). The regulator of early gliogenesis glial cells missing is a transcription factor with a novel type of DNA-binding domain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 4739-44.
- Schwabe, T., Bainton, R. J., Fetter, R. D., Heberlein, U. und Gaul, U.** (2005). GPCR signaling is required for blood-brain barrier formation in *Drosophila*. *Cell* 123, 133-44.
- Sepp, K. J., Schulte, J. und Auld, V. J.** (2001). Peripheral glia direct axon guidance across the CNS/PNS transition zone. *Dev Biol* 238, 47-63.
- 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, 922-31.
- Skeath, J. B. und Thor, S.** (2003). Genetic control of *Drosophila* nerve cord development. *Curr Opin Neurobiol* 13, 8-15.
- Soustelle, L., Besson, M. T., Rival, T. und Birman, S.** (2002). Terminal glial differentiation involves regulated expression of the excitatory amino acid transporters in the *Drosophila* embryonic CNS. *Dev Biol* 248, 294-306.
- Soustelle, L., Jacques, C., Altenhein, B., Technau, G. M., Volk, T. und Giangrande, A.** (2004). Terminal tendon cell differentiation requires the glide/gcm complex. *Development* 131, 4521-32.
- Spana, E. P. und Doe, C. Q.** (1995). The prospero transcription factor is asymmetrically localized to the cell cortex during neuroblast mitosis in *Drosophila*. *Development* 121, 3187-95.
- Spana, E. P. und Doe, C. Q.** (1996). Numb antagonizes Notch signaling to specify sibling neuron cell fates. *Neuron* 17, 21-6.

- Tan, P. K., Downey, T. J., Spitznagel, E. L., Jr., Xu, P., Fu, D., Dimitrov, D. S., Lempicki, R. A., Raaka, B. M. und Cam, M. C.** (2003). Evaluation of gene expression measurements from commercial microarray platforms. *Nucleic Acids Res* 31, 5676-84.
- Tracey, W. D., Jr., Wilson, R. I., Laurent, G. und Benzer, S.** (2003). painless, a *Drosophila* gene essential for nociception. *Cell* 113, 261-73.
- Truman, J. W. und Bate, M.** (1988). Spatial and temporal patterns of neurogenesis in the central nervous system of *Drosophila melanogaster*. *Dev Biol* 125, 145-57.
- Udolph, G., Rath, P. und Chia, W.** (2001). A requirement for Notch in the genesis of a subset of glial cells in the *Drosophila* embryonic central nervous system which arise through asymmetric divisions. *Development* 128, 1457-66.
- Van De Bor, V. und Giangrande, A.** (2001). Notch signaling represses the glial fate in fly PNS. *Development* 128, 1381-90.
- Van De Bor, V., Walther, R. und Giangrande, A.** (2000). Some fly sensory organs are gliogenic and require glide/gcm in a precursor that divides symmetrically and produces glial cells. *Development* 127, 3735-43.
- Vincent, S., Vonesch, J. L. und Giangrande, A.** (1996). Glide directs glial fate commitment and cell fate switch between neurones and glia. *Development* 122, 131-9.
- Virchow, R.** (1858). Die Zellulärpathologie in ihrer Begründung auf physiologische und pathologische Gewebelehre. Berlin: A.Hirschwald Verlag.
- Watts, R. J., Schuldiner, O., Perrino, J., Larsen, C. und Luo, L.** (2004). Glia engulf degenerating axons during developmental axon pruning. *Curr Biol* 14, 678-84.
- Wimmer, E. A.** (2005). Insect transgenesis by site-specific recombination. *Nat Methods* 2, 580-2.
- Wu, V. M., Schulte, J., Hirschi, A., Tepass, U. und Beitel, G. J.** (2004). Sinuous is a *Drosophila* claudin required for septate junction organization and epithelial tube size control. *J Cell Biol* 164, 313-23.
- Yuasa, Y., Okabe, M., Yoshikawa, S., Tabuchi, K., Xiong, W. C., Hiromi, Y. und Okano, H.** (2003). *Drosophila* homeodomain protein REPO controls glial differentiation by cooperating with ETS and BTB transcription factors. *Development* 130, 2419-28.

7. Anhang

Abkürzungsverzeichnis

A1-A8	Abdominalsegmente eins bis acht
Abb.	Abbildung
A/P	anterior-posterior
AP-Färbung	alkalische Phosphatasefärbung
ca.	circa
CBG	"Cell body glia"
DAB-Färbung	3,3'-Diaminobenzidin
DIG	Digoxigenin-markiert
DNA	Desoxyribonukleinsäure
D/V	dorso-ventral
bzgl.	bezüglich
EG	Exit Glia
et al.	und weitere
FISH	Fluoreszenz <i>in situ</i> Hybridisierung
GB	Glioblast
GFP	Green Fluorescence Protein
GMZ	Ganglienkörperzelle
ISN	Intersegmentalnerv
LGB	longitudinaler Glioblast
mg	Milligramm
ml	Milliliter
µl	Mikroliter
mm	Millimeter
M	Molar
M-CBG	"medial cell body glia"
MM-CBG	"medial most cell body glia"
ML	Mittellinie
NB	Neuroblast

NGB	Neuroglioblast
NRG	"nerve root glia"
PG	periphere Glia
pNR	procephale neurogene Region
PNS	peripheres Nervensystem
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
ssDNA	single-stranded DNA
SN	Segmentalnerv
SPG	subperineurial Glia
St.	Stadium
T1-T3	Thorakalsegmente eins bis drei
Tab.	Tabelle
TN	Transversalnerv
UAS	"upstream activating sequence"
UTP	Uridintriphosphat
vNR	ventrale neurogene Region
vNS	ventrales Nervensystem, Bauchmark
WT	Wildtyp
ZNS	zentrales Nervensystem

Tabelle 7.1 Verwendete Geräte

Gerät	Modell	Hersteller
Binokular	MZ 7-5	Leica
Durchlichtmikroskop	Axioplan	Zeiss
Fluoreszenzmikroskop	BX 50 WI	Olympus
Gelkamera	Quickstore	MS Laborgeräte
Heizblock	TB 1 Thermoblock	Biometra
Hybridisierungskammern	Microarray Chamber	TeleChem
Inkubatoren	Fricocell	MMM Medcenter
	WTB Binder	Labotec
Kaltlichtlampe	KL1500 LCD	Leica
Kamera	ProgRes 3012	Kontron Elektronik
	Axiocam	Zeiss
Konfokales Lasermikroskop	TCS SPII	Leica
Magnetrührer	MR3001	Heidolph
Microarray-Scanner	GeneTac LS IV	Perkin Elmer Life Sciences
Minigelapparatur	HE33 Gel Circle	Hoeter
Netzteil	GPS 200/400	Pharmacia
PCR Maschine	TGradient	Biometra
pH-Meter	CG840	Schott
Photometer	Biophotometer	Eppendorf
Pipetten	Pipetman	Gilson
Speed Vac	SPD101B	Savant
Thermoschüttler	Thermomixer compact	Eppendorf
Waagen	PM 4600	Mettler
	AM50	Mettler
Vortexer	VF2	IKA Labortechnik
Wasserbad		Köttermann
Zentrifugen	mini spin	Eppendorf
	Centrifuge 5417R	Eppendorf
	Sigma 3K20	B. Braun

Tabelle 7.2 Alle getesteten GOF-Kandidaten

Gen-Name	St. 9	St. 10	St. 11	St. 12	St. 13	St. 14	St. 15	St. 16	ISH Ergebnis
CG10057	+2.45	+2.49	+2.01	+2.28	+2.24	+1.86	+1.93	+1.64	unspezifische ISH
CG10702	+1.50	+1.98	+2.07	+1.88	+1.56	+1.73	+1.58	+2.07	unspezifische ISH
CG11164	+1.90	+2.17	+1.85	+2.28	+1.98	+1.81	+1.81	+1.89	positive ISH: ZNS/ H
CG13682	+2.18	+2.43	+2.04	+2.71	+1.77	+1.78	+1.65	+1.52	unspezifische ISH
CG1557	+1.71	+2.29	+2.38	+2.19	+2.42	+1.91	+1.70	+1.65	spezifische, negative ISH
CG1962	+3.29	+3.03	+3.02	+3.20	+2.14	+2.28	+2.28	+1.93	positive ISH: G, N, BDGP
CG4880	+2.56	+2.25	+2.37	+2.48	+2.28	+2.00	+1.98	+2.29	unspezifische ISH
swa	+2.22	+2.37	+2.60	+2.58	+2.56	+2.12	+1.86	+1.80	spezifische, negative ISH
CG12183	+2.66	+2.65	+1.94	+2.37				+1.57	spezifische, negative ISH
cin	+1.74	+1.60	+1.54	+1.82	+1.83		+1.73	+1.87	unspezifische ISH
pim	+1.67	+1.62	+1.71	+1.94	+2.12		+2.01	+2.22	unspezifische ISH
CG11242	+1.93	+1.87	+1.66	+1.70			+1.59	+1.86	unspezifische ISH
CG17508	+2.96	+2.54	+2.22	+2.21			+1.57	+1.62	unspezifische ISH
CG1667	+2.35	+2.20	+1.88	+2.56		+1.65	+1.72	+1.81	unspezifische ISH
CG2493	+1.55		+1.97	+2.21	+1.94	+1.85	+1.95	+1.96	unspezifische ISH
CG12317	+1.58	+1.67	+1.96	+2.28	+2.16	+1.69	+1.61		Freeman Microarray
CG17711	+1.64	+2.02	+2.16	+2.25	+1.76	+1.63	+1.59		unspezifische ISH
CG8889	+1.58	+1.50	+1.51	+1.87	+1.74	+1.53	+1.62		unspezifische ISH
CG9241	+1.67	+1.82	+1.88	+2.21	+2.06	+1.96	+1.73		unspezifische ISH
CG11055	+2.31	+2.60	+2.26	+2.06	+1.86		+1.64		spezifische, negative ISH
CG1578	+1.98	+2.37	+2.14	+2.09	+1.92		+1.53		unspezifische ISH
CG17018	+3.09	+2.58	+2.27	+2.40	+2.05		+1.50		unspezifische ISH
CG7840	+2.21	+2.08	+1.96	+1.87	+1.56		+1.60		unspezifische ISH
Uch-L3	+1.64			+1.60	+1.51		+1.55		unspezifische ISH
CG2923	+2.75	+2.77	+2.40	+2.27	+1.60	+1.69			unspezifische ISH
CG9088	+1.54	+1.88	+1.78	+1.53	+1.60	+1.56			Flybase/ BDGP: G
CG9425	+1.71	+1.91	+1.70	+1.68	+1.64	+1.50			unspezifische ISH
CG2051	+1.50	+1.52		+1.69	+1.84	+1.50			positive ISH: G, N
CG11518	+1.56	+1.66	+1.82	+1.58	+1.56				unspezifische ISH
CG16757	+1.73	+1.89	+2.04	+1.91	+1.77				positive ISH: G
CG17746	+2.11	+1.92	+1.79	+1.89	+1.83				unspezifische ISH
CG4523	+1.62	+1.82	+1.77	+1.84	+1.66				positive ISH: ZNS
CG4586	+1.93	+2.15	+1.88	+1.83	+1.70				unspezifische ISH
CG8116	+2.19	+2.30	+1.64	+2.18	+1.62				unspezifische ISH
Tsc1	+1.90	+2.03	+1.68	+1.78	+1.54				unspezifische ISH
CG18734	+2.10	+2.25		+2.01	+1.61				unspezifische ISH
CG7384	+2.07	+2.46		+1.96	+1.68				unspezifische ISH
CH1-2	+1.67		+1.52	+1.52	+1.57				unspezifische ISH
CG3561	+1.59		+1.58	+1.81	+1.50				unspezifische ISH
torp4a	+1.53		+1.62	+1.75	+1.51				unspezifische ISH
CG3618	+1.92	+1.93		+1.79					Flybase/ BDGP: G
Ptp10D	+1.62	+2.04		+1.51					positive ISH: G, N
B4	+1.87	+1.97	+1.77	+1.82					unspezifische ISH
CG1927	+2.05	+2.08	+2.05	+2.13					unspezifische ISH
mol	+1.98	+2.11	+1.80	+1.75					unspezifische ISH

CG14967	+1.69	+2.16	+1.58	+1.58					unspezifische ISH
CG15893	+2.25	+2.17	+2.08	+2.05					unspezifische ISH
CG17419	+1.80	+2.28	+1.91	+1.95					unspezifische ISH
CG2221	+1.52	+2.20	+2.08	+1.68					spezifische, negative ISH
CG2767	+2.01	+2.06	+1.57	+1.54					unspezifische ISH
CG5966	+1.74	+2.41	+2.03	+1.75					spezifische, negative ISH
CG8185	+1.91	+2.35	+1.83	+1.64					unspezifische ISH
CG8430	+1.96	+2.16	+1.81	+1.83					spezifische, negative ISH
csw	+2.00	+2.18	+1.99	+1.56					positive ISH: ZNS
EDTP	+2.15	+2.24	+1.75	+1.61					unspezifische ISH
CG10492	+1.84	+1.69	+1.61						unspezifische ISH
CG7530	+2.01	+2.12	+1.89						unspezifische ISH
Rab-RP1	+1.86	+1.63	+1.56						Flybase/ BDGP: G
CG9326	+1.88	+2.02							unspezifische ISH
Arf102F	+1.64								unspezifische ISH
CG2316	+1.56								unspezifische ISH
CG6668	+1.56								unspezifische ISH
CG9153	+1.54								unspezifische ISH
ApepP		+2.09	+2.18	+2.56	+2.31	+1.97	+1.83	+1.72	Flybase/ BDGP: H
CG7433		+2.14	+2.45	+2.78	+1.97	+2.00	+1.87	+2.07	positive ISH: G, BDGP
CG3457		+1.88	+1.81	+2.02	+1.84	+1.80	+1.82	+2.82	unspezifische ISH
Parp		+2.16	+2.23	+3.12	+1.92	+2.24	+2.10	+2.40	unspezifische ISH
CG17696		+1.98	+1.65	+2.16				+1.82	unspezifische ISH
Gst3		+1.95	+1.77	+2.28				+1.61	spezifische, negative ISH
CG3837		+1.62						+1.51	unspezifische ISH
CG1677		+1.62	+1.59	+1.80	+1.90		+1.51	+1.56	positive ISH: ZNS
Cam		+1.74	+2.12	+2.24	+1.88	+1.83	+1.60		positive ISH: G, N
CG7719		+1.68	+1.77	+2.03	+2.20	+1.83	+1.64		unspezifische ISH
UbcD2		+1.50	+1.82	+1.72	+1.94	+1.60	+1.62		positive ISH: G, N
CG3167		+1.65	+1.50	+1.55	+1.56		+1.55		unspezifische ISH
smid		+1.51	+1.51	+1.59	+1.94		+1.56		positive ISH: ZNS, Egger
RfC38		+1.58		+1.74	+1.87		+1.52		unspezifische ISH
Chit		+1.53	+2.01	+2.07		+1.52	+1.66		Freeman
cact		+1.59	+1.89	+1.78	+2.09				FlyBase: H, Egger
CG13097		+1.57	+1.57	+1.57	+1.77				unspezifische ISH
CG14215		+1.63	+1.55	+1.61	+1.74				unspezifische ISH
CG2079		+1.88	+1.65	+1.61	+1.50				unspezifische ISH
CG4408		+1.51	+1.82	+1.99	+1.62				unspezifische ISH
CG3847		+1.55			+1.50				Flybase/ BDGP: G
CG4390		+1.71	+1.96	+1.72					unspezifische ISH
Dbp80		+1.93	+1.68	+1.95					unspezifische ISH
CG10326		+1.60		+1.79					positive ISH: ZNS
CG11307		+1.60		+1.83					unspezifische ISH
CG4389		+1.57	+1.59						Freeman Microarray
CG10939		+1.72	+1.66						spezifische, negative ISH
CG8420		+1.57							spezifische, negative ISH
CG8171			+1.53	+1.79	+2.09	+1.72	+1.67	+1.89	positive ISH: G, N
cathD			+1.54	+1.77	+1.71		+1.82	+1.79	Flybase/ BDGP: ZNS
CG6897			+1.54	+1.79	+2.23		+1.78	+1.92	unspezifische ISH

CG6219			+1.55	+1.83	+2.06	+1.77	+1.63		unspezifische ISH
Bx34			+1.51	+1.62	+1.89				unspezifische ISH
CG12196			+1.56	+1.58	+1.79				unspezifische ISH
RpII140				+1.58	+2.06	+1.68		+1.53	positive ISH: ZNS
CG10880				+1.72	+1.57		+1.71	+1.50	unspezifische ISH
CG16725				+1.60	+1.54	+1.56	+1.60		unspezifische ISH
CG3227				+1.64	+2.08		+1.53		positive ISH: G,N, BDGP
mary				+1.51	+1.71		+1.57		unspezifische ISH
CG16892				+1.73	+1.90	+1.58			unspezifische ISH
CG11943				+1.55	+1.60				unspezifische ISH
CG16980				+1.50	+1.51				Flybase/ BDGP: G
CG17256				+1.61	+1.70				unspezifische ISH
CG6241				+1.62	+1.62				unspezifische ISH
glu				+1.65	+1.76				positive ISH: ZNS, Egger
Hlc				+1.58	+1.65				unspezifische ISH
SMC2				+1.56	+1.75				Flybase/ BDGP: G
Uba2				+1.51	+1.89				positive ISH: G, N
CG17023				+1.90					unspezifische ISH
CG5522				+1.73					spezifische, negative ISH
CG4584					+2.09	+1.59	+1.63	+1.88	positive ISH: G, N, Egger
CycB					+2.89	+2.07	+2.09	+2.30	Literatur
CG15141					+1.60		+1.64	+1.51	positive ISH: ZNS
Map60					+2.10		+1.60		positive ISH: ZNS, BDGP
Atu					+1.70				Flybase/ BDGP: G, N
Bap60					+1.63				Flybase/ BDGP: G, Egger
Med15					+1.65				unspezifische ISH
Bj1					+1.94				FlyBase, ZNS, Egger
CG10191					+1.50				Flybase/ BDGP: G
CG4266					+1.70				positive ISH: ZNS
CG4936					+1.91				positive ISH: G, N
CG5175					+1.63				Flybase/ BDGP: G
CG5235					+1.60				Flybase/ BDGP: G
CG6418					+1.60				positive ISH: G, N
CG8606					+1.75				Flybase/ BDGP: G
Klp61F					+1.70				Flybase/ BDGP: G
lack					+1.62				unspezifische ISH
pnut					+1.78				positive ISH: ZNS
zf30C					+1.52				unspezifische ISH
CG1153					-1.67			+1.68	positive ISH: T
CG15860								+1.77	positive ISH: G
CG3168								+2.07	positive ISH: G, BDGP
CG5978								+1.53	unspezifische ISH
CG6231								+2.00	unspezifische ISH
CG3588								+1.51	unspezifische ISH
CG4322								+1.54	positive ISH: G, Freeman
Gapdh2								+1.56	unspezifische ISH

Tabelle 7.3 Alle getesteten LOF-Kandidaten

Gen	St.10	St.11	St.12	St.13	St.14	St.16	ISH Ergebnis
CG16876	-2.12	-2.61	-3.01	-3.34	-2.80	-2.05	positive ISH: Glia/ Makrophagen, BDGP
CG12896	-2.21	-3.73	-7.01	-3.76	-2.03	-2.21	spezifische, negative ISH
CG1473	-1.58	-3.39	-1.77	-2.48	-2.00	-1.69	spezifische, negative ISH
CG5340	-2.37	-2.77	-2.23	-1.77	-1.86	-1.62	spezifische, negative ISH
CG5885	-2.12	-1.64	-2.08	-2.84	-2.15	-1.66	spezifische, negative ISH
CG8193	-1.97	-2.94	-1.88	-3.87	-4.20	-3.96	positive ISH: Crystal Zellen
CG14629	-1.54	-2.81	-1.83	-2.59	-1.67	-1.55	Flybase/ BDGP: Makrophagen
Ero1L	-1.76	-5.46	-2.06	-2.07		-2.03	spezifische, negative ISH
Caps	-1.93	-2.91	-3.37			-1.68	positive ISH: ZNS ubiquitär
Ance	-1.96	-1.87	-2.01	-2.02	-1.78		spezifische, negative ISH
CG10621	-3.03	-3.13	-2.24	-2.41	-1.81		spezifische, negative ISH
CG18431	-1.73	-3.51	-1.70	-1.61	-1.73		spezifische, negative ISH
CG4798	-2.08	-2.13	-2.28	-1.51	-1.73		unspezifische ISH
CG16745	-1.79	-2.20	-2.24		-1.53		unspezifische ISH
CG12405	-2.10	-3.72		-3.94	-1.71		spezifische, negative ISH
CG7033	-3.10	-3.62		-1.58	-1.56		spezifische, negative ISH
Nacalpha	-1.82	-2.13		-1.90	-1.53		spezifische, negative ISH
CG10576	-1.77	-1.96	-2.05	-1.65			unspezifische ISH
CG11051	-1.89	-2.12	-2.20	-2.81			spezifische, negative ISH
CG7801	-1.92	-2.07	-1.86	-1.83			spezifische, negative ISH
Cyp6d5	-1.56	-2.13	-3.07	-2.30			spezifische, negative ISH
mge	-1.56	-1.75	-1.72	-1.89			unspezifische ISH
CG4500	-2.02	-2.56		-1.85			spezifische, negative ISH
CG4844	-2.66	-3.71		-1.51			positive ISH: Neurone und Glia
Rab-RP4	-1.65		-1.52	-1.61			unspezifische ISH
CG12030	-2.04	-2.12	-1.67				unspezifische ISH
CG16971	-1.98	-2.29	-2.01				positive ISH: Glia/ Makrophagen
draper	-1.61		-1.52				Egger, Freeman comp.
betaCop	-1.73	-1.52					unspezifische ISH
CG15015	-1.64	-2.02					positive ISH: Glia/ tendon cells
CG1553	-1.65	-2.53					spezifische, negative ISH
CG17544	-1.81	-2.61					unspezifische ISH
CG18111	-2.34	-1.97					spezifische, negative ISH
CG3829	-1.98	-1.60					spezifische, negative ISH
CG5958	-2.06	-2.27					spezifische, negative ISH
CG8222	-1.50	-2.15					positive ISH: Makrophagen
CG8596	-1.64	-2.08					unspezifische ISH
CG8791	-1.80	-2.29					Flybase/ BDGP: Plasmacyten
CG9520	-2.14	-2.01					Flybase/ BDGP: Crystal Zellen
crol	-1.95	-1.69					positive ISH: ZNS ubiquitär
Cyt-b5-r	-2.51	-1.92				+1.65	spezifische, negative ISH
Fas2	-2.20	-1.77					Literatur
Gs2	-2.23	-2.50					Flybase/ BDGP: Glia
LanB1	-1.54	-1.89					positive ISH: Makrophagen, Literatur
lqf	-1.75	-1.82					unspezifische ISH

Nrv2	-1.90	-1.57					positive ISH: Neurone und Glia, Freeman
Reg-3	-1.80	-2.48				+1.54	positive ISH: Glia
RfaBp	-3.02	-2.97					spezifische, negative ISH
tap	-1.73	-3.22					positive ISH: Neurone und Glia, BDGP
unc-5	-2.28	-1.56					Freeman comp.
barr	-1.56						Flybase/ BDGP: Glia
CG11798	-1.53						Literatur
CG17054	-1.70						Flybase/ BDGP: Glia
CG8965	-1.65						positive ISH: Neurone und Glia, Freeman
dpn	-2.30						Literatur
miple	-1.59						Flybase/ BDGP: Glia
zf30C	-1.55						unspezifische ISH
CG11765		-3.79	-9.01	-4.19	-1.65	-2.38	spezifische, negative ISH
CG14430		-1.56	-1.98	-2.03	-1.56	-1.57	spezifische, negative ISH
Fpps		-2.00	-3.37	-2.53	-2.34	-1.52	positive ISH: ZNS ubiquitär
CG10746		-5.84	-2.44	-2.94		-2.02	spezifische, negative ISH
CG5059		-1.98	-3.38			-1.73	unspezifische ISH
CG3624		-2.06		-1.61		-1.67	Flybase/ BDGP: Glia
CG7227		-1.58		-2.01		-2.00	spezifische, negative ISH
scf		-1.91		-1.78	-1.56	-1.74	positive ISH: Makrophagen, Literatur
CG9153		-1.62				-1.54	unspezifische ISH
Aats-phe		-1.89	-2.40	-2.54	-1.61		positive ISH: tendon cells
Coprox		-2.00	-2.51	-1.86	-2.00		unspezifische ISH
CG2813		-1.53	-1.63	-1.79	-1.56		unspezifische ISH
sala		-2.30	-3.72	-2.60	-3.17		spezifische, negative ISH
14-3-3zeta		-1.60	-2.22	-1.74			spezifische, negative ISH
CG16936		-1.64	-1.68	-2.23			positive ISH: Crystal Zellen
CBP		-2.28	-2.36	-1.88			spezifische, negative ISH
CG11652		-3.46	-3.47	-3.48			positive ISH: ZNS ubiquitär
CG12172		-2.67	-2.00	-1.78			spezifische, negative ISH
CG17323		-1.75	-2.04	-2.57			unspezifische ISH
CG4726		-2.19	-1.71	-1.81			spezifische, negative ISH
CG5545		-2.33	-1.91	-1.98			Flybase/ BDGP: Glia
CG8066		-1.56	-2.32	-2.98			positive ISH: tendon cells
Cys		-1.67	-2.17	-2.28			positive ISH: tendon cells
deltaCOP		-1.57	-1.80	-1.88			unspezifische ISH
Flo		-2.40	-2.02	-2.18			positive ISH: ZNS ubiquitär
KdelR		-1.86	-1.70	-1.80			unspezifische ISH
M6		-2.00	-1.75	-1.73			unspezifische ISH
regucalcin		-1.61	-1.97	-1.56			spezifische, negative ISH
CG18317		-4.08	-1.57				spezifische, negative ISH
CG3408		-1.72	-1.61				positive ISH: ZNS ubiquitär, BDGP
CG7966		-2.13	-2.40				positive ISH: tendon cells
CG10939		-1.68					spezifische, negative ISH
CG12139		-2.24					positive ISH: ZNS ubiquitär

CG18446		-1.62		+1.78		spezifische, negative ISH	
CG3847		-1.50				Flybase/ BDGP: Glia	
CG8964		-2.06				unspezifische ISH	
Mct1		-2.28				spezifische, negative ISH	
nerfin-1		-1.50				positive ISH: Neurone und Glia, Flybase/ BDGP	
Nrg		-1.50				Freeman BDGP	
ttk		-1.75				Literatur	
Zn72D		-1.61				Flybase/ BDGP: Glia	
Arf102F			-1.76	-1.51	-1.52	unspezifische ISH	
CG2767			-1.54	-1.91	-1.72	unspezifische ISH	
CG6199			-1.70	-2.76	-1.82	unspezifische ISH	
CG7675			-1.78	-2.73	-1.85	spezifische, negative ISH	
Dredd			-1.69	-1.75	-1.50	unspezifische ISH	
cathD			-1.96		-1.58	Flybase/ BDGP: NB-Muster	
CG18507			-1.58	-1.86	-1.61	unspezifische ISH	
CG1751			-1.70	-1.93	-1.69	unspezifische ISH	
CG2852			-1.51	-2.10	-1.62	positive ISH: Makrophagen	
CG5080			-1.78	-2.85	-1.57	positive ISH: Neurone und Glia	
128up			-1.75	-1.97		unspezifische ISH	
CG10157			-1.74	-1.71		unspezifische ISH	
CG10733			-1.60	-1.83		unspezifische ISH	
CG12065			-1.93	-2.03		unspezifische ISH	
CG12918			-1.55	-1.94		unspezifische ISH	
CG13273			-1.97	-1.86		unspezifische ISH	
CG15081			-1.56	-1.72		unspezifische ISH	
CG1681			-1.94	-1.93		unspezifische ISH	
CG2827			-1.79	-1.63		unspezifische ISH	
CG5656			-2.06	-2.50		spezifische, negative ISH	
CG6459			-1.85	-2.34		spezifische, negative ISH	
CG6638			-1.91	-1.58		unspezifische ISH	
CG8782			-2.24	-1.71		unspezifische ISH	
CG9140			-1.66	-2.04		unspezifische ISH	
CG9326			-2.10	-1.87		unspezifische ISH	
Gdi			-1.83	-1.52		positive ISH: ZNS ubiquitär	
Sec61beta			-1.60			unspezifische ISH	
Akap200			-1.67			Freeman comp	
CG11045			-1.72			Freeman Microarray	
CG13277			-2.04			unspezifische ISH	
CG1345			-1.65			unspezifische ISH	
CG14112	+2.23		-2.60			unspezifische ISH	
CG2316			-1.50			unspezifische ISH	
CG6668			-1.58			unspezifische ISH	
CG7670			-1.72			Flybase/ BDGP: Glia	
Cp1			-1.69			Freeman comp.	
Cyp307a1	+1.68		-2.36	+3.01		unspezifische ISH	
E2f2			-1.71			Flybase/ BDGP: Glia, Egger	
GM130			-1.53			spezifische, negative ISH	
Bc				-2.63	-2.95	-2.94	positive ISH: Crystal Zellen, Literatur

CG11910				-1.54	-1.72	-2.08	positive ISH: Glia, BDGP
CG17661				-1.89	-1.59	-1.51	unspezifische ISH
CG8420				-2.46	-1.64	-1.70	spezifische, negative ISH
Pxn				-2.28	-1.83	-1.66	Flybase/ BDGP: Crystal Zellen, Makrophagen
CG7117				-1.69	-1.54	-2.09	Flybase/ BDGP: Glia, Freeman
CG11461				-1.94		-2.34	spezifische, negative ISH
CG9689				-2.64		-2.10	spezifische, negative ISH
Paps				-2.27		-1.70	spezifische, negative ISH
CG10591				-3.52	-3.27		positive ISH: tendon cells, BDGP
CG13657				-4.19	-2.74		spezifische, negative ISH
CG9196				-2.11	-1.53		positive ISH: tendon cells
Argk				-2.34			positive ISH: Neurone und Glia, Egger, Freeman Microarray
CG9543				-1.83			unspezifische ISH
CG12910				-1.57			Freeman comp + Microarray
CG2803				-1.74			spezifische, negative ISH
CG4058				-1.51			Flybase/ BDGP: Glia
CG7830				-1.76			unspezifische ISH
CG9743				-2.06			spezifische, negative ISH
Rab6				-1.50			unspezifische ISH
vkg				-1.65			Egger, Freeman comp.
CG17352					-1.52	-2.52	unspezifische ISH
CG9338					-1.58		positive ISH: Glia
CG12920						-2.60	spezifische, negative ISH
CG14107						-2.14	unspezifische ISH
CG15887						-2.14	unspezifische ISH
CG17419						-1.63	unspezifische ISH
CG17508	+1.99					-1.92	unspezifische ISH
CG18318						-2.09	positive ISH: Glia
CG2297						-1.64	Flybase/ BDGP: Glia
CG4702		+1.89				-2.53	spezifische, negative ISH
CG5978						-1.59	unspezifische ISH
CG6572						-2.10	spezifische, negative ISH
CG6879						-2.32	unspezifische ISH
Hsp27						-1.74	Flybase/ BDGP: Glia
Parp						-2.01	unspezifische ISH

Tabelle 7.4 Funktionelle Annotierung aller positiven GOF und LOF Kandidaten

Gen	GO-Annotation nach Flybase	Gen	GO-Annotation nach Flybase
CG11164	unbekannte Funktion	CG15015	Rho Interaktor, Signalweiterleitung
CG1962	unbekannte Funktion	CG8222	transmembrane Rezeptor-Protein
CG2051	Histon-Acetyltransferase	<i>crol</i>	Transkriptionsfaktor
CG16757	Protein-Phosphatase 1-bindend	<i>LanB1</i>	strukt. Molekül, Zell-Adhäsion
CG4523	Serin/Threonin-Kinase	<i>Nrv2</i>	Natrium:Kalium-Austausch, ATPase
<i>Ptp10D</i>	Tyrosin-Phosphatase	<i>Reg-3</i>	Elektronentransporter, Metabolismus
<i>csw</i>	Tyrosin-Phosphatase	<i>tap</i>	Transkriptionsfaktor
CG7433	Transaminase, Metabolismus	CG8965	unbekannte Funktion
CG1677	Transkriptionsfaktor	<i>Fpps</i>	Transferase, Cholesterin-Metabolismus
<i>Cam</i>	Calmodulin/Calciumionen-bindend	<i>scf</i>	DNA-Topoisomerase
<i>UbcD2</i>	Ubiquitin-konjugierendes Enzym,	<i>Aats-phe</i>	phe-tRNA-Ligase
<i>smid</i>	ATP-bindend, Endopeptidase	CG16936	Glutathion-Transferase, Immunabwehr
CG10326	unbekannte Funktion	CG11652	unbekannte Funktion
CG8171	Replikations-Checkpoint	CG8066	Cystein-Protease Inhibitor
<i>RpIII40</i>	RNA-Polymerase-Untereinheit	<i>Cys</i>	Cystein-Protease Inhibitor
CG3227	unbekannte Funktion	<i>Flo</i>	strukt. Molekül, Rezeptor-bindend
<i>glu</i>	DNA-bindend, Chromatin-Aufbau	CG3408	unbekannte Funktion
<i>Uba2</i>	Ubiquitin-aktivierendes Enzym	CG7966	Selen-bindend
CG4584	dUTPase, dUTP-Diphosphatase	CG12139	LDL Rezeptor, Calciumionen-bindend
CG15141	Ubiquitin-Protein-Ligase	<i>nerfin-1</i>	Transkriptionsfaktor
<i>Map60</i>	Microtubuli-bindend	CG2852	Peptidyl-Prolyl cis-trans Isomerase
CG4266	RNA-bindend	CG5080	unbekannte Funktion
CG4936	Transkriptionsfaktor	<i>Gdi</i>	RAB GDP-dissociation inhibitor
CG6418	Nukleinsäure-Metabolismus	<i>Bc</i>	Monophenol-Monooxygenase,
<i>pnut</i>	Cytoskelettbestandteil, GTPase	CG11910	G-Protein Rezeptor
CG1153	unbekannte Funktion	CG10591	unbekannte Funktion
CG15860	Calcium-Kanal	CG9196	unbekannte Funktion
CG3168	Transporter, DNA-Metabolismus	<i>Argk</i>	Arginin-Kinase
CG4322	G-Protein Rezeptor	CG9338	unbekannte Funktion
CG16876	unbekannte Funktion	CG18318	unbekannte Funktion
CG8193	Monophenol-Monooxygenase,	CG6218	Carbohydrat-Kinase
<i>Caps</i>	Neurotransmitter-Sekretion	CG6783	Fettsäure-bindend, Transporter
CG4844	unbekannte Funktion	CG2893	Kation-Transporter, Antiporter
CG16971	unbekannte Funktion	CG9336	unbekannte Funktion

Versicherung gemäß § 11 Abs. 3d der Promotionsordnung

Ich habe die jetzt als Dissertation vorgelegte Arbeit selbst angefertigt und alle benutzten Hilfsmittel (Literatur, Apparaturen, Material) in der Arbeit angegeben.

Ich habe und hatte die jetzt als Dissertation vorgelegte Arbeit nicht als Prüfungsarbeit für eine staatliche oder andere wissenschaftliche Prüfung eingereicht.

Ich hatte weder die jetzt als Dissertation vorgelegte Arbeit noch Teile einer Abhandlung davon bei einer anderen Fakultät bzw. einem anderen Fachbereich als Dissertation eingereicht.

Mainz, den

(Angela Becker)

