

Fachbereich Biologie

***Drosophila melanogaster* als Modellsystem
zur Erforschung humaner Gliome**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften im Fachbereich Biologie
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster

vorgelegt von

Hanna Teresa Witte

aus Darmstadt

- 2008 -

Dekan:	Prof. Dr. N. Sachser
Erster Gutachter:	Prof. Dr. C. Klämbt
Zweiter Gutachter:	Prof. Dr. W. Paulus

Tag der mündlichen Prüfung:	23.06.2008
Tag der Promotion:	18.07.2008

1 Einleitung	1
1.1 Das Nervensystem von Vertebraten	1
1.1.1 Gliazellen von Vertebraten	2
1.2 Die Entstehung und Behandlung maligner Tumore	3
1.3 Eigenschaften und Klassifikation von glialen Tumoren des Nervensystems	4
1.4 Tumore bei <i>Drosophila</i>	5
1.5 <i>Drosophila</i> als Modellsystem für die Erforschung humaner Krankheiten	6
1.5.1 Etablierte <i>Drosophila</i> -Modelle zur Erforschung von Krankheiten	7
1.6 Das Nervensystem der <i>Drosophila</i>-Larve	8
1.6.1 Die Augenimaginalscheibe	9
1.6.2 Die peripheren Nerven	11
1.7 Mechanismen der Migration	13
1.8 Rezeptortyrosinkinasen als Regulatoren der Zellmotilität	14
1.8.1 Der PI3K/Akt-Signalweg	16
1.9 Zielsetzung der Arbeit	18
2 Material und Methoden	19
2.1 Material	19
2.1.1 Chemikalien	19
2.1.2 Puffer, Medien und Lösungen	19
2.1.2.1 Puffer und Lösungen	19
2.1.3 Fliegenstämme	26
2.1.3.1 Balancer- und Wildtypstämme	26
2.1.3.2 Gal4- und FLP-Aktivatorlinien	26
2.1.3.3 UAS Effektorlinien	27
2.1.3.4 Duplikationen und Defizienzen	28
2.1.3.5 sonstige Stämme	29
2.1.4 Antikörper	29
2.1.4.1 primäre Antikörper	29
2.1.4.2 sekundäre Antikörper	30

2.1.5 Bakterienstämme	30
2.1.6 Vektoren	31
2.1.7 Oligonukleotide	31
2.2 Methoden	32
2.2.1 Genetische Methoden	32
2.2.1.1 Fliegenzucht	32
2.2.1.2 Sammeln von Embryonen	32
2.2.1.3 Anzucht von Larven definierter Altersstufen	32
2.2.1.4 Keimbahntransformation	33
2.2.1.4.1 Präparation der Embryonen	33
2.2.1.4.2 DNA-Mikroinjektion	34
2.2.1.4.3 Selektion transgener Fliegen	34
2.2.1.4.4 Lokalisation des Insertionsortes	34
2.2.1.5 Das UAS/Gal4-System	35
2.2.1.6 Das FRT/FLP-System	35
2.2.1.7 Generierung von GFP-Rekombinanten	36
2.2.1.8 Generierung von Gal4>>UAS GFP/Gal80 ^{ts} -Rekombinanten	36
2.2.1.9 Medikamenten-induzierte Inhibition von ektopisch exprimierten Genen	36
2.2.1.9.1 Experimentelle Bestimmung der maximal tolerablen DMSO Konzentration	37
2.2.1.9.2 Applikation der Inhibitoren	38
2.2.2 Histologische Methoden	39
2.2.2.1 Fixierung von <i>whole mount Drosophila</i> -Embryonen für Antikörperfärbungen	39
2.2.2.2 Fixierung von L3-Imaginalscheiben und Gehirnen für immunhistochemische Färbungen	39
2.2.2.3 Präparation und Fixierung des peripheren Nervensystems von L3-Larven	40
2.2.2.4 Antikörperfärbung von <i>Drosophila</i> -Embryonen oder Imaginalscheiben	40
2.2.2.5 Alkalische Phosphatase (AP)-Färbung	41
2.2.2.6 Meerrettich-Peroxidase (HRP)-Färbung	41
2.2.2.7 Fluoreszenz-Färbung	42
2.2.2.8 <i>In situ</i> -Hybridisierung an ganzen <i>Drosophila</i> -Embryonen	42
2.2.2.8.1 Herstellung einer Digoxigenin-markierten RNA-Sonde	42

2.2.2.8.2 Hybridisierung der <i>Drosophila</i> -Embryonen	43
2.2.2.8.3 Einbetten von <i>Drosophila</i> -Embryonen nach <i>in situ</i> -Hybridisierung	44
2.2.3 Molekularbiologische Methoden	44
2.2.3.1 Animpfen von Selektionsplatten	44
2.2.3.2 Stammanzucht und Zellernte	45
2.2.3.3 Transformationstechniken	45
2.2.3.3.1 Herstellung elektrokompetenter <i>E. coli</i> -Zellen (XL-1 <i>blue</i> und JM109)	46
2.2.3.3.2 Transformation elektrokompetenter <i>E. coli</i> -Zellen (XL-1 <i>blue</i> und JM109)	46
2.2.3.3.3 Herstellung CaCl ₂ -kompetenter <i>E. coli</i> -Zellen (XL-1 <i>blue</i> und JM109)	47
2.2.3.3.4 Transformation CaCl ₂ -kompetenter <i>E. coli</i> -Zellen (XL-1 <i>blue</i> und JM109)	47
2.2.3.4 Isolation von Plasmid-DNA	48
2.2.3.4.1 Isolation von Plasmid-DNA (Koch-Methode)	48
2.2.3.4.2 Isolation von Plasmid-DNA (Roche)	49
2.2.3.4.3 Isolation von Plasmid-DNA (Qiagen)	50
2.2.3.5 Isolierung genomischer DNA aus Fliegen	50
2.2.3.6 Präparation von genomischer DNA für <i>single fly</i> -PCR	51
2.2.3.7 <i>In vitro</i> -Amplifikation von DNA	51
2.2.3.8 Aufreinigung von PCR-Produkten (Qiagen)	53
2.2.3.9 Agarosegelelektrophorese	54
2.2.3.10 Gelextraktion von DNA-Fragmenten (Qiagen)	55
2.2.3.11 Photometrische Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren	55
2.2.3.12 Abschätzung der Nukleinsäure-Konzentration im Agarosegel	56
2.2.3.13 Restriktion von DNA	56
2.2.3.14 Dephosphorylierung von 5'-DNA-Enden	57
2.2.3.15 Ligation von DNA-Fragmenten	58
2.2.3.16 Sequenzierung	59
2.2.4 Biochemische Methoden	59
2.2.4.1 Konzentrationsbestimmung von Proteinlösungen	59
2.2.4.2 Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	59
2.2.4.3 Coomassie-Färbung von SDS-Gelen	61

2.2.4.4 Western Blotting und Immunodetektion von Proteinen	61
2.2.5 Bildakquisition, -verarbeitung und -darstellung	62
2.2.5.1 Konfokale Laserscanning-Mikroskopie	62
2.2.5.2 Bildverarbeitung	62
2.2.5.3 Darstellung konfokaler Bildstapel	63
2.2.6 Statistische Auswertung	63
2.2.7 Sicherheitsbestimmungen	64
3 Ergebnisse	65
3.1 Etablierung von <i>Drosophila</i> als Modell für die Erforschung humaner Gliome	65
3.1.1 Auswirkungen der Deregulation des PI3K/Akt-Signalwegs	65
3.1.1.1 Die Fehlregulation der PI3K/Akt-Signalkaskade beeinflusst die Vitalität	66
3.1.1.2 Die Fehlregulation des PI3K/Akt-Signalwegs resultiert in morphologischen Aberrationen des Nervensystems	67
3.1.1.3 Analyse der Morphologie der Augenimaginalscheibe bei Fehlregulation eines einzelnen Gens	70
3.1.1.4 Analyse der Morphologie der Augenimaginalscheibe bei simultaner Fehlregulation von zwei Genen	77
3.1.2 Carpet Glia zeigen in Augenscheiben mit Migrationsphänotyp eine aberrante Morphologie und Lokalisation	81
3.1.3 Einfluss von Akt auf die Gliazellen der Augenimaginalscheibe	86
3.1.4 Untersuchung der Funktion von PTEN	87
3.1.5 Ektopische Expression von Ras	91
3.1.6 Medikamenten-induzierte Inhibition ektopisch aktivierter Gene	93
3.2 Einfluss verschiedener Rezeptortyrosinkinasen auf Gliazellen	99
3.2.1 Ektopische Expression von EGFR und PVR in Gliazellen	100
3.2.1.1 Die Aktivierung von EGFR und PVR in Gliazellen reduziert die Vitalität	100
3.2.1.2 Analyse der morphologische Defekte bei Fehlregulation von EGFR und PVR	102
3.2.1.3 Einzelzellanalyse	105
3.2.2 Expressionsanalyse von PVR	112
3.2.3 Identifikation von Genen mit regulatorischem Einfluss auf PVR	117
3.3 Gene mit potentielltem Einfluss auf die Tumorgenese im Menschen	121
3.3.1 <i>Loco</i>	121
3.3.2 <i>Pvf1</i>	124
3.3.3 Untersuchung weiterer <i>Drosophila</i> -Homologe von in schnell migrierenden Gliomzellen herunterregulierten Genen	125

4 Diskussion	129
4.1 Mechanismen der Tumorgenese beim Menschen und bei <i>Drosophila</i>	129
4.2 Signalkaskaden mit Einfluss auf die Tumorgenese	130
4.2.1 Auswirkungen der gliaspezifischen ektopischen Expression von EGFR und PVR	131
4.2.1.1 Signalspezifität von Rezeptortyrosinkinasen	131
4.2.2 Die simultane Aktivierung der Ras- und PI3K/Akt-Signalkaskaden stimuliert die Proliferation	133
4.2.3 Die Aktivierung der PI3K/Akt-Signalkaskade stimuliert die Migration	134
4.2.4 Die Funktion von PTEN	135
4.3 Interaktionen zwischen ektopisch migrierenden Gliazellen und Neuronen	136
4.3.1 Die Funktion der Carpet Glia bei der Migration anderer Gliazellen	137
4.4 Medikamenten-induzierte Inhibition ektopisch exprimierter Gene	138
4.4.1 <i>Drosophila</i> als Modell für Medikamententests	138
4.4.2 Hemmung von EGFR und PI3K durch Gefitinib, Wortmannin und Triciribine	140
4.5 Identifikation von Genen mit regulatorischem Einfluss auf PVR	141
4.6 Untersuchung von Genen mit Deregulation in Gliomzellen in <i>Drosophila</i>	144
5 Zusammenfassung	146
6 Literaturverzeichnis	147
7 Abbildungsverzeichnis	165
8 Tabellenverzeichnis	168
9 Abkürzungsverzeichnis	170
10 Anhang	172
10.1 Sequenzdaten	172
10.2 Im Screen nach PVR-Interaktionspartnern untersuchte Stämme	174
Erklärung	183
Lebenslauf	184
Danksagung	185

1 Einleitung

Die aktive Fortbewegung einzelner Zellen oder kompletter Zellverbände ist ein zentraler Prozess während der Ontogenese und der Homöostase multizellulärer Organismen (Ribeiro *et al.*, 2003; Starz-Gaiano und Montell, 2004). Die exakte Regulation migratorischer Prozesse erfolgt durch komplexe genetische Programme, die einzelne Zellen zur Migration selektieren und Zeitpunkt und Richtung der Zellbewegung dirigieren.

Viele Zellen migrieren zum Teil über weite Distanzen von dem Ort ihrer Entstehung hin an die Stelle, an der sie für die korrekte Entwicklung und Funktion des Organismus benötigt werden, so etwa primordiale Keimzellen, Immunzellen oder Zellen des Nervensystems (Klämbt *et al.*, 1991; Choi und Benzer, 1994; Tepass *et al.*, 1994; Santos und Lehmann, 2004; Mrass und Weninger, 2006). Zellmigration ist aber auch ein kritischer Faktor bei der Pathogenese von Tumorerkrankungen. Als Beispiel ist hier die Bildung von Metastasen zu nennen, bei der sich Zellen aus dem primären Tumor lösen, andere Gewebe infiltrieren und dort sekundäre Neoplasien bilden (Fidler und Ellis, 1994; Wen und Loeffler, 2000). Ein weiteres Beispiel sind gliale Tumore des Gehirns, die zwar selten Metastasen bilden (Huang *et al.*, 1995), aber häufig lokale Invasion des umliegenden Gewebes zeigen (Pilkington, 1994; Giese und Westphal, 1996). Dabei sind die genetischen Abläufe, welche die Fortbewegung von Zellen während der normalen Entwicklung und Homöostase steuern, weitgehend mit den Mechanismen identisch, die an der Migration von Tumorzellen beteiligt sind (Fresno Vara *et al.*, 2004; Britsch, 2007; Sibilis *et al.*, 2007).

Ein repräsentatives Beispiel für die Bedeutung der kontrollierten Zellmigration während der Entwicklung, aber auch für die Auswirkungen ektopischer Zellmotilität als Folge fehlregulierter Kontrollmechanismen, bietet das Nervensystem.

1.1 Das Nervensystem von Vertebraten

Die Zellen des Nervensystems von Vertebraten haben ihren Ursprung im Neuroektoderm, das sich während der frühen Gastrulation aus dem Ektoderm bildet. Im Verlauf der weiteren Embryonalentwicklung invaginiert das Neuroektoderm, wobei

zunächst die so genannte Neuralgrube entsteht, die sich schließlich als Neuralrohr vom Ektoderm abschnürt. Das Neuralrohr, das die Anlage des zentralen Nervensystems (ZNS) darstellt, bildet im anterioren Bereich drei Vesikel (Prosencephalon, Mesencephalon und Rhombencephalon), aus denen schließlich das Gehirn hervorgeht, während der posteriore Teil sich zum Rückenmark entwickelt. Zwischen dem Ektoderm und der Neuralgrube bildet sich die Neuralleiste, welche die Anlage des peripheren Nervensystems (PNS) ist. Aus den Zellen des Neuralrohrs und der Neuralleiste entstehen sowohl Neurone und als auch Gliazellen (McConnell, 1995; Lumsden und Krumlauf, 1996).

1.1.1 Gliazellen von Vertebraten

Gliazellen wurden erstmals 1858 von Rudolph Virchow beschrieben, der diesem neu entdeckten Zelltyp eine eher passive Rolle zuordnete. Mittlerweile ist bekannt, dass Gliazellen neben der Funktion als Stützgewebe, welche Virchow damals postulierte, auch an Stoffwechsel- und Transportprozessen, der Regulation des neuronalen Mikromilieus, der Isolation von Neuronen und der Immunabwehr beteiligt sind (Jessen, 2004). Bei Säugetieren gibt es verschiedene Arten von Gliazellen, die mit Ausnahme der hämatopoetischen Mikroglia aus multipotenten Stammzellen des Neuralrohrs und der Neuralleisten hervorgehen und als Makroglia zusammengefasst werden (Stemple und Anderson, 1992; Davis und Temple, 1994). Gelegentlich werden aufgrund ihrer Abstammung auch Ependymzellen zu den Gliazellen des ZNS gezählt. Diese gehen ebenso wie Astrozyten und Oligodendrozyten aus den neuroepithelialen Zellen der Ventrikulärzone des Telencephalons hervor und bilden eine monozelluläre Schicht, die das Hohlraumssystem im ZNS auskleidet (Morest und Silver, 2003; Liu und Rao, 2004).

Die Gliazellen von Säugetieren sind aufgrund morphologischer und funktioneller Charakteristika in vier große Gruppen einzuteilen. Dabei unterscheidet man Astrozyten, Oligodendrozyten, Mikroglia und Schwann-Zellen. Astrozyten stellen die zahlenmäßig größte Gruppe der Gliazellen im ZNS dar. Astrozyten sind große, multipolare Zellen, die mit Endothelzellen und neuronalen Zellkörpern interagieren und die Neurone mit Nährstoffen versorgen. Außerdem regulieren sie die Aktivität der Neurone, indem sie den Neurotransmitter Glutamat aufnehmen und zu Glutamin

verstoffwechseln (Rothstein *et al.*, 1994; Lehre *et al.*, 1995). Oligodendrozyten dagegen bilden die Myelinscheiden von Axonen des ZNS. Dabei ermöglichen Lücken zwischen den einzelnen myelinisierenden Oligodendrozyten die saltatorische Reizweiterleitung (Pellegrino *et al.*, 1984). Schwann-Zellen sind die Gliazellen des PNS, die von Zellen der Neuralleisten abstammen und sich kurz nach der Geburt zu den verschiedenen Untergruppen der myelinisierenden, nichtmyelinisierenden und perisynaptischen Schwann-Zellen differenzieren (Corfas *et al.*, 2004). Die am besten charakterisierte Gruppe sind dabei die myelinisierenden Schwann-Zellen, deren Aufgabe die Bildung von Myelinscheiden um die Axone ist (Jessen und Mirsky, 2003), ähnlich wie bei Oligodendrozyten im ZNS. Mikroglia sind im Unterschied zu allen anderen Gliazellen hämatopoetischen Ursprungs und stellen die Immunzellen des Gehirns dar (Kreutzberg, 1996; Streit, 2002).

Gliazellen nehmen also vielfältige Aufgaben bei der Homöostase des Nervensystems wahr. Fehlfunktionen dieser Zellen sind eng mit der Entstehung diverser Krankheiten verknüpft, wie etwa der Multiplen Sklerose, deren Kennzeichen ein Verlust der Myelinscheide ist (Dhib-Jalbut, 2007), der hereditären motorisch-sensiblen Neuropathie Typ I (HMSN I), bei der infolge von Schädigungen der Myelinscheiden oder der Axone eine progressive Muskelatrophie erfolgt (Berger *et al.*, 2006), oder der Pelizaeus-Merzbacher Krankheit, einer Leukodystrophie, die mit einer Reduktion von Oligodendrozyten und Hypomyelinierung einher geht (Garbern, 2007). Darüber hinaus können diverse genetische Aberrationen in Gliazellen zur Entstehung von Tumoren führen (James und Collins, 1992).

1.2 Die Entstehung und Behandlung maligner Tumore

In der Medizin dient der Begriff „Krebs“ als Synonym für maligne Neoplasien und wird als Sammelbegriff für verschiedene Krankheiten verwendet, die als gemeinsame Kennzeichen unkontrollierte Zellteilung, Unabhängigkeit von Wachstumsfaktoren und Resistenz gegenüber apoptotischen Signalen aufweisen (Hanahan und Weinberg, 2000). Die Entstehung von Krebs ist ein komplexer, vielschrittiger Prozess, der durch Akkumulation von chromosomalen Aberrationen ausgelöst wird. Dabei kann es sich um Mutationen einzelner Gene handeln, beispielsweise des p53-Locus (Watanabe *et al.*, 1997) oder um Duplikationen oder Deletionen bestimmter Teile von

Chromosomen. Typische Beispiele sind hier die Duplikation von Teilen des siebten oder der Verlust von Teilen des zehnten Chromosoms (Nishizaki *et al.*, 1998; Kunwar *et al.*, 2001).

Tumore können bei Menschen jeden Alters auftreten, wobei das Risiko der Erkrankung bei den meisten Tumorarten mit zunehmendem Alter steigt. So sind von den in Deutschland jährlich etwa 400.000 neuen Krebsfällen 75 % der Patienten älter als 60 Jahre („Krebs in Deutschland“, Robert-Koch-Institut). Der Entstehung von malignen Neoplasien liegt insbesondere bei älteren Patienten ein progressiver Prozess zugrunde, bei der genetische Läsionen oft über mehrere Jahre akkumulieren (Reya *et al.*, 2001). Maligne Tumore treten auch bei Kindern auf, wobei sich das Diagnosespektrum gänzlich von dem bei Erwachsenen unterscheidet. Die häufigsten Arten sind hier Leukämien (34 %), ZNS-Tumore (22 %) und Lymphome (12 %), während bei Erwachsenen vor allem Prostatakrebs bei Männern (33 %) bzw. Brustkrebs bei Frauen (32 %), sowie Lungen- (13 % bei Männern und 12 % bei Frauen) und Darmkrebs (10 bzw. 11 %) diagnostiziert wird (Jemal *et al.*, 2005). Maligne Hyperplasien des ZNS treten lediglich bei 2 % der Krebspatienten auf, haben allerdings im Vergleich zu anderen Krebsarten eine äußerst schlechte Prognose (Prados und Levin, 2000).

1.3 Eigenschaften und Klassifikation von glialen Tumoren des Nervensystems

Gliale Tumore des Gehirns, die so genannte Gliome, sind mit etwa 50 % der häufigste Typus aller primären intrakraniellen Tumore bei Erwachsenen. Im Vergleich dazu machen neuronale Tumore weniger als 0,5 % aller im Gehirn auftretender Tumore aus (Jänisch und Staneczsek, 1988, Kleihues *et al.*, 2000).

Die drei wichtigsten Untergruppen der Gliome sind Astrozytome (60 - 70 %), Oligodendrogliome (10 - 30 %) und Ependymome (10 %). Da maligne Neoplasien des ZNS oft ein breites Spektrum morphologischer Charakteristika zeigen, wird die Klassifikation anhand einzelner Bereiche vorgenommen, die als typisch für den entsprechenden Tumor angesehen werden. So zeigen die Zellen von Astrozytomen, Oligodendrogliomen und Ependymomen charakteristische Merkmale von Astrozyten, Oligodendrozyten bzw. Ependymzellen (Ohgaki und Kleihues, 2005a und 2005b).

Von zentraler Bedeutung für die Diagnose des Patienten ist die Malignität einer Neoplasie. Die Weltgesundheitsorganisation (WHO) unterscheidet je nach Tumorart bis zu vier verschiedene Stufen. Gruppe I entspricht dabei den am wenigsten aggressiven und Gruppe IV den bösartigsten Tumoren. Die Einteilung erfolgt anhand von histologischen Kriterien wie nukleärer Atypie, mitotischer Aktivität, Angiogenese und Nekrose (Louis *et al.*, 2007). Die Merkmale für die Zuordnung zu den einzelnen Stufen sind nicht für alle Tumorarten gleich, so dass zunächst eine Klassifikation des Tumors erforderlich ist, bevor die Bösartigkeit bestimmt werden kann. Anhand der Klassifikation der WHO werden beispielsweise Astrozytome in vier verschiedenen Kategorien eingeteilt, wobei pilozytische Astrozytome die am wenigsten aggressiven Tumore darstellen (WHO Grad I), gefolgt von diffusen Astrozytomen (WHO Grad II), anaplastischen Astrozytomen (WHO Grad III) und schließlich Glioblastomen (WHO Grad IV). Glioblastome (Glioblastoma multiform, GBM) repräsentieren etwa 50 % aller Astrozytome und stellen damit die größte Gruppe glialer Tumore bei Erwachsenen dar (Kleihues *et al.*, 2000). Abgesehen von pilozytische Astrozytomen neigen alle astrozytischen Tumore zu diffuser Infiltration des umliegenden Gewebes und einer progressiven Entwicklung hin zu einem maligneren Phänotyp, der sich insbesondere durch ein gesteigertes migratorisches Potential auszeichnet (Claes *et al.*, 2007). Die Zeit der Entwicklung von einem anaplastischen Gliom hin zu einem GBM beträgt im Schnitt etwa zwei Jahre, während die Progression eines diffusen Astrozytoms zu einem GBM etwa fünf Jahre dauert (Ohgaki und Kleihues, 2005b). Solche Glioblastome, die sich aus einem niedriggradigen Tumor entwickeln, werden als sekundäres Glioblastom bezeichnet und unterscheiden sich von primären Glioblastomen vor allem im Genexpressionsmuster (Furuta *et al.*, 2004; Tso *et al.*, 2006).

1.4 Tumore bei *Drosophila*

Bei *Drosophila* sind zahlreiche Gene bekannt, welche die Proliferation, die Differenzierung und das Überleben von Zellen kontrollieren, und deren aberrante Regulation zur Entwicklung von Tumoren führt (Gateff, 1994; Logan und Nusse, 2004; Brumby und Richardson, 2005; Hooper und Scott, 2005). Da *Drosophila* eine durchschnittliche Lebenserwartung von etwa 50 - 60 Tagen hat, ist die Akkumulation

mehrerer Mutationen in einer Zelle auf natürlichem Weg eher selten. Die Ursache eines tumorähnlichen Phänotyps ist deshalb meist ein einzelner genetischer Defekt. Die Eigenschaften der betreffenden Gene entsprechen denen humaner Onkogene bzw. Tumorsuppressoren. So führen aktivierende Mutationen von *Ras* oder *Notch* sowie inhibierend wirkende Veränderungen von *warts (wts)*, *fat (ft)*, oder *hyperplastic discs (hyd)* zu verstärktem Gewebewachstum, verursacht durch zusätzliche Zellteilungen. Dabei bleibt die Gewebeintegrität jedoch stets erhalten (Gateff, 1994; Brumby und Richardson, 2005; Uhlirova *et al.*, 2005; Ferres-Marco *et al.*, 2006). Im Gegensatz dazu resultiert der Funktionsausfall von *lethal giant larvae (lgl)*, *scribble (scrib)*, *discs large (dlg)* oder *brain tumor (brat)* sowie eine Aktivierung von *PDGF- and VEGFR receptor related (pvr)* in einem Verlust der Zellpolarität und der interzellulären Kontakte in Kombination mit gesteigerter Proliferation, wodurch die Organisation des Gewebes erheblich gestört wird (Rosin *et al.*, 2004; Caussinus und Gonzalez, 2005). Darüber hinaus verleiht der Funktionsverlust von *lgl*, *scrib* oder *brat* den betroffenen Zellen auch die Fähigkeit zur Migration, wobei jedoch keine Metastasen außerhalb der betroffenen Gewebe entstehen. Die Transplantation von *lgl*-, *dlg*- und *brat*-defizienten neuronalen Zellen in andere Gewebe resultiert allerdings in Metastasenbildung (Woodhouse *et al.*, 1998). Diese Eigenschaften unterscheiden die neoplastischen von den zuvor genannten hyperplastischen Mutationen (Gateff, 1994; Bilder und Perrimon, 2000; Bilder, 2004). *Drosophila* hat also verschiedene Gene, die Eigenschaften von humanen Tumorsuppressoren und Onkogenen zeigen.

1.5 *Drosophila* als Modellsystem für die Erforschung humaner Krankheiten

Eine interessante Alternative zu den in der medizinischen Forschung üblicherweise verwendeten Zellkulturzellen oder Mausmodellen stellt die Verwendung von *D. melanogaster* als Modellsystem dar. *Drosophila* bietet einerseits eine ausreichende genetische Homologie zu Säugetieren (Rubin *et al.*, 2000), ist andererseits aber wesentlich leichter und schneller zu manipulieren. Darüber hinaus gibt es verschiedene genetische Werkzeuge wie etwa das UAS/Gal4- oder das FLP/FRT-System, welche die Manipulation des Genoms einzelner Zellen erlauben

(Brand und Perrimon, 1993; Xu und Rubin, 1993). Aufgrund der kurzen Generationszeit ist außerdem die Analyse multipler genetischer Läsionen ohne weiteres möglich.

Die Analyse des Genoms von *D. melanogaster* hat gezeigt, dass etwa 62 % der humanen Gene, die mit der Entstehung von Krankheiten in Zusammenhang gebracht werden, zumindest ein Homolog in der Fruchtfliege haben (Rubin *et al.*, 2000; Reiter *et al.*, 2001). Darunter befinden sich auch zahlreiche Homologe bekannter Onkogene und Tumorsuppressoren, wie etwa Ras, PTEN oder p53 (Fortini *et al.*, 2000; Potter *et al.*, 2000; Bier, 2005). Darüber hinaus wurden in *Drosophila* Gene identifiziert, deren humane Homologe eine Funktion bei der Entstehung von Krebs haben könnten, jedoch noch nicht weiter charakterisiert wurden (Tapon *et al.*, 2001; Brumby *et al.*, 2004). Gelegentlich sind die Homologien sogar ausreichend groß, dass sich Gene aus einem Organismus funktionell durch ihre Gegenstücke aus einem anderen Organismus ersetzen lassen (Padgett *et al.*, 1993; Chan *et al.*, 2005).

1.5.1 Etablierte *Drosophila*-Modelle zur Erforschung von Krankheiten

Es gibt verschiedene *Drosophila*-Modelle, welche die Symptome bzw. einzelne Aspekte von humanen Krankheiten kopieren, und zur Erforschung der zellulären Mechanismen, die den betreffenden Krankheiten zugrunde liegen, genutzt werden (Muqit und Feany, 2002; Vidal und Cagan, 2006; Ruden *et al.*, 2007). Dabei werden in der Regel gezielt solche Gene manipuliert, die im Menschen das entsprechende Krankheitsbild auslösen. So können beispielsweise typische Kennzeichen von Parkinson, wie etwa eine progressive Degeneration von dopaminergen Neuronen und die Entwicklung von zytoplasmatischen α -Synuclein-Aggregaten durch die Expression einer mutanten Form des humanen α -Synuclein in *Drosophila* hervorgerufen werden (Feany und Bender, 2000).

Für die Erforschung der genetischen Mechanismen der Alzheimer-Pathogenese gibt es mehrere *Drosophila*-Modelle. Die Entstehung von Alzheimer geht einher mit extrazellulären amyloiden Plaques sowie intrazellulären neurofibrillären Tangles, den so genannten Alzheimer-Fibrillen, die aus Aggregaten von hyperphosphorylierten Formen des mikrotubuli-assoziierten Proteins TAU bestehen. Durch die Expression

von mutanten Formen des humanen TAU in *Drosophila* kann progressive Neurodegeneration hervorgerufen werden, die allerdings nicht mit neuronaler Akkumulation von abnorm phosphoryliertem TAU einher geht (Wittmann *et al.*, 2001). Darüber hinaus können durch veränderte Expression des *Drosophila*-APP (Amyloid Precursor Protein) und ektopische Expression von mutantem humanen APP axonale Transportdefekte und gesteigerter Zelltod im larvalen Gehirn induziert werden (Gunawardena und Goldstein, 2001).

Für die Erforschung der Tumorphagenese gibt es bislang nur vereinzelte Ansätze zur Etablierung von *Drosophila*-Modellen. Beispielsweise soll der Phänotyp, der aus der Expression von Killer-of-prune entsteht, ein Modell für Neurofibromatose darstellen (Hackstein, 1992), während Mutationen des nukleären Proteins Menin spezifische Effekte der multiplen endokrinen Neoplasie Typ 1 phänokopieren sollen (Busygina *et al.*, 2004). Diese Modelle sind allerdings nur unzureichend beschrieben und haben bislang zu keinen konkreten Ergebnissen geführt. Obwohl es also *Drosophila*-Modelle für verschiedene humane Krankheiten gibt, sind bisher nur wenige Fortschritte bei der Etablierung von Modellen für spezifische Formen von Krebs zu verzeichnen.

1.6 Das Nervensystem der *Drosophila*-Larve

Für die Etablierung eines Gliommodells in *Drosophila* wurde primär das Nervensystem von *Drosophila*-Larven im dritten Larvenstadium betrachtet (Abb. 1.1). In diesem Stadium, das nach einer Entwicklungszeit von etwa fünf Tagen erreicht wird, beginnt die Differenzierung der adulten Strukturen.

Das Nervensystem der *Drosophila*-Larve umfasst das Gehirn und die peripheren Nerven, die vom Gehirn zu den einzelnen Körpersegmenten projizieren. Außerdem sind in der Larve die so genannten Imaginalscheiben vorhanden. Diese spezifizieren sich bereits im Embryo aus dem Ektoderm, und nehmen während der frühen larvalen Entwicklung durch Proliferation an Größe zu. Am Ende der larvalen Entwicklung und während der pupalen Phase erfolgt die Differenzierung zu verschiedenen adulten Strukturen. So entstehen beispielsweise aus der Augen - Antennenimaginalscheibe die Augen, Antennen, Maxillarpalpen und Ozellen der Imago (Jürgens und

Hartenstein, 1993). Ebenso werden die Beine, Flügel und Genitalien von Imaginalscheiben gebildet (Abb. 1.1).

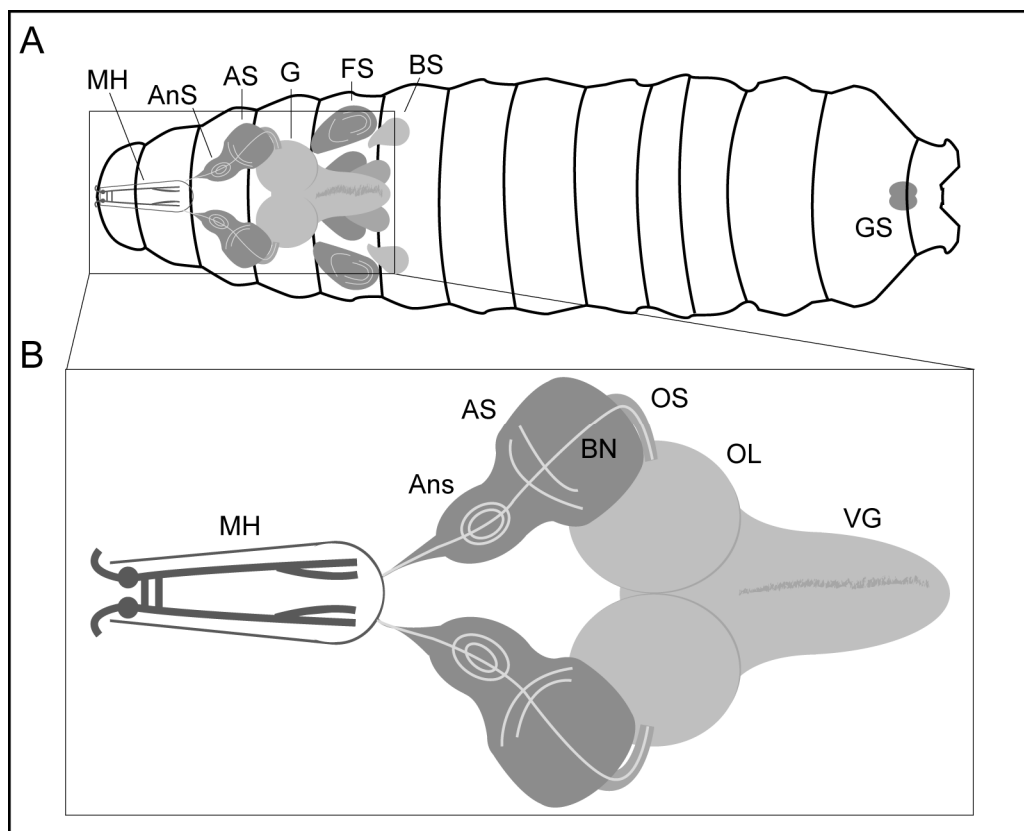


Abb. 1.1: Schematische Darstellung einer Larve des dritten Larvenstadiums mit Gehirn und Imaginalscheiben.

A Larve des dritten Entwicklungsstadiums. Dargestellt ist das Gehirn, verschiedene Imaginalscheiben sowie die Mundwerkzeuge der Larve, die so genannten Mundhaken (AnS, Antennenimaginalscheibe; AS, Augenimaginalscheibe; G, Gehirn; FS, Flügelimaginalscheibe; BS, Beinimaginalscheibe; GS, Genitalimaginalscheibe). Anterior ist links.

B Vergrößerung des Gehirns, der Augen - Antennenimaginalscheiben und der Mundwerkzeuge. Das Gehirn ist über den optischen Stiel mit den Augen-Antennenimaginalscheibe verbunden, die wiederum mit den Mundhaken in Kontakt stehen. Vom Gehirn über die Augen-Antennenimaginalscheiben verläuft der Bolwig-Nerv, der zum larvalen Sehsinnesorgan führt, dem so genannten Bolwig-Organ. (VG, Ventralganglion; OL, optischer Lobus; OS, optischer Stiel; BN, Bolwig-Nerv; AS, Augenimaginalscheibe; AnS, Antennenimaginalscheibe; MH, Mundhaken).

1.6.1 Die Augenimaginalscheibe

Während des dritten Larvenstadiums von *D. melanogaster* beginnt die Differenzierung der Imaginalscheiben, zu der in der Augenimaginalscheibe die Bildung der Photorezeptorneurone und der mit ihnen assoziierten Gliazellen gehört (Abb. 1.2).

Dazu entsteht im Epithel des Augenprimordiums zunächst am Übergang vom optischen Stiel zur Scheibe die morphogenetische Furche (MF), die sich in einer wellenartigen Bewegung von posterior nach anterior über die Augenimaginalscheibe verlagert. Im Bereich anterior der MF teilen sich undifferenzierte Zellen und generieren so die Vorläuferzellen der Retina, die sich posterior der Furche zu Photorezeptorzellen weiter entwickeln. Die Fortbewegung der Furche wird durch eine autoregulatorische Rückkopplungsschleife gesteuert, die von der Expression der Gene *hedgehog* (*hh*) und *decapentaplegic* (*dpp*) abhängig ist (Greenwood und Struhl, 1999; Fu und Baker, 2003). Die neu entstandenen Photorezeptorneurone projizieren ihre Axone nach posterior in den optischen Stiel und weiter in die Lamina bzw. die Medulla im optischen Lobus des Gehirns.

Die Gliazellen der Augenimaginalscheibe haben ihren Ursprung im optischen Stiel und wandern von dort in die Scheibe ein, wobei sie ihre Migration entlang einer Grenze posterior der MF beenden und sich weiter differenzieren (Choi und Benzer, 1994).

In der Augenimaginalscheibe kann man aufgrund der Morphologie und Position in der Scheibe sowie dem Genexpressionsmuster Populationen verschiedener Gliazellen unterscheiden (Rangarajan *et al.*, 1999; Hummel *et al.*, 2002, Silies *et al.*, 2007). Gliazellen, die aus dem optischen Stiel in Richtung der MF wandern, werden als migrierende Glia bezeichnet. Sie liegen basal der Photorezeptorneurone in der Augenimaginalscheibe und haben eine leicht elongierte, ansonsten aber sehr kompakte Form (Abb. 1.2, ①). Migrierende Glia sind perineuralen Ursprungs und haben weder Kontakt zu Axonen noch zum Epithel der Augenimaginalscheibe, sondern zu einer weiteren Population von Gliazellen, den Carpet Glia (Silies *et al.*, 2007). Diese Zellen bilden eine physische Barriere zwischen den migrierenden Glia und den Axonen der Photorezeptorneurone (Abb. 1.2, ②). In jeder Augenimaginalscheibe gibt es nur zwei Carpet Glia-Zellen, die jedoch zusammen nahezu die gesamte Fläche der bereits differenzierten Scheibe abdecken. Damit entspricht die Ausdehnung einer Carpet Glia etwa der Fläche von 10.000 Epithelzellen. Carpet Glia exprimieren das typischerweise in subperineuralen Gliazellen aktive Gen *moody* (Bainton *et al.*, 2005; Schwabe *et al.*, 2005)

Die migrierenden Glia erreichen bei ihrer Bewegung in Richtung der MF schließlich die anteriore Grenze der Carpet Glia, wo sie in Kontakt mit den Photorezeptoraxonen kommen. Als Reaktion darauf beginnen sie mit einer weiteren Differenzierung und

bilden dünne zelluläre Fortsätze aus, welche die Axone der Photorezeptorneurone umhüllen (Abb. 1.2, ③). Die Transformation von migrierenden Gliazellen hin zu umhüllenden Glia geht einher mit Veränderungen der Genexpression. Während die migrierenden Glia *c527* exprimieren, ist für die umhüllenden Glia die Expression von *Mz97* kennzeichnend (Hummel *et al.*, 2002). Bei *c527* und *Mz97* handelt es sich um zwei nicht weiter charakterisierte Gal4-Linien. Umhüllende Gliazellen haben eine sehr lang gestreckte, faserartig erscheinende Struktur und liegen apikal der Carpet Glia in der Scheibe (Abb. 1.2, ④).

Als letzte Gruppe von Gliazellen der Augenimaginalscheibe sind die Marginal Glia zu nennen, die lateral in der Scheibe zu finden sind und keinen Kontakt zu Axonen haben (Silies *et al.*, 2007).

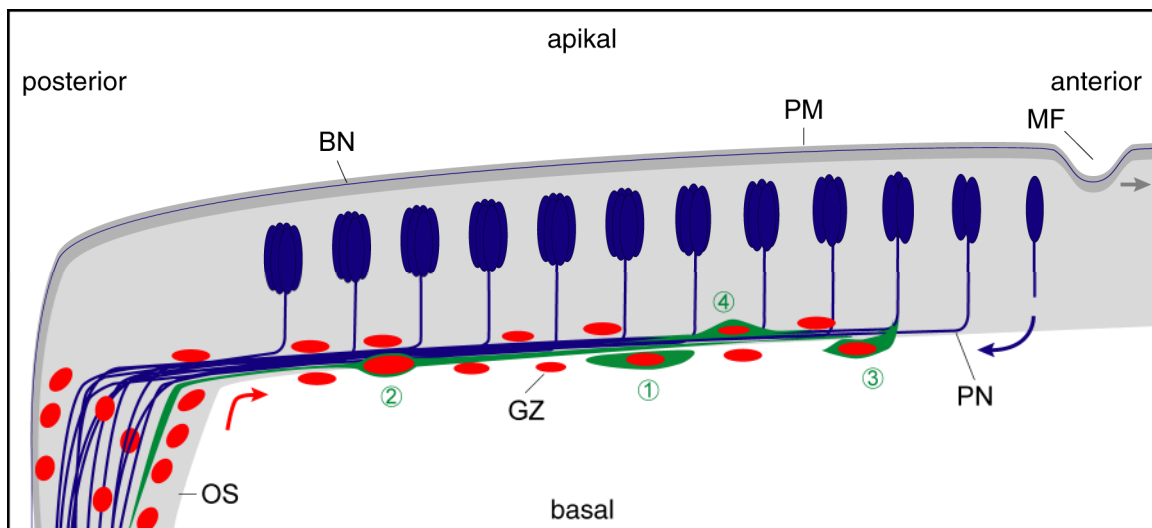


Abb. 1.2: Schematischer Querschnitt durch die Augenimaginalscheibe einer Larve des dritten Larvalstadiums.

Im Epithel der Augenimaginalscheibe differenzieren sich während des dritten Larvalstadiums im Bereich der morphogenetischen Furche, die sich von posterior nach anterior über die Scheibe bewegt, als Reaktion auf verschiedene Signaltransduktionsprozesse die Photorezeptorneurone, die ihre Axone nach posterior in den optischen Stiel projizieren. Im optischen Stiel entstehen Gliazellen, die in die Scheibe einwandern und dort mehrere Populationen bilden. Die Augenimaginalscheibe ist von der Peripodialmembran abgeschlossen, in der die Axone des Bolwig-Nerv verlaufen. OS, optischer Stiel; PM, Peripodialmembran; BN, Bolwig-Nerv; MF, morphogenetische Furche; GZ, glialer Zellkern; PN, Photorezeptorneuron.

1.6.2 Die peripheren Nerven

Die peripheren Nerven von *Drosophila* projizieren vom Gehirn in die Segmente des Körpers. Dabei sind die einzelnen Faszikel mit Gliazellen assoziiert, welche die

Axone gegen die hohe Ionenkonzentration in der Hämolymphe isolieren (Bellen *et al.*, 1998; Carlson *et al.*, 2000; Tepass *et al.*, 2001; Stork *et al.*, 2008) (Abb. 1.3).

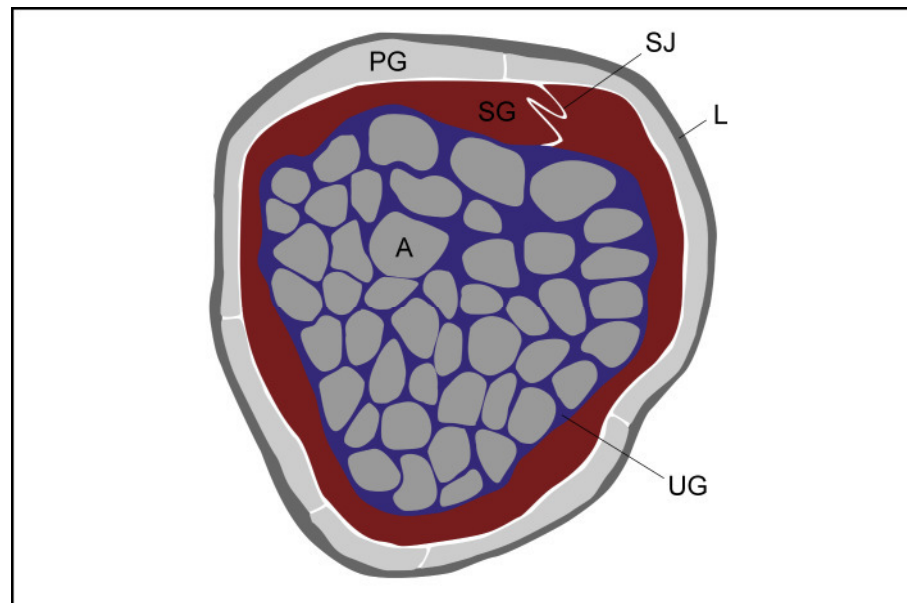


Abb. 1.3: Schematische Darstellung eines Querschnitts durch einen peripheren Nerv einer L3-Larve.

Im Inneren eines Nervs von *Drosophila* liegen die Axone, die mit umhüllenden Gliazellen assoziiert sind. Nach außen schließen sich zwei Schichten von Gliazellen an, die von den Subperineural- und Perineuralglia gebildet werden, sowie eine azelluläre Struktur aus extrazellulärer Matrix, die neurale Lamelle. A, Axon; UG, umhüllende Glia; SG, Subperineuralglia; SJ, Septate Junctions; PG, Perineuralglia; L, Lamelle.

Im Inneren eines peripheren Nervs von *Drosophila* befinden sich die Axone, die einzeln von umhüllenden Gliazellen umgeben sind (Stork *et al.*, 2008). Diese Struktur weist große Ähnlichkeiten mit der Morphologie von Remak-Fasern in Säugetieren auf, bei denen eine nichtmyelinisierende Schwann-Zelle mehrere Axone umhüllt und gleichzeitig voneinander separiert, indem sie ihr Zytoplasma zwischen den einzelnen Nervenfortsätzen ausbreitet (Nave und Salzer, 2006). In den peripheren Nerven von *Drosophila* wird das Bündel aus umhüllenden Glia und Axonen von einer Schicht aus Subperineuralglia eingeschlossen, die in einem gegebenen Bereich des Nervs meist von einer einzelnen Zelle gebildet wird. An den Kontaktstellen dieser Zelle entstehen Septate Junctions, autozelluläre Verbindungen, welche die Diffusion von Molekülen aus der Hämolymphe zu den Axonen streng limitieren und homolog zu den Tight Junctions von Vertebraten sind (Carlson *et al.*, 2000; Tepass *et al.*, 2001). Der Nerv wird nach außen von einer Schicht aus perineuralen Gliazellen begrenzt, die wiederum von der neuralen Lamelle umgeben sind, die aus extrazellulärer Matrix

besteht (Murakami *et al.*, 2007; Stork *et al.*, 2008) (Abb. 1.3). Insgesamt zeigt die Struktur eines peripheren Nervs große strukturelle Ähnlichkeit zum Aufbau des optischen Stiels.

1.7 Mechanismen der Migration

Ein essentieller Vorgang bei der Entwicklung von multizellulären Organismen ist die Fähigkeit von Zellen zur gezielten Fortbewegung, die als Migration oder Invasion bezeichnet wird. Dabei bezieht sich der Begriff der Migration allein auf die Befähigung zur Zellbewegung. Im Gegensatz dazu gehört zu invasivem Wachstum die Fähigkeit zur Penetration von anatomischen Barrieren, wie etwa Basalmembranen, interstitiellem Stroma und Interzellularbrücken (Guarino, 2007). Invasion erfordert die Adhäsion, Proteolyse der extrazellulären Matrix (ECM) und Migration, und ist bei der normalen Zellmorphogenese ebenso zu beobachten wie bei der Wundheilung und bei malignen Zellen (Uhm *et al.*, 1999; Friedl und Wolf, 2003). Migration besteht aus verschiedenen sich wiederholenden Schritten. Zunächst bilden sich durch Reorganisation des Aktinzytoskeletts Pseudopodien an der migratorischen Front, die sich dann mit Hilfe von Integrin-vermittelten Kontakten ans Substrat anheften. Im nächsten Schritt wird durch Aktin/Myosin-Interaktionen der Zellkörper nachgezogen, und schließlich werden an der hinteren Kante der Zelle die Kontakte zum Substrat gelöst (Lauffenburger und Horwitz, 1996; Yamazaki *et al.*, 2005).

Bei der Migration von Zellen durch ein dreidimensionales Gewebe stellt die ECM eine physische Barriere dar. Die ECM des ZNS besteht hauptsächlich aus Proteoglycan, Glycoproteinen und Hyaluronsäure (Bosman und Stamenkovic, 2003). Fibrilläre Glycoproteine wie Fibronectin und Laminin werden während der Entwicklung verstärkt produziert und dienen als dreidimensionale Matrix für die Migration und Orientierung von Neuronen und Gliazellen (Novak und Kaye, 2000). Die ECM wird vor allem durch die Aktivität von Plasminogenaktivatoren und Matrix-Metalloproteinasen (MMP) ständig erneuert (Gottschall und Deb, 1996; Lo *et al.*, 2002).

Zellen verwenden verschiedene Mechanismen, um die Barrieren, welche durch die ECM gegeben sind, zu umgehen. Dazu gehören Formänderungen sowie

Remodellierung und Degradation der Matrix durch sekretierte Proteasen. Die beiden letzten Modelle führen zu irreversiblen Veränderungen der Matrixstruktur. Die Migration von T-Zellen und humaner neutrophiler Zellen erfolgt beispielsweise ohne Matrixdegradation. Neutrophile Zellen bewegen sich entlang von Fasern, indem sie Membranprotrusionen ausbilden, die sich an der Matrix verankern und so einen Ansatzpunkt für kontraktile Kräfte bieten, welche zu einer Translokation der Zelle führen. Die Zellform wird dabei entsprechend den Eigenschaften der Matrix angepasst (Mandeville *et al.*, 1997). T-Zellen vermeiden darüber hinaus Bereiche mit geringerer Maschenweite, indem sie die Route ihrer Migration ändern (Friedl *et al.*, 1998). In beiden Fällen werden also Lücken in der Matrix als Raum für die Migration genutzt. Wenn eine Zelle ihre Form jedoch nicht ausreichend anpassen kann oder die Maschenweite der Matrix zu gering ist, erfordert die migratorische Fortbewegung proteolytische Aktivität. Dabei erlauben membrangebundene Proteasen eine restriktive Proteolyse von Matrixfibrillen, so dass ausreichend Raum für die Migration von Zellen geschaffen wird. Eine derartige Fortbewegung wurde bisher für Fibroblasten und Endothelzellen nachgewiesen, aber auch für maligne Tumorzellen (Brooks *et al.*, 1996; D'Ortho *et al.*, 1998). Ebenso ist aber auch eine umfangreiche Degradation der Matrix durch sekretierte Enzyme möglich, ein Vorgang, der etwa bei gesteigerter Zellmigration und Neustrukturierung von Gewebe während der Morphogenese, Wundheilung oder Tumordinvasion erfolgt (Ohgoda *et al.*, 1998). Zellen migrieren entweder einzeln oder als zusammenhängendes Kollektiv. Die Fortbewegung großer Zellgruppen geht oft einher mit umfangreicher Degradation der Matrix (Hegerfeldt *et al.*, 2002; Friedl *et al.*, 2004; Domínguez-Giménez *et al.*, 2007), während sich einzelne Zellen bevorzugt durch selektive Proteolyse von Barrieren oder durch Formveränderungen fortbewegen (Friedl *et al.*, 2001; Francis *et al.*, 2002; Guarino, 2007).

1.8 Rezeptortyrosinkinasen als Regulatoren der Zellmotilität

In *Drosophila* sind verschiedene migratorische Prozesse detailliert studiert und verstanden. Dazu gehören im Embryo beispielsweise die Migration der Hämocyten sowie die Entwicklung des Tracheensystems. In adulten Fliegen ist die Migration der

Border Cells, epithelialen Zellen der Eikammer, besonders gut charakterisiert (Ribeiro *et al.*, 2003; Montell, 2006). Diesen Prozessen ist gemeinsam, dass sie zu verschiedenen Zeitpunkten durch Rezeptortyrosinkinasen (RTKs) gesteuert werden. So wird die Migration der Hämozyten im Embryo zeitweise durch PVR und seine Liganden Pvf1, Pvf2 und Pvf3 (PDGF- and VEGF-related Factor) bestimmt (Heino *et al.*, 2001; Cho *et al.*, 2002; Wood *et al.*, 2006). Die Entwicklung der Tracheen wird entscheidend beeinflusst durch die Expression des FGF-Rezeptors (Fibroblast Growth Factor) *Breathless* (Sutherland *et al.*, 1996; Boubé *et al.*, 2001). Bei der Migration der Border Cells sind der PVR und der EGFR (Epidermal Growth Factor Receptor) von entscheidender Bedeutung (Duchek *et al.*, 2001).

Die Funktion von RTKs, die nur in Metazoen vorkommen (Blume-Jensen und Hunter, 2001) besteht in der Regulation von Aspekten wie Wachstum, Differenzierung, Adhäsion, Migration und Apoptose, die für die Organisation von multizellulären Organismen von größter Bedeutung sind (Hunter, 2000; Schlessinger, 2000). RTKs sind hoch konserviert und wurden in nahezu allen Gattungen mehrzelliger Tiere nachgewiesen (Suga *et al.*, 1997; Rikke *et al.*, 2000). Rezeptortyrosinkinasen sind Transmembranproteine, die aus einem extrazellulären Teil, einer Transmembrandomäne und einer intrazellulären Tyrosinkinasedomäne bestehen (Ullrich und Schlessinger, 1990; Hanks und Quinn, 1991) (Abb. 1.4).

Die Autophosphorylierung von Rezeptortyrosinkinasen aktiviert Signalkaskaden wie z. B. den Ras/Raf/MAPK-, den PI3K/Akt- oder den STAT-Signalweg (Meyer *et al.*, 1994; David *et al.*, 1996; Gabay *et al.*, 1996; Klinghoffer *et al.*, 1996; Kouhara *et al.*, 1997). Dabei existiert für eine gegebene RTK kein festgelegter Reaktionspartner für die Weiterleitung von Signalen (Schlessinger, 2004), vielmehr wird die Spezifität der Signaltransduktion durch Konzentration sowie zeitliche und räumliche Verteilung der Rezeptoren, ihrer Liganden und ihrer intrazellulären Ziele erreicht (Bhalla *et al.*, 2002; Whitehurst *et al.*, 2004).

Beim Menschen sind 58 verschiedene RTKs beschrieben (Plowman *et al.*, 1999; Robinson *et al.*, 2000). Zwei Vertreter dieser Familie, die in vielen humanen Tumoren durch gesteigerte Aktivität auffallen, sind der EGFR und der PDGFR (Platelet Derived Growth Factor Receptor) (Abb. 1.4). In hochgradigen Astrozytomen liegt häufig eine Amplifikation des EGFR-Locus vor. (Bigner *et al.* 1990). So wurden in bestimmten Tumoren pro Zelle bis zu 15 Kopien des Gens gefunden (Velu, 1990).

Der PDGFR dagegen zeigt meist in niedriggradigen Astrozytomen gesteigerte Aktivität (Heldin und Westermark 1991; Claesson-Welsh, 1994).

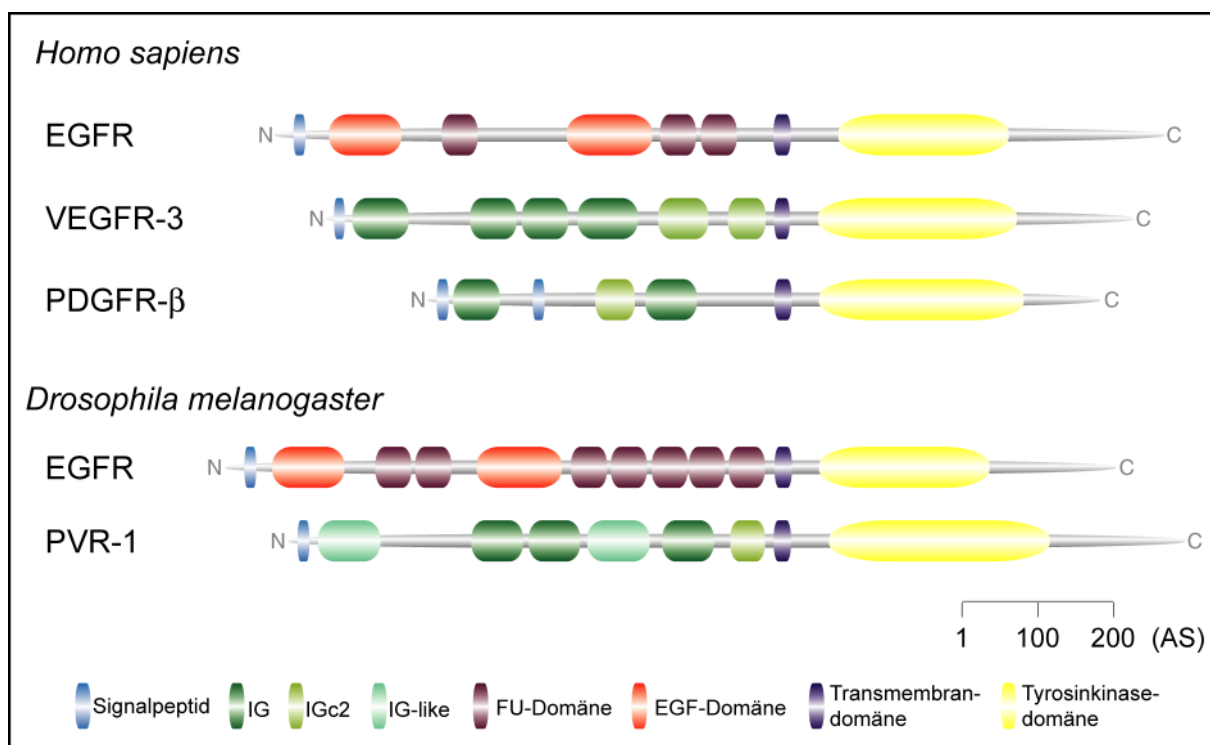


Abb. 1.4: Domänenstruktur von EGFR und PDGFR des Menschen und der *Drosophila*-Homologe.

Der Vertreter der humanen EGF-Rezeptorfamilie mit der größten Homologie zu dem EGF-Rezeptor von *Drosophila* ist EGFR, der dieser Gruppe von Rezeptoren auch den Namen gegeben hat. Für beide Rezeptoren ist eine Anzahl von Cystein-reichen Bereichen in der extrazellulären Domäne kennzeichnend. PVR-1 hat zu VEGFR-3 und PDGFR-β die größten Homologien, wobei es gleichzeitig auch das einzige Homolog dieser beiden humanen Rezeptorfamilien in *Drosophila* darstellt. Für diese RTKs sind Immunglobulin- und Immunglobulin-ähnliche Domänen im extrazellulären Teil des Proteins typisch. (IG, Immunglobulin; IGc2, Immunglobulin C-2; IG-like, Immunglobulin-ähnlich; FU, Furin-ähnliche Cystein-reiche Region).

1.8.1 Der PI3K/Akt-Signalweg: *downstream* von RTKs

Die Aktivierung von EGFR und PDGFR führt intrazellulär zur Stimulation verschiedener Signalwege, wie etwa der PI3K/Akt-Signalkaskade (Datta *et al.*, 1997; Vivanco und Sawyers, 2002). Eine vereinfachte Übersicht über die zentralen Komponenten dieses Signalwegs ist in Abbildung 1.5 dargestellt.

Störungen des PI3K/Akt-Signalwegs sind mit der Entwicklung von Krankheiten assoziiert, zu denen *Diabetes mellitus*, Autoimmunkrankheiten oder maligne Neoplasien gehören (Chan *et al.*, 1994; Hunter, 1997; Vivanco und Sawyers, 2002;

Di Cristofano *et al.*, 1999; Nicholson und Anderson, 2002; Testa und Bellacosa, 2001). Der PI3K/Akt-Signalweg ist die am häufigsten betroffene Signalkaskade in allen sporadisch auftretenden Arten von Krebs beim Menschen (Hay, 2005; Samuels und Ericson, 2006) (Abb. 1.5).

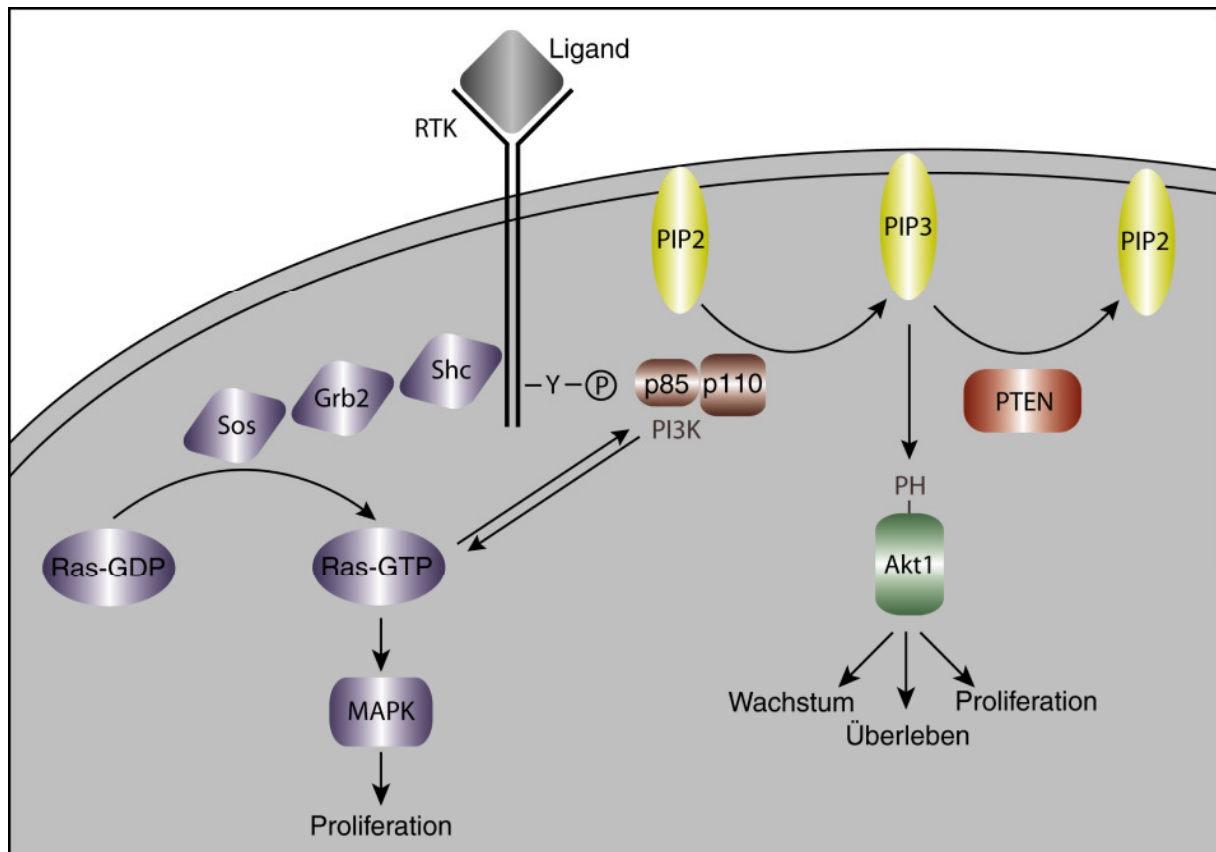


Abb. 1.5: Vereinfachtes Schema der Interaktion zwischen Rezeptortyrosinkinase und ihren Effektoren PI3K und Ras.

Die durch RTKs aktivierten Signalwege bilden ein kompliziertes Netzwerk, dessen einzelne Bestandteile sich gegenseitig regulieren. Um eine bessere Übersicht zu erlauben, wurden in dem dargestellten Schema nur die für diese Arbeit unmittelbar relevanten Komponenten aufgezeigt.

Die Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI3K) wird durch Bindung an RTKs, aber auch durch Interaktion mit Ras aktiviert (Katso *et al.*, 2001; Vanhaesebroeck *et al.*, 1999). Eine zentrale Funktion von PI3K ist die Phosphorylierung von PIP2 (Phosphatidylinositol-4,5-Bisphosphat) zu PIP3 (Phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphat), das von PTEN wieder zu PIP2 hydrolysiert wird (Maehama und Dixon, 1998). Der *second messenger* PIP3 bindet an die PH-Domäne von Akt. Aus dieser Interaktion resultiert eine Konformationsänderung von Akt und die Translokation zur Plasmamembran, wo das konstitutiv aktive PDK1 (Phosphoinositide-Dependent Protein Kinase-1) lokalisiert ist, das Akt durch Phosphorylierung aktiviert.

1.9 Zielsetzung der Arbeit

In dieser Arbeit sollte zunächst *Drosophila* als Modellsystem für die Erforschung glialer Tumore des Menschen etabliert werden, indem durch ektopische Regulation verschiedener Gene für maligne Neoplasien typische Phänomene wie hyperplastisches Wachstum und ektopische Migration induziert wurden. Im nächsten Schritt wurden diese Phänotypen durch Medikamente revertiert, die zur Regulation verschiedener humaner Proteine entwickelt wurden und zur Therapie von Krebspatienten eingesetzt werden. Dieser Teil der Arbeit diente dem Nachweis, dass die Homologien zwischen Signaltransduktionsprozessen von *Drosophila* und dem Menschen groß genug sind, um eine Verwertung der in *Drosophila* gewonnenen Erkenntnisse für den Menschen zu erlauben.

Der zweite Teil der Arbeit hatte die Charakterisierung von Genen mit einem potentiellen Einfluss auf die Tumorgenese im Menschen als Ziel. Dabei wurden zunächst Kandidatengene in *Drosophila* untersucht, die in humanen Gliomzellen auffallend deutlich fehlreguliert waren. Im Anschluss wurde in einem gliaspezifischen RNA Interferenz-basierenden Ansatz nach weiteren Genen gescreent, deren Funktionsreduktion die λpvr -induzierten Letalität revertiert.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Chemikalien

Sofern nicht anders angegeben, wurden alle Chemikalien von den folgenden Firmen in der Qualität *pro analysis* bezogen:

Baker (Groß-Gerau)	Merck (Darmstadt)
Biomol (Hamburg)	Novartis (Basel)
Biaffin (Kassel)	Roche (Mannheim)
Bio Rad (München)	Roth (Karlsruhe)
Biozym (Hamburg)	Pharmacia/LBK (Freiburg)
Boehringer (Mannheim)	Promega (Mannheim)
Fluka (Neu-Ulm)	Serva (Heidelberg)
GIBCO/BRL (Eggenstein)	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
Invitrogen (Karlsruhe)	Stratagene (Heidelberg)
Jena Bioscience (Jena)	

Alle Lösungen für molekularbiologische Arbeiten wurden mit Reinstwasser in der Qualität von doppelt destilliertem Wasser (ddH₂O) angesetzt und autoklaviert oder steril filtriert.

2.1.2 Puffer, Medien und Lösungen

2.1.2.1 Puffer und Lösungen

Apfelsaftagarplatten	18 g Agar in 500 ml H ₂ O lösen und autoklavieren. 100 ml H ₂ O dazugeben, aufkochen. 3 ml Eisessig hinzugeben und in Schalen gießen.
----------------------	--

Ampicillin	100 mg/ml in 70 % Ethanol
BCIP-Lösung	50 mg/ml BCIP in 100 % Dimethylformamid
Chloramphenicol	100 mg/ml in 70 % Ethanol
Coomassie-Entfärbelösung	10 % (v/v) Essigsäure 50 % (v/v) Methanol
Coomassie-Färbelösung	0,1 % (w/v) Coomassie R 250 7 % (v/v) Essigsäure 50 % (v/v) Methanol
DAB	0,3 mg/ml DAB in PBS
DEPC-H ₂ O	0,1 % (v/v) DEPC in H ₂ O lösen (über Nacht), autoklavieren
<i>Drosophila</i> -Standardmedium	pro Liter Leitungswasser 8,5 g Agar und 77 g Maismehl aufkochen, 18 g Trockenhefe und 10 g Sojamehl hinzugeben, 82 g Malzextrakt und 41 g Rübensirup zufügen, auf eine Temperatur von 60 °C abkühlen lassen, 4,5 ml Propionsäure und 1/5 Esslöffel Nipagin hinzugeben
Gelladepuffer (10x)	4 M Harnstoff 50 % (w/v) Saccharose 50 mM EDTA 1 Spatelspitze Xylencyanol 1 Spatelspitze Bromphenolblau
Elektrodenpuffer (SDS-PAGE)	25 mM Tris/HCl (pH 8,3) 192 mM Glycin 0,1 % (w/v) SDS

Ethidiumbromid	10 mg/ml in H ₂ O
Hybridisierungspuffer	50 % (v/v) Formamid 5x SSC 0,1 % (v/v) Tween 20
Hybridisierungslösung (RNA <i>in situ</i> - Hybridisierung)	100 µg/ml denaturierte Lachssperma-DNA in Hybridisierungspuffer
Injektionsansatz	5 µg Vektor-DNA, 1,5 µg Helper-DNA (Laski <i>et al.</i> , 1986), 1 µl Lebensmittelfarbe, 1,5 µl 10x Injektionspuffer auf 15 µl mit H ₂ O auffüllen
Injektionspuffer (10x)	1 mM Phosphatpuffer (pH 7,4), 50 mM KCl
IPTG	200 mg/ml IPTG in H ₂ O

Isolation von Plasmid-DNA (Quiagen):

Puffer P1 (Resuspensionspuffer)	50 mM Tris-HCl (pH 8,0) 10 mM EDTA 100 µg/ml RNase A
Puffer P2 (Lysispuffer)	200 mM NaOH 1 % (w/v) SDS
Puffer P3 (Neutralisationspuffer)	3,0 M Kaliumacetat (pH 5,5)
Puffer QBT	750 mM NaCl 50 mM MOPS (pH 7,0) 15 % (v/v) Isopropanol 0,15 % (v/v) Triton X-100

Puffer QC	1 M NaCl 50 mM MOPS (pH 7,0) 15 % (v/v) Isopropanol
Puffer QF	1,25 M NaCl 50 mM Tris/HCl (pH 8,5) 15 % (v/v) Isopropanol
LB-Agarplatten	5 g Agar pro Liter LB-Medium zur Selektion Zugabe von 100 µg/ml Ampicillin oder 25 µg/ml Chloramphenicol pro Liter LB- Medium; für Blau/Weiß-Selektion Zugabe von 0,1 mg/ml IPTG und 0,04 mg/ml X-Gal pro Liter LB-Medium
LB-Medium	10 g Bacto Trypton 5 g Bacto Yeast Extract 10 g NaCl auf 1 Liter mit H ₂ O auffüllen auf pH 7,0 einstellen und autoklavieren
Lysispuffer	0,1 M Tris/HCl (pH 9,0) 0,1 M EDTA 1 % (w/v) SDS
Natriumhypochloritlösung	10-15 % (v/v) aktives Chlor (NaOCl) 1:1 mit Leitungswasser verdünnen
NBT-Lösung	75 mg/ml NBT in 70 % (v/v) Dimethylformamid
NBT-Puffer	100 mM NaCl 50 mM MgCl ₂ 100 mM Tris/HCl (pH 9,5)

PBS	130 mM NaCl 7 mM Na ₂ HPO ₄ 3 mM KH ₂ PO ₄ 2,7 mM KCl (pH 7,6)
PBT	0,3 % (v/v) Triton X-100 in PBS
PBT _{Tween}	0,1 % (v/v) Tween 20 in PBS
Ponceau S -Färbelösung	3 % (v/v) Essigsäure und 0,3 % Ponceau S
<i>rich medium</i>	10 g Bacto Trypton 5 g Bacto Yeast Extract 5 g NaCl auf 1 Liter mit H ₂ O auffüllen auf pH 7,0 einstellen und autoklavieren 2 g Glucose zugeben
RNase-Wasser	0,2 µg/ml DNase-freie RNase in H ₂ O
SB-Medium	35 g Bacto Trypton 20 g Bacto Yeast Extract 5 g NaCl auf 1 Liter mit H ₂ O auffüllen auf pH 7,0 einstellen und autoklavieren
SDS (10 %)	10 % (v/v) Natriumdodecylsulfat
SDS-Probenpuffer (2x)	0,125 M Tris/HCl (pH 6,8) 4 % (w/v) SDS 20 % (v/v) Glycerol 0,02 % (w/v) Bromphenolblau 0,2 M Dithiothreitol

SDS - PAGE:

2x SDS-Probenpuffer	0,125 M Tris/HCl (pH 6,8) 4 % (w/v) SDS 20 % (v/v) Glycerol 0,02 % (w/v) Bromphenolblau 0,2 M Dithiothreitol
4x Sammelgelpuffer	0,5 M Tris/HCl, pH 6,8
4x Trenngelpuffer	1,5 M Tris/HCl, pH 8,8
Elektrodenpuffer	25 mM Tris/HCl (pH 8,3) 192 mM Glycin 0,1 % (w/v) SDS
SSC (20x)	2 M NaCl 0,3 M Natriumcitrat
ssDNA	10 mg/ml Lachssperma-DNA (<i>salmon sperm</i>) in DEPC-H ₂ O
STET-Puffer	8 % (w/v) Saccharose 5 % (v/v) Triton X-100 50 mM EDTA 50 mM Tris/HCl (pH 8,0)
TBE	89 mM Tris/HCl (pH 8,2) 89 mM Borsäure 2 mM EDTA
TE	10 mM Tris/HCl (pH 8,2) 1 mM EDTA

Transferpuffer (Western Blotting)	25 mM Tris/HCl (pH 8,2 - 8,4) 129 mM Glycin 10 % (v/v) Methanol
Tris/HCl	1 M Trisbase mit HCl auf gewünschten pH-Wert einstellen
X-Gal-Färbelösung	10 mM PO ₄ (pH 7,2) 150 mM NaCl 1 mM MgCl ₂ 3 mM K ₄ [FeII(CN) ₆] 3 mM K ₃ [FeIII(CN) ₆] 3 % (v/v) Triton X-100
X-Gal-Lösung (2 %)	20 mg/ml X-Gal in Dimethylformamid
2x YT	16 g Bacto Trypton 10 g Bacto Yeast Extract 5 g NaCl auf 1 Liter mit H ₂ O auffüllen auf pH 7,0 einstellen und autoklavieren

2.1.3 Fliegenstämme

Im Folgenden sind die Stämme aufgelistet, die während dieser Arbeit verwendet wurden und in der Ergebnisdokumentation genannt werden.

2.1.3.1 Balancer- und Wildtypstämme

Stamm	Beschreibung	Referenz/Herkunft
w ¹¹¹⁸	w ⁻	Lindsley und Zimm, 1992
w ⁻ ; CyO/Sp; TM2/MKRS	weißer Doppelbalancer 2./3. Chromosom	Klämbt, unveröffentlicht
w ⁻ ; CyO ^{P[ry+, elav-lacZ]} /Sp; TM2/TM6B ^{P[w+, Ubx-lacZ]}	blauer Doppelbalancer 2./3. Chromosom	Klämbt, unveröffentlicht
w ⁻ ; +/+; TM3/TM6B	Doppelbalancer 3. Chromosom	Klämbt, unveröffentlicht
w ⁻ ; noc ^[Sco] /CyO ^{P[[w+mC]ActGFP]JMR1} , +/+	GFP Doppelbalancer 2. Chromosom	Bloomington Stock Center
w ⁻ ; +/+; Df(3L)Ly, sensLy-1/TM6B ^{P[Ubi-GFP.S65T]PAD2, Tb1}	GFP Doppelbalancer 3. Chromosom	Bloomington Stock Center

2.1.3.2 Gal4- und FLP-Aktivatorlinien

Stamm	Expressionsmuster/ Promotor	Insertion/ Chromosom	Referenz/Herkunft
c527Gal4	nicht bekannt	2	Hummel <i>et al.</i> , 2002
daGal4	daughterless	3	Wodarz <i>et al.</i> , 1995
moodyGal4	moody	2	Schwabe <i>et al.</i> , 2005

<i>Mz97Gal4</i>	nicht bekannt	2	Ito <i>et al.</i> , 1995
<i>repoGal4</i>	<i>reversed polarity</i>	2 (Enhancer Trap)	Lee und Jones, 2005
<i>repoGal4</i>	<i>reversed polarity</i>	3 (Promotorfusion)	Sepp <i>et al.</i> , 2001

2.1.3.3 UAS Effektorlinien

Stamm	Insertion (Chromosom)	Beschreibung (Gen)	Referenz/Herkunft
UAS <i>Akt1</i>	2	wildtypisches Akt	Bloomington Stock Center
UAS <i>Akt1</i> ^{dsRNA}	3	RNA Interferenz	RNAi Stock Center (Wien), ID 2902
UAS <i>CG10772</i> ^{dsRNA}	3	RNA Interferenz	RNAi Stock Center (Wien), ID 22853
UAS <i>CG1771</i> ^{dsRNA}	X	RNA Interferenz	RNAi Stock Center (Wien), ID 5671
UAS <i>CG1897</i> ^{dsRNA}	3	RNA Interferenz	RNAi Stock Center (Wien), ID 7791
UAS <i>CG31871</i> ^{dsRNA}	2	RNA Interferenz	RNAi Stock Center (Wien), ID 51242
UAS <i>CG6622</i> ^{dsRNA}	3	RNA Interferenz	RNAi Stock Center (Wien), ID 27696
UAS <i>CG7103</i> ^{dsRNA}	3	RNA Interferenz	RNAi Stock Center (Wien), ID 6173
UAS <i>λtop</i>	3	konstitutiv aktiver EGFR	Queenan <i>et al.</i> , 1997
UAS <i>λhtl</i>	3	konstitutiv aktiver Htl	Michelson <i>et al.</i> , 1998
UAS <i>loco</i> ^{dsRNA}	2	RNA Interferenz	RNAi Stock Center (Wien), ID 9248
UAS <i>loco</i> ^{dsRNA}	2 / 3	RNA Interferenz	diese Arbeit
UAS <i>PI3K</i> ^{92E}	2	wildtypische PI3K ^{92E}	Bloomington Stock Center

UAS <i>pvr</i> / (CyO)	2	wildtypischer PVR	Duchek <i>et al.</i> , 2001
UAS λ <i>pvr</i> / (CyO)	2	konstitutiv aktiver PVR	Duchek <i>et al.</i> , 2001
UAS λ <i>pvr</i> / (TM3)	3	konstitutiv aktiver PVR	Duchek <i>et al.</i> , 2001
UASp <i>pvr</i> ^{DN} / CyO	2	dominant negativer PVR	Duchek <i>et al.</i> , 2001
UASp <i>pvr</i> ^{DN} / TM3	3	dominant negativer PVR	Duchek <i>et al.</i> , 2001
UAS <i>PTEN</i> ^{dsRNA}	2	RNA Interferenz	Bloomington Stock Center
UAS <i>PTEN</i> ^{dsRNA}	3	RNA Interferenz	Bloomington Stock Center
UAS <i>ras</i> ^{64B.V14} / CyO	2	wildtypisches Ras2	Bloomington Stock Center
UAS <i>CD8GFP</i>	3	CD8 GFP	Bloomington Stock Center
UAS <i>EGFP</i>	2	enhanced GFP	Bloomington Stock Center
UAS <i>stingerGFP</i>	2	nukleäres GFP	Bloomington Stock Center

Zusätzlich zu den in dieser Tabelle aufgeführten Stämmen wurden etwa 1500 weitere Linien für den Screen nach Interaktionspartnern von PVR untersucht, die im Anhang aufgeführt sind.

2.1.3.4 Duplikationen und Defizienzen

Hier wurden für den Screen nach Genen, welche die durch die Expression von UAS λ *pvr* induzierte Letalität revertieren können, die 270 Stämme des Defizienzen-Kits verwendet, das bei dem Bloomington Stock Centers erhältlich ist. Eine Übersicht über diese Stelle findet sich im Internet (<http://flystocks.bio.indiana.edu/>).

2.1.3.5 sonstige Stämme

Stamm	Lokalisation/ Chromosom	Beschreibung/ Gen	Referenz/ Herkunft
Piggy Bac #261	2	GFP Trap	C. Klämbt, unveröffentlicht
PBac{WH}CG31871 ^{f02763}	2	P-Element- Insertion	Bloomington Stock Center
<i>repoFLP; tub>CD2>Gal4</i>	2 / 3	Flipase, Gal4 mit Excisionskassette	M. Silies, unveröffentlicht
<i>vikingGFP</i>	2	GFP	Olofsson und Page, 2005

2.1.4 Antikörper

2.1.4.1 primäre Antikörper

Bezeichnung	Typ	Verdünnung	Referenz/Herkunft
α - β -Galaktosidase	Kaninchen	1:50	Cappel
α -GFP	Kaninchen	1:500	Invitrogen
α -GFP	Maus	1:500	Invitrogen
α -HRP Cy5	Ziege	1: 200	Dianova
α -Repo	Maus	1:5	Developmental Studies/Hybridoma Bank
α -PVR	Ratte	1:200	Rosin <i>et al.</i> , 2004

2.1.4.2 sekundäre Antikörper

Spezifität	Konjugation	Verdünnung	Referenz/Herkunft
Ziege α -Maus	HRP	1:500	Dianova GmbH
Ziege α -Kaninchen	HRP	1:500 - 1:1000	Dianova GmbH
Ziege α -Kaninchen	Cy2, Cy3 oder Cy5	1:200	Dianova GmbH
Ziege α -Maus	Cy2, Cy3 oder Cy5	1:200	Dianova GmbH
Ziege α -Kaninchen	Alexa 488, 568 oder 647	1:500	Molecular Probes
Ziege α -Maus	Alexa 488, 568 oder 647	1:500	Molecular Probes
Ziege α -Digoxigenin	alkalische Phosphatase	1:2000	Roche

2.1.5 Bakterienstämme

Zur Vermehrung von Vektoren bzw. rekombinanter DNA wurden die in der Tabelle aufgeführten *Escherichia coli*-Stämme eingesetzt.

Stamm	Genotyp	Bezugsquelle
<i>E. coli</i> XL1blue	F' ::Tn10 proA+ B+ lacIq α (lacZ)M15/recA1 endA1 gyrA96 (Nalr) thi hsdR17(rK-mK+) glnV44 relA1 lac	Stratagene
<i>E. coli</i> JM109	F' traD36 proA+ B+ lacIq α (lacZ) M15/ α (lac-proAB) glnV44 e14- gyrA96 recA1 relA1 endA1 thi hsdR17	New England Biolabs

2.1.6 Vektoren

Bezeichnung	Verwendungszweck	Bezugsquelle
pGEM T-Easy	T /A-Klonierung von PCR-Produkten	Promega, Mannheim
pWiz	dsRNA-Transfektionsvektor	Lee und Carthew, 2003

2.1.7 Oligonukleotide

Alle in dieser Arbeit verwendeten Oligonukleotide wurden von der Firma ResGen (Invitrogen Corporation) bezogen.

Bezeichnung	Sequenz (5' → 3')
<i>locoRNAi forward</i>	TTGAGCGATCTAGACAGCTCTAGGT
<i>locoRNAi reverse</i>	CTCGTTGGACTTTCTAGAGCACAG
pUAST (PinwardMZ)	GAAATAACATAAGGTGGTCCCGTCC
pUAST (V75MZ)	GTCACACCACAGAAGTAAGGTTCC

2.2 Methoden

2.2.1 Genetische Methoden

2.2.1.1 Fliegenzucht

Sofern keine anderen Angaben gemacht werden, wurden alle Fliegenstämme auf Futtermedium in Standard-Plastiktöpfen bei 18 °C, Raumtemperatur, 25 °C oder 29 °C gehalten.

Für Kreuzungen wurden frisch geschlüpfte, jungfräuliche Weibchen (bis zu sechs Stunden nach Verlassen des Pupariums bei Raumtemperatur) und Männchen verschiedener Altersstufen verwendet.

2.2.1.2 Sammeln von Embryonen

Für Einzel-Eiablagen wurden die Fliegen in ein leeres, mit Luftlöchern versehenes Plastikgefäß überführt, das mit einer Apfelsaft-Agarplatte mit etwas frisch angerührter Bäckerhefe darauf verschlossen wurde. Die Apfelsaft-Agarplatte wurde alle 12 Stunden gewechselt und für maximal 12 Stunden bei 18 °C bis zur Fixierung gelagert.

2.2.1.3 Anzucht von Larven definierter Altersstufen

Für die Gewinnung von Larven definierter Altersstufen wurden Fliegen in ein leeres, mit Luftlöchern versehenes Plastikgefäß überführt, das mit einer Apfelsaft-Agarplatte mit etwas frisch angerührter Bäckerhefe darauf verschlossen wurde. Die Agarplatten wurden alle 2 - 3 Stunden gewechselt (längere Ablagen, z.B. über Nacht, wurden verworfen) und für die gewünschte Zeit bei 25 °C inkubiert.

2.2.1.4 Keimbahntransformation

Zur Keimbahntransformation wurde ein Eppendorf FemtoJet eingesetzt. Für die Injektionen wurden Glaskapillaren (Typ GC100-10) mit einem Nadelziehgerät ausgezogen und vor Gebrauch nachgeschliffen. Vor dem Einsetzen in das Injektionssystem wurde die Kapillare mit 4 µl Injektionsmix befüllt.

2.2.1.4.1 Präparation der Embryonen

Zur Gewinnung von Embryonen wurden mindestens drei Tage alte w^{1118} -Fliegen zu etwa 150 Paaren in ein leeres, mit Luftlöchern versehenes Plastikgefäß überführt, das mit einer Apfelsaft-Agarplatte mit etwas frisch angerührter Bäckerhefe darauf verschlossen wurde.

- Die Ablagen etwa alle 30 - 60 Minuten wechseln und die Embryonen darauf direkt für die Injektion vorbereiten.
- Nach der Ablage die Embryonen mit Leitungswasser waschen und in ein Blockschälchen überführen.
- Nach dem Waschen erfolgt die Dechorionisierung der Embryonen in 50 %iger Klorix-Lösung für etwa 3 1/2 Minuten.
- Die Embryonen erneut mit Leitungswasser waschen und auf einen Streifen Apfelsaftagar überführen.
- Die Embryonen mit einer stumpfen Präpariernadel so ausrichten, dass die Mikrophylen in eine Richtung zeigen.
- Aufkleben der Embryonen in ihrer definitiven Orientierung durch das vorsichtige Auflegen eines mit Heptankleber beschichteten Deckglases auf den Agarstreifen.
- Die Embryonen nun so lange trocknen, bis die Vitellinmembran beim Berühren mit der Präpariernadel reversible Falten wirft. Dies vermindert den Innendruck und somit das Risiko des Auslaufens der Embryonen bei der Injektion.
- Die getrockneten Embryonen mit luftdurchlässigem 10S-Voltalef-Fluorcarbonöl überschichten und bis zum Beginn der Injektionen in einer feuchten Kammer bei Raumtemperatur aufbewahren.

2.2.1.4.2 DNA-Mikroinjektion

- Die DNA-Lösung zentrifugieren (1 Minute bei 13.000 rpm) und 3 - 5 μ l davon in eine Befüllkapillare geben. Anschließend diese in das breite Ende der Injektionskapillare einführen, so dass die DNA-Lösung aufgrund von Kapillarkräften in die Spitze der Injektionskapillare fließt.
- Embryonen und Injektionskanüle an einem Mikroskop in einer Ebene ausrichten.
- Injektionen erfolgen in den posterioren Pol von Embryonen, die sich noch im syncytialen Blastoderm-Stadium befinden.
- Mit Hilfe des Drucksystems einen kleiner Tropfen der Injektionslösung in den Bereich der späteren Polzellen entlassen.
- Ausgelaufene oder zu alte Embryonen mit der Kapillare durchstechen und so abtöten.
- Nach der Injektion das Deckglas in ein Wägeschälchen überführen und mit 3 S-Öl (Votalef) überschichten.
- Die Embryonen bis zum Schlüpfen bei 18 °C halten.
- Geschlüpfte L1-Larven mit einer Präparationsnadel in ein Fliegenröhrchen mit *Drosophila*-Standardmedium überführen.

2.2.1.4.3 Selektion transgener Fliegen

Die geschlüpften Fliegen wurden einzeln gegen Doppelbalancer (w ; Sp/CyO;TM2/MKRS) gekreuzt. In der F1 Generation konnten die transgenen Tiere anhand der Augenfarbe (w^+) identifiziert werden. Die Stärke der Expression des w^+ Gens hängt vom Insertionsort ab, so dass die Augenfarbe zwischen gelb und rot variieren konnte.

2.2.1.4.4 Lokalisation des Insertionsortes

Zur Bestimmung des Chromosoms, auf dem die Insertion stattgefunden hatte, wurden die Transgene erneut gegen Doppelbalancer gekreuzt. Anhand der Segregation der dominanten Marker und der w^+ -Markierung der transgenen Fliegen

konnte das Chromosom, das die Insertion des jeweiligen Konstruktes trägt, identifiziert werden.

2.2.1.5 Das UAS/Gal4-System

Das UAS/Gal4-System ermöglicht die ektopische Expression von Genen in *Drosophila*. Dazu wird der in *Drosophila* natürlicherweise nicht vorkommenden Transkriptionsfaktor Gal4 aus der Hefe verwendet, dessen Expression durch einen gewebespezifischen Promotor aktiviert wird. Die UAS-Sequenz (Upstream Activator Sequence) dient als Zielsequenz für Gal4 und erlaubt die Expression des dahinter liegenden Gens. Die für Gal4 codierende Sequenz und UAS liegen getrennt in verschiedenen transgenen Linien vor. Durch Kreuzung wird das System aktiviert, wobei die Auswirkungen der ektopischen Expression in den Nachkommen zu beobachten sind.

2.2.1.6 Das FRT/FLP-System

Das FRT/FLP-System basiert auf dem sequenzspezifischen Rekombinationssystem des 2 μ M-Plasmids aus *Saccharomyces cerevisiae* und wird in *Drosophila* zur Generierung genetischer Mosaik genutzt (Golic und Lindquist, 1989; Xu und Rubin, 1993).

Dabei induziert die FLP-Rekombinase (Flipase) die Rekombination von DNA-Sequenzen, wobei als Ziel die FRT-Sequenz (Flipase Recognition Target) dient. In der hier verwendeten Version dieses Systems ermöglicht die FLP-Rekombinase die Deletion eines DNA-Abschnitts, der auf einem Chromosomenarm zwischen zwei FRT-Elementen liegt. Dabei trennt dieser DNA-Abschnitt das für Gal4 codierende Gen von seinem Promotor, so dass die Transkription von Gal4 und damit auch die Aktivierung von UAS unterbunden wird.

2.2.1.7 Generierung von GFP-Rekombinanten

In subzellulären Bereichen von Zielzellen ektopisch exprimiertes GFP kann als Epitop für immunhistochemischen Färbungen verwendet werden. Diese Methode bietet sich immer dann an, wenn ein Antikörper gegen entsprechende zelleigenen Strukturen nicht zur Verfügung steht.

Dazu wird ein entsprechender Gal4-Treiber gegen transgene UAS *GFP* Tiere gekreuzt. In der folgenden Generation können die Rekombinanten darüber identifiziert werden, dass sie GFP-Expression im Muster des Gal4-Treibers aufweisen.

2.2.1.8 Generierung von Gal4>>UAS *GFP*/Gal80^{ts}-Rekombinanten

Mitunter ist es hilfreich, ein Transgen, das unter transkriptioneller Kontrolle von UAS steht, nur zu bestimmten Entwicklungszeitpunkten aktivieren zu können. Dies wird durch den Gal4-Inhibitor Gal80 ermöglicht.

Für die Etablierung einer Dreifach-Rekombinante wurden Fliegen mit dem Genotyp *repo>>CD8GFP/TM6* gegen Fliegen mit dem Genotyp Gal80^{ts} auf dem dritten Chromosom gekreuzt und bei 18 °C gehalten. Einzelne Puppen wurden abgesammelt und unter der UV-Stereolupe auf GFP-Expression überprüft. Sofern sie GFP-negativ waren, wurden sie in eine leere Agarplatte überführt und für etwa 24 Stunden bei 29 °C inkubiert. Nun wurde erneut die GFP-Expression mit der UV-Stereolupe geprüft und solche Puppen, die GFP-positiv waren, einzeln in Futterröhrchen überführt. Nach dem Schlüpfen wurden die Fliegen entsprechend ihres Geschlechts mit Jungfrauen bzw. Männchen eines Doppelbalancer-Stammes (*w*; *CyO*/*Sp*; *TM2*/*TM6*) verpaart.

2.2.1.9 Chemische Inhibition von ektopisch exprimierten Genen

Durch Applikation von Chemikalien, die für die Behandlung von Krebspatienten entwickelt wurden, sollen die durch die ektopische Expression von Genen

verursachten Phänotypen revertiert werden. Dazu wurden die in Tabelle 2.1 aufgeführten Chemikalien in flüssiger Form dem Futterbrei zugesetzt.

Tab. 2.1: Molekulare Ziele und Funktionsweise der verwendeten Inhibitoren.

Substanz	Ziel	Wirkungsweise	Literatur	Hersteller
Gefitinib	EGFR	bindet spezifisch an die Tyrosinkinasedomäne von EGFR und blockiert so die Signaltransduktion	Cohen <i>et al.</i> , 2004	Biomol (Hamburg)
Wortmannin	PI3K	kompetitive Hemmung von p110, der katalytischen Untereinheit von PI3K; inhibiert in höheren Konzentrationen auch mTor, PI4K und MAPK	Wymann <i>et al.</i> , 1996 Vanhaesebroeck <i>et al.</i> , 2001	Biaffin (Kassel)
Triciribine	Akt	inhibiert selektiv die Phosphorylierung von Akt	Yang <i>et al.</i> , 2004	Biaffin (Kassel)

2.2.1.9.1 Experimentelle Bestimmung der maximal tolerablen DMSO-Konzentration

Das als Lösungsmittel verwendete DMSO beeinträchtigte die Vitalität der Fliegen. Deshalb wurde zunächst untersucht, welche DMSO-Konzentration für den Metabolismus der Fliegen noch zu tolerieren ist. Dabei diente die Anzahl der Larven, die sich bis zur Verpuppung entwickelten, als Indikator (Abb. 2.1).

Von je 50 Embryonen, die sich auf Futter ohne DMSO entwickelten, überlebten 73 % bis zur puppalen Phase (Abb. 2.1). Eine nur unwesentlich höhere Sterblichkeit war gegeben, wenn das Futter mit 0,1 bzw. 0,2 % DMSO versetzt wurde (72 % bzw. 68 %). Bei höheren Konzentrationen nahm die Vitalität rapide ab, von 52 % sich verpuppenden Larven bei einer DMSO-Konzentration von 0,3 % im Futter bis hin zu 38 % bei 0,5 % DMSO (Abb. 2.1). Noch höhere DMSO-Konzentrationen wurden nicht getestet.

Darüber hinaus wurde die Morphologie der Augenimaginalscheiben von Larven untersucht, die sich auf Futter mit einer DMSO-Konzentration zwischen 0,0 % bis hin zu 0,5 % entwickelt hatten. Anhand von immunhistochemischen Färbung wurden keinerlei Defekte der Imaginalscheiben gefunden.

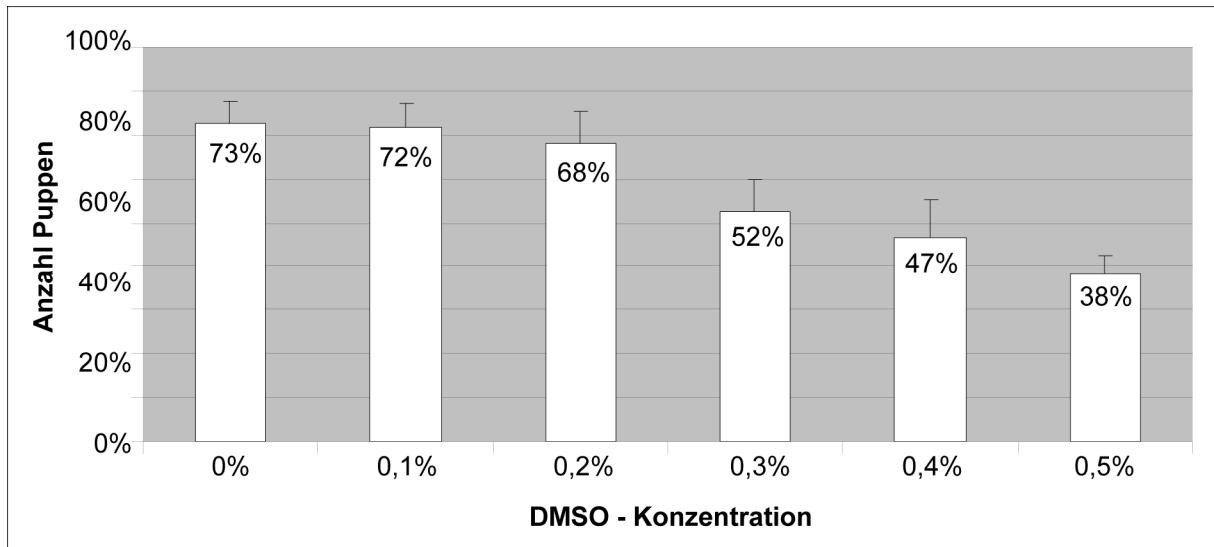


Abb. 2.1: Einfluss von DMSO auf die Vitalität von *Drosophila*.

Zur Untersuchung der Wirkung von DMSO auf die Vitalität wurden je 50 Embryonen in drei Wiederholungen auf Futter mit steigenden Konzentrationen an DMSO gesetzt und bei 25 °C inkubiert. Nach sieben Tagen wurde die Zahl der Puppen bestimmt.

2.2.1.9.2 Applikation der Inhibitoren

- 1 g Instant *Drosophila* Medium (Carolina Biological Supply, Burlington, USA) mit 5 ml H₂O anrühren und einige Minuten quellen lassen.
- Je 1 g des vorbereiteten Instantfutters in ein kleines Röhrchen geben.
- Die Inhibitoren in DMSO in einer Konzentration von 100 mM lösen.
- Für die gleichmäßige Verteilung des Inhibitors im Futter jeweils die für 1 g Instantfutter benötigte Menge der Stocklösung kurz vor der Verwendung mit soviel H₂O verdünnen, dass ein Endvolumen von 100 µl erreicht wird.
- Männchen mit dem Genotyp *repo* >> *CD8GFP* mit jungfräulichen Weibchen des Genotyps *UAS PI3K^{92E}*, *UAS λtop* verpaaren und für 24 h bei 25 °C halten. Danach nochmals 24 h bei 25 °C auf das präparierte Futter setzen.
- Die Auswertung erfolgt durch immunhistochemische Färbung des Nervensystems (Abschnitt 2.2.2.2 und 2.2.2.4).

2.2.2 Histologische Methoden

2.2.2.1 Fixierung von *whole mount Drosophila*-Embryonen für Antikörperfärbungen

- Die Embryonen von den Apfelsaftagarplatten mit PBT abspülen und vorsichtig mit einem Pinsel in ein Auffangnetz überführen.
- Inkubation in 5 % (v/v) Natriumhypochlorit für 5 Minuten zur Entfernung der Keimhülle (Chorion).
- Gründliches Waschen mit PBT.
- Embryonen in 500 µl Heptan aufnehmen und aus dem Auffangnetz in ein geeignetes Gefäß überführen (Eppendorf-Mikroreaktionsgefäß, 5 ml Glasröhrchen oder 50 ml Falcon-Tube).
- 50 µl Formaldehyd (37 %, v/v) und 450 µl PBS zufügen.
- Inkubation für 30 Minuten auf einem Schüttler.
- Die untere, aus Heptan bestehende Phase abnehmen durch Methanol ersetzen.
- Mindestens 1 Minute lang kräftig schütteln, um die Embryonen zu devittellinisieren.
- Das Gemisch einige Zeit ruhig stehen lassen, damit die Embryonen absinken.
- Die obere, aus PBS bestehende Phase sowie die Phasengrenze, in der sich die Vittellinmembranen gesammelt haben, abnehmen.
- 2x mit Methanol und 2x mit Ethanol waschen.
- Embryonen direkt weiter verwenden (Abschnitt 2.2.2.4) oder bei -20 °C bis zur weiteren Verwendung lagern.

2.2.2.2 Fixierung von L3-Imaginalscheiben und Gehirnen für immunhistochemische Färbungen

- Mit zwei Pinzetten am Mundhaken und am hinteren Ende des vorderen Drittels einer L3 Larve ansetzen und die Larve vorsichtig auseinander ziehen. Idealerweise erhält man so die Mundhaken samt Augenimaginalscheiben, optischen Loben und ZNS.
- Die so präparierten Scheiben auf Eis in PBS sammeln.

- Überführen der Imaginalscheiben in Reaktionsgefäße mit 4 % Formaldehyd/PBS.
- Fixierung in 4 % Formaldehyd/PBS für 20-30 Minuten bei RT auf einem Schüttler.
- Formaldehyd/PBS abnehmen und 3x kurz mit PBT waschen.
- 3x für 20 Minuten in PBT auf einem Schüttler waschen.
- Direkt weiter für die Antikörperfärbung verwenden (Abschnitt 2.2.2.4).
- Die weitere Präparation der Imaginalscheiben erfolgt nach Beendigung der Färbung. Dazu werden die Imaginalscheiben mittels Präpariernadeln von den übrigen Geweben getrennt.

2.2.2.3 Präparation und Fixierung des peripheren Nervensystems von L3-Larven

- Larven durch einen Hitzeschock töten (ca. 5 Sekunden bei 60 °C).
- Larve mit zwei Insektennadeln an den Mundhaken und den abdominalen Tracheenendungen fixieren.
- Mit einer Augenschere die Larve entlang der dorsalen Mittellinie von posterior nach anterior aufschneiden.
- Mit einer Pinzette vorsichtig Darm, Speicheldrüsen und Fettgewebe entfernen.
- Kutikula nach rechts und links aufklappen und mit Insektennadeln feststecken.
- Fixierung in 4 % Formaldehyd/PBS für 15 Minuten bei RT.
- Das Formaldehyd/PBS abnehmen und 3x kurz mit PBT waschen.
- Eventuell verbliebene Gewebereste mit einer Pinzette entfernen.
- Fixierte Larven in ein Eppendorf - Mikroreaktionsgefäß überführen und direkt weiter für die Antikörperfärbung verwenden (Abschnitt 2.2.2.4).

2.2.2.4 Antikörperfärbung von *Drosophila*-Embryonen oder Imaginalscheiben

- Fixiertes Gewebe 3x 20 Minuten mit PBT auf einem Schüttler bei Raumtemperatur waschen.
- Inkubation in 10 % (v/v) Goatserum (GS)/PBT für eine Stunde bei Raumtemperatur auf einem Schüttler.

- Inkubation des primären Antikörpers in geeigneter Verdünnung in 10 % (v/v) GS/PBT bei 4 °C über Nacht.
- 3x 20 Minuten mit PBT auf einem Schüttler bei Raumtemperatur waschen.
- Bei der Verwendung von Fluoreszenzantikörpern müssen alle folgenden Schritte unter Lichtabschluss erfolgen:
- Inkubation des sekundären Antikörpers in geeigneter Verdünnung in 10 % (v/v) GS/PBT für 2 Stunden bei Raumtemperatur.
- 3x 20 Minuten mit PBT auf einem Schüttler bei Raumtemperatur waschen.
- Antikörper-spezifische Nachweisreaktion (Abschnitt 2.2.2.5 - 2.2.2.7).

2.2.2.5 Alkalische Phosphatase (AP)-Färbung

- Waschen der Embryonen in NBT für 2x 5 Minuten bei Raumtemperatur.
- Inkubation in 3,5 µl/ml NBT-Lösung und 4,5 µl/ml BCIP in NBT-Puffer.
- Wenn die gewünschte Signalintensität erreicht ist, die Färbereaktion durch Waschen in PBT stoppen.

2.2.2.6 Meerrettich-Peroxidase (HRP)-Färbung

- Embryonen kurz in PBS waschen.
- Inkubation der Embryonen in 500 µl DAB-Lösung (0,3 mg/ml) und 1,5 µl H₂O₂ (30 %) in PBS.
- Stoppen der Färbereaktion durch mehrmaliges Waschen mit PBT, wenn die gewünschte Intensität erreicht ist (nach ca. 5-10 Minuten).
- 20 Minuten mit PBT auf einem Schüttler bei Raumtemperatur waschen.
- In 70 % (v/v) Glycerin überführen.

2.2.2.7 Fluoreszenz-Färbung

- Eine spezielle Färbereaktion ist nicht notwendig, die Proben werden lediglich wie oben beschrieben mit dem sekundären Antikörper inkubiert und danach gründlich gewaschen.
- Einbettung in Fluoromount für mindestens eine Stunde, dann kann eine weitere Bearbeitung erfolgen (z.B. Präparation).

2.2.2.8 *In situ*-Hybridisierung an ganzen *Drosophila*-Embryonen

Die räumliche und zeitliche Verteilung von mRNA-Transkripten während der Embryonalentwicklung von *Drosophila melanogaster* wurde durch *in situ*-Hybridisierungen an ganzen (*whole mount*) Embryonen untersucht (Tautz und Pfeifle, 1989). Diese Methode beruht auf der Bindung einer zu der zellulären mRNA komplementären Sonde, die mit Digoxigenin markiert ist und durch einen Antikörper, der mit alkalischer Phosphatase gekoppelt ist, detektiert werden kann.

2.2.2.8.1 Herstellung einer Digoxigenin-markierten RNA-Sonde

Tab. 2.2: Pipettierschema für den Reaktionsansatz zur Erzeugung von RNA-Sonden.

Komponente	Menge
linearisierte Plasmid-DNA	1 µg
10x Puffer	2 µl
Digoxigenin-RNA-Labeling-Mix	2 µl
RNA-Polymerase	2 µl
H ₂ O	ad 20 µl

Zur Herstellung von Digoxigenin-markierten RNA-Sonden wurde der Reaktionsansatz aus den in Tabelle 2.2 aufgelisteten Komponenten erstellt.

- Inkubation des Restriktionsansatzes über Nacht bei 37 °C.
- Stoppen der Reaktion durch Zugabe von 2 µl DNaseI (RNase-frei).
- Inkubation des Reaktionsgemisches für 15 Minuten bei 37 °C.
- DNase durch 2 µl EDTA (0,2 M) inaktivieren.

- 150 µl 100 % Etanol und 2,5 µl 4 M Lithiumchlorid zum Reaktionsansatz geben.
- 30 Minuten bei -70 °C inkubieren.
- Gefällte RNA durch Zentrifugation in einer Tischzentrifuge für 30 Minuten bei 15000 g pelletieren.
- Überstand abnehmen, Pellet trocknen und in 25 µl DEPC-H₂O aufnehmen.
- Zugabe von 25 µl Formamid erhöht die Stabilität der RNA-Sonde.
- Lagerung bei -20 °C oder direkt weiter verwenden.

2.2.2.8.2 Hybridisierung der *Drosophila*-Embryonen

Für die folgenden Arbeitsschritte ist es essentiell, alle Lösungen mit DEPC-H₂O anzusetzen.

- Zur Rehydrierung der fixierten, devittelinisierten Embryonen (Abschnitt 2.2.2.1) diese für 2 Minuten in 50 % (v/v) Ethanol/PBT und im Anschluss für 2x 2 Minuten in PBT waschen.
- Parallel dazu ein Wasserbad erhitzen und die Gasflamme darunter löschen, sobald dieses zu kochen beginnt.
- Inkubation der Embryonen für 6 Minuten in dem Wasserbad unter gelegentlichem Aufwirbeln.
- Ansatz für 15 Minuten auf Eis stellen.
- 2x kurz mit PBT waschen.
- Nachfixierung für 20 Minuten in PBT/5 % (v/v) Formaldehyd (865 µl PBT + 135 µl Formaldehyd).
- Zur Entfernung des Formaldehyds 3x je 10 Minuten lang mit PBT waschen.
- Embryonen für je 5 Minuten zunächst in PBT/Hybridisierungspuffer (1:1) und dann in Hybridisierungspuffer inkubieren.
- Vorhybridisierung für 80 Minuten in Hybridisierungslösung (Hybridisierungspuffer und 10 mM ssDNA) bei geeigneter Temperatur (ca. 60 °C).
- Verdünnung der RNA-Sonde (1:500 - 1:2000) in Hybridisierungslösung/ssDNA (Endvolumen: 50 µl).
- Für 2 Minuten auf 90 °C stellen und bis zur weiteren Verwendung auf Eis lagern.

- Nach erfolgter Vorhybridisierung die Hybridisierungslösung so weit wie möglich von den Embryonen abnehmen und durch die verdünnte, denaturierte RNA-Sonde ersetzen.
- Embryonen kurz durch Anschneiden mischen und über Nacht (mindestens 11 Stunden) im Wasserbad bei 60 °C inkubieren.
- Nach der Hybridisierung die Lösung so weit wie möglich von den Embryonen abnehmen.
- Waschen der Embryonen bei 60 °C zunächst in Hybridisierungspuffer für 30 Minuten, dann in Hybridisierungspuffer/PBT (1:1) (30 Minuten) und schließlich in PBT für 5x 20 Minuten.
- Waschen der Embryonen in PBT für 10 Minuten bei Raumtemperatur.
- Zugabe des sekundären α -Digoxigenin-Antikörpers (Verdünnung ca. 1:1000 - 1:2000 in PBT).
- Inkubation für 2 Stunden bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4 °C.
- Waschen der Embryonen in PBT für 5x 20 Minuten bei Raumtemperatur.
- Antikörper-spezifische Nachweisreaktion (Abschnitt 2.2.2.5 - 2.2.2.7).

2.2.2.8.3 Einbetten von *Drosophila*-Embryonen nach *in situ*-Hybridisierung

- Nach erfolgter *in situ*-Hybridisierung mit Digoxigenin-markierten RNA-Sonden wurden die angefärbten Embryonen für die mikroskopische Analyse vorbereitet.
- Embryonen in einer Alkoholreihe entwässern (50 %, 70 %, 90 %, 95 %, 100 % (v/v) Ethanol).
- Auf einem Objektträger in 1:4 Kanadabalsam-Salicylsäuremethylester einbetten.

2.2.3 Molekularbiologische Methoden

2.2.3.1 Animpfen von Selektionsplatten

- LB-Agar in der Mikrowelle aufkochen und nach Abkühlung auf ca. 60 °C mit einem Antibiotikum zur Selektion versetzen. Sollte eine Blau-/Weiß-Selektion

durchgeführt werden, wurde der Agar zusätzlich mit 0,1 mg/ml IPTG und 0,04 mg/ml X-Gal versetzt.

- Sterile Plastik-Petrischalen mit dem Agar ausgießen und zum Trocknen stehen lassen.
- Bakterien-Klone auf den Platten vereinzeln.
- Über Nacht bei 37 °C inkubieren.
- Nach der Inkubation können die Platten bei 4 °C aufbewahrt werden.

2.2.3.2 Stammanzucht und Zellernte

- Ein geeignetes Medium zur Anzucht von Bakterien mit Einzelkolonien von Agarplatten inokulieren, falls erforderlich unter Selektionsdruck.
- Bei kleineren Kulturvolumina (≤ 10 ml) erfolgt die Anzucht in Reagenzgläsern, für größere Volumina (≥ 50 ml) werden 100 ml oder 1000 ml Kolben verwendet.
- Die Kultivierung der Zellen erfolgte in Form einer Vorkultur, die bei 37 °C über Nacht im Schüttler inkubiert wird.
- Sofern erforderlich wird Hauptkulturen aus der Vorkultur 10 %ig angeimpft und unter den oben beschriebenen Bedingungen bis zum Erreichen einer $OD_{600} \approx 0,5$ inkubiert.
- Die Zellenernte erfolgt durch Zentrifugation.

2.2.3.3 Transformationstechniken

Unter dem Begriff Transformation versteht man die Aufnahme frei vorliegender DNA in eine Zelle (Winnacker, 1990). In der Regel nehmen Bakterien Fremd-DNA nur in geringen Mengen auf. Diese natürliche Kompetenz lässt sich durch physikalische und/oder chemische Behandlungen der Bakterienzellen erhöhen, wobei dann auch von der Herstellung kompetenter Zellen gesprochen wird.

2.2.3.3.1 Herstellung elektrokompetenter *E. coli*-Zellen (XL-1 *blue* und JM109)

- 50 ml LB-Medium mit Einzelkolonien animpfen und über Nacht bei 37 °C inkubieren.
- 6x 500 ml LB-Medium in 1-Liter Kolben mit je 5 ml der frischen Vorkultur animpfen.
- Im Schüttler bei 37 °C bis zu einer OD₆₀₀ von 0,35 - 0,4 inkubieren.
- Kulturen für 15 Minuten auf Eis stellen.
- In einem vorgekühlten Rotor (JA 10 Beckmann) 20 Minuten bei 5 000 rpm und 4 °C zentrifugieren.
- Überstand verwerfen und die Pellets in je 500 ml eiskaltem ddH₂O resuspendieren.
- Diesen Schritt zwei weitere Male wiederholen.
- Das Zellpellet nach dem zweiten Zentrifugationsschritt in kaltem 10 % (v/v) Glycerin/ddH₂O (ca. 20 ml je Pellet) aufnehmen.
- Die Zellen ein viertes Mal zentrifugieren (20 Minuten bei 5000 rpm und 4 °C, Rotor JA 10 Beckmann).
- Überstand verwerfen und die Pellets in insgesamt 2 ml kaltem 10 % (v/v) Glycerin/ddH₂O resuspendieren (entspricht einer Zellkonzentration von ca. 1-3 x 10⁸ Zellen/ml).
- Die kompetenten *E. coli*-Zellen auf Eis in 50 µl-Aliquots abfüllen und bei -70 °C bis zur weiteren Verwendung lagern oder sofort weiter verwenden.

2.2.3.3.2 Transformation elektrokompetenter *E. coli*-Zellen (XL-1 *blue* und JM109)

Die Transformationen von DNA in elektrokompetente *E. coli*-Stämme wurden mit dem Gene Pulser II der Firma BIORAD nach den Empfehlungen des Herstellers durchgeführt.

- Die kompetenten Zellen auf Eis auftauen und mit einer geeigneter DNA-Menge (1-2 µg) mischen.
- Überführen der Zellsuspension in eine gekühlte 0,1 cm Elektroporationsküvette, die dann in den Gene Pulser II (Biorad) eingesetzt wird.

- Die Transformation erfolgte durch einen Impuls von 4-5 ms bei einer Feldstärke von 12,5 KV/cm (Einstellung am Gene Pulser: Kapazität -25 μ F, Spannung - 2,5 KV, Widerstand - 200 Ω).
- Die Küvette zügig aus dem Gene Pulser entnehmen und mit 250 ml vorgewärmtem LB-Medium (37 °C) versetzen.
- Bakterienkultur für 30 Minuten bei 37 °C im Schüttler inkubieren.
- Aliquots von ca. 100 μ l auf Agarplatten mit einem geeigneten Selektions-Medium ausplattieren und über Nacht bei 37 °C inkubieren.

2.2.3.3.3 Herstellung CaCl₂-kompetenter *E. coli*-Zellen (XL-1*blue* und JM109)

Die Herstellung CaCl₂-kompetenter *E. coli*-Zellen erfolgt nach Mandel und Higa (1970).

- Aus einer 50 ml über Nacht-Kultur 6x 500 ml LB-Medium in 1-Liter Kolben 10 %ig animpfen.
- Inkubation im Schüttler bis zu einer OD₆₀₀ von 0,5 (37 °C).
- Die Zellen 20 Minuten auf Eis stellen und durch Zentrifugation bei 5000 rpm und 4 °C für 20 Minuten (Rotor JA 10 Beckmann) ernten.
- Die Zellpellets in je 50 ml kalter 0,1 M CaCl₂-Lösung resuspendieren.
- Diesen Schritt ein weiteres Mal durchführen.
- Die Zellen für mindestens 30 Minuten auf Eis inkubieren.
- Zentrifugation bei 5000 rpm und 4 °C für 20 Minuten (Rotor JA 10 Beckmann).
- Die Zellen in 4 ml kalter 15 % (v/v) Glycerin/0,1 M CaCl₂-Lösung resuspendieren.
- Auf 50 μ l aliquotiert und in flüssigem Stickstoff schockfrieren.
- Die Lagerung der Zellen erfolgt bei -70 °C.

2.2.3.3.4 Transformation CaCl₂-kompetenter *E. coli*-Zellen (XL-1*blue* und JM109)

- CaCl₂-kompetenten *E. coli*-Zellen auf Eis auftauen und mit 0,5 - 2 μ g DNA versetzen.
- Die Zellsuspension für 30 Minuten auf Eis inkubieren.
- Hitzeschock bei 42 °C für 90 Sekunden.

- Abkühlung auf Eis für 2 Minuten.
- Zugabe von 800 µl LB-Medium und Regeneration der Zellen für 1 Stunde bei 37 °C im Schüttler.
- Ansätze auf Agarplatten ausplattieren und zur Selektion positiver Transformanten über Nacht bei 37 °C kultivieren.

2.2.3.4 Isolation von Plasmid-DNA

Die Separation der chromosomalen DNA von plasmidärer DNA beruht darauf, dass Plasmid-DNA hauptsächlich in überspiralierter Form vorliegt. Im Gegensatz zur plasmidären DNA hochmolekulare, nicht-überspiralisierte chromosomale DNA kann durch verschiedene Arten der Behandlung, wie etwa Hitze- oder Alkalibehandlung irreversibel denaturiert werden, wodurch diese ausfällt. Die Plasmid-DNA bleibt bei dieser Behandlung weitestgehend gelöst, so dass die chromosomale DNA zusammen mit den Zelltrümmern und Proteinen durch anschließende Zentrifugation von der im Überstand befindlichen Plasmid-DNA abgetrennt werden kann.

2.2.3.4.1 Isolation von Plasmid-DNA (Koch-Methode)

Zur Isolation von Plasmid-DNA im kleinen Maßstab mit geringer Reinheit wurde die so genannte Koch-Methode verwendet.

- 2 ml LB-Medium mit Einzelkolonien animpfen und über Nacht bei 37 °C unter Selektionsdruck im Schüttler inkubieren.
- Bakterienkultur in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführen und in einer Tischzentrifuge 20 Sekunden bei 15000 g zentrifugieren.
- Überstand verwerfen und das Pellet durch Vortexen in 400 µl STET-Puffer lösen.
- Die Suspension 1 Minute im Wasserbad kochen.
- In einer Tischzentrifuge 10 Minuten bei 15000 g zentrifugieren.
- Parallel dazu in einem neuen Mikroreaktionsgefäß 400 µl Isopropanol vorlegen.
- DNA-Überstand zu dem Isopropanol geben und durch Invertieren gründlich mischen.

- Zur Fällung der DNA die Lösung in einer Tischzentrifuge 15 Minuten bei 15000 g zentrifugieren.
- Waschen des Pellets mit 70 % (v/v) Etanol und Zentrifugation für 5 Minuten bei 15000 g.
- Trocknen des Pellets und Resuspendieren in 20-100 µl RNase-H₂O.

2.2.3.4.2 Isolation von Plasmid-DNA (Roche)

Zur Isolation von Plasmid-DNA im kleinen Maßstab (< 15 µg) mit hohem Reinheitsgrad wurde das „High Pure Plasmid-Isolation Kit“ der Firma Roche eingesetzt.

- 1,5-3 ml Bakterienkultur durch Zentrifugation in einer Tischzentrifuge für 1 Minute bei 15000 g pelletieren.
- Überstand verwerfen und das Pellet in 250 µl Puffer 1 resuspendieren.
- 250 µl Lysispuffer 2 zugeben, vorsichtig invertieren und 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubieren.
- 350 µl Puffer 3 zugeben, durch Invertieren mischen und 10 Minuten auf Eis stellen.
- Pelletierung der aufgeschlossenen Zellen durch Zentrifugation für 10 Minuten bei 15000 g.
- den DNA-haltigen Überstand auf eine Säule geben und diese 1 Minute bei 15000 g zentrifugieren
- Durchfluss verwerfen und 750 µl Waschpuffer 5 auf die Säule geben.
- Erneut 1 Minute bei 15000 g zentrifugieren.
- Zur Entfernung des Waschpuffers den Durchfluss verwerfen und nochmals 1 Minute bei 15000 g zentrifugieren.
- Die Elution der DNA von der Säule erfolgt durch Zugaben von 30 µl Elutionspuffer 6 und Zentrifugation für eine Minute bei 15000 g.

2.2.3.4.3 Isolation von Plasmid-DNA (Qiagen)

Zur Isolation größerer Plasmid-Mengen (< 100 µg) mit hohem Reinheitsgrad wurde das „Plasmid DNA Purification Kit“ der Firma Qiagen verwendet.

- Die Zellen einer 50 ml über Nacht-Kultur durch Zentrifugation (20 Minuten bei 5000 rpm und 4 °C, Rotor JS 13.1 Beckmann) ernten.
- Das Pellet auf Eis in 4 ml Puffer 1 resuspendieren.
- Zur Lyse der Zellen anschließend 4 ml Puffer 2 zugeben und den Ansatz mehrmals vorsichtig invertieren.
- Inkubation bei Raumtemperatur für maximal 5 Minuten.
- Neutralisation durch Zugabe von 4 ml Puffer 3.
- Suspension vorsichtig invertieren und 15 Minuten auf Eis inkubieren.
- 30 Minuten bei 13 000 rpm und 4 °C zentrifugieren (Rotor JA 20 Beckmann).
- Überstand abnehmen, in ein sauberes Zentrifugegefäß überführen und erneut zentrifugieren (30 Minuten bei 13000 rpm und 4 °C, Rotor JA 20 Beckmann).
- Parallel dazu eine QIA Midi-Säule mit 4 ml Puffer QBT equilibrieren.
- Beladen der Säule mit dem abzentrifugierten Überstand.
- Nach dem vollständigen Einlaufen der Probe die Säule 2x mit je 10 ml Waschpuffer QC waschen.
- Elution der Plasmid-DNA mit 10 ml Elutionspuffer QF.
- Fällung der DNA mit 7 ml Isopropanol und Zentrifugation für 30 Minuten bei 8500 rpm und 4 °C (Rotor JS 13.1 Beckmann).
- Überstand verwerfen und das Pellet mit 2 ml 70 % (v/v) Etanol waschen.
- Zentrifugation für 10 Minuten bei 8500 rpm und 4 °C (Rotor JS 13.1 Beckmann).
- DNA-Pellet bei 65 °C trocknen und in 100-200 µl ddH₂O lösen.

2.2.3.5 Isolierung genomischer DNA aus Fliegen

- Ca. 40 Fliegen in ein 1,5 ml-Mikroreaktionsgefäß mit 100 µl Lysepuffer geben und für mindestens 10 Minuten bei -20 °C einfrieren.
- Gefrorene Fliegen mit einem Pistell homogenisieren.
- Weitere 700 µl Lysepuffer zugeben und gut durchmischen.
- 30 - 45 Minuten bei 65 °C inkubieren, dabei 2 - 3x durchmischen.

- 150 µl Kaliumacetat dazu geben, mischen und 30 Minuten auf Eis inkubieren.
- In einer Tischzentrifuge für 20 Minuten bei 13.000 rpm zentrifugieren.
- Den Überstand mit einer Pipette in ein neues Eppi überführen und erneut für 20 Minuten bei 13.000 rpm zentrifugieren.
- Überstand wieder in ein neues Eppi überführen.
- Zugabe von 75 µl 3M NaCl und 700 µl Isopropanol, 5 - 6x vorsichtig invertieren.
- Gefällte DNA durch Zentrifugation für 15 Minuten bei 13.000 rpm pelletieren.
- Überstand verwerfen, 400 µl 70% Ethanol auf das Pellet pipettieren und 5 Minuten bei 13.000 rpm zentrifugieren.
- Ethanol abgießen und das Pellet bei 60 °C trocknen.
- Pellet in 100 µl ddH₂O mit RNase (20 µg/ml).

2.2.3.6 Präparation von genomischer DNA für *single fly*-PCR

- Eine Fliege in einem Eppi für einige Minuten bei -20 °C einfrieren.
- Mit einer Pipette 50 µl Squishing Buffer aufziehen, die Fliege mit der Pipettenspitze für 5 - 10 Sekunden zerkleinern, erst dann den Puffer aus der Pipette lassen.
- 20 - 30 Minuten bei 25 - 37 °C inkubieren.
- Inaktivierung der Proteinase K bei 85 °C für 2 Minuten.

2.2.3.7 *In vitro*-Amplifikation von DNA

Zur selektiven Amplifikation von DNA-Fragmenten definierter Länge und Sequenz aus heterogenen Nukleinsäuregemischen wird die Polymerase-Kettenreaktion (PCR, *polymerase chain reaction*) eingesetzt (Mullis, 1990). Für eine PCR müssen die Sequenzen der Randbereiche des zu amplifizierenden DNA-Abschnitts bekannt sein, damit synthetisch generierte Oligonukleotide (Primer) an diese Randbereiche strangspezifisch und antiparallel hybridisieren können. Die hybridisierten Primer dienen wiederum einer DNA-Polymerase als Startpunkt zur Synthese des Amplifikats. Die Hybridisierungstemperatur der Primer resultiert aus deren

Basenzusammensetzung und lässt sich für Oligonukleotide mit einer Länge von 18 - 22 bp wie folgt berechnen (Itakura *et al.*, 1984):

$$T_m [^\circ\text{C}] = [(\sum A + T) \times 2 \text{ }^\circ\text{C}] + [(\sum G + C) \times 4 \text{ }^\circ\text{C}] - 5 \text{ }^\circ\text{C}$$

Der Ablauf einer PCR basiert im Wesentlichen auf drei Reaktionsschritten, die über mehrere Zyklen hinweg repetiert werden. Zunächst werden die Proben bei ca. 95 °C hitzedenaturiert, um die Template-DNA in Einzelstränge aufzuschmelzen. Nach Abkühlen des Reaktionsansatzes auf die Primer-spezifische Hybridisierungstemperatur kommt es zur Anlagerung (Annealing) der Oligonukleotide an die Template-DNA. Deren freie 3'-OH-Enden dienen einer hitzestabilen DNA-Polymerase als Startpunkt für die sich anschließende Neusynthese des jeweiligen Komplementärstranges (Elongation). Durch diese sich immer wiederholenden Zyklen erfolgt eine exponentielle Amplifikation des Templates, so dass nach 35 Zyklen etwa $3,4 \times 10^{10}$ identische DNA-Moleküle vorliegen (Old und Primose, 1981). Die Verwendung thermostabiler DNA-Polymerasen ermöglicht es, sowohl die Hybridisierung und DNA-Synthese als auch die Denaturierung zyklisch zu wiederholen, ohne dass das Enzym zerstört wird. In dieser Arbeit kam vor allem die Taq-DNA-Polymerase aus *Thermus aquaticus* zum Einsatz.

Für die Standard-PCR wurde ein Reaktionsansatz (50 µl) gemäß dem in Tabelle 2.3 dargestellten Schema hergestellt.

Tab. 2.3: Zusammensetzung eines 50 µl-PCR-Ansatzes.

Komponente	Endkonzentration	Volumen
Template-DNA	ca. 100 µg/ml	1 µl
10x Puffer	1x	5 µl
MgCl ₂	1,5 mM	3 µl
dNTP	0,2 mM	1 µl
ddH ₂ O	ad 50 µl	30 µl
Primer A (20 µM)	50 pmol bzw. 1 µM	5 µl
Primer B (20µM)	50 pmol bzw. 1 µM	5 µl
Taq-DNA-Polymerase	1 U	0,2 µl

Das Programmschema einer Standard-PCR entsprach dem in Tabelle 2.4 und 2.5 aufgeführten Temperaturprofil. Die angegebenen Denaturierungszeiten beziehen

sich auf plasmidäre DNA als Template. Bei Verwendung genomischer DNA als Template betrug die initiale Denaturierungsphase 10 Minuten.

Tab. 2.4: PCR-Temperaturprofil für DNA-Fragmente < 800 bp.

Schritt	Temperatur	Dauer
initiale Denaturierung	94 °C	1:00 Minuten
Denaturierung	94 °C	0:40 Minuten
Annealing (abhängig vom Primerpaar)	54 - 58 °C	0:40 Minuten
Elongation	72 °C	1:45 Minuten
Anzahl Zyklen	30	
terminale Elongation	72 °C	8:00 Minuten
Kühlen	4 °C	nach Bedarf

Tab. 2.5: PCR-Temperaturprofil für DNA-Fragmente > 800 bp.

Schritt	Temperatur	Dauer
initiale Denaturierung	94 °C	3:00 Minuten
Denaturierung	94 °C	1:00 Minuten
Annealing (abhängig vom Primerpaar)	54 - 58 °C	1:00 Minuten
Extension	72 °C	2:30 Minuten
Anzahl Zyklen	30	
terminale Extension	72 °C	8:00 Minuten
Kühlen	4 °C	nach Bedarf

2.2.3.8 Aufreinigung von PCR-Produkten (Qiagen)

Nach einer *in vitro*-Amplifikation sind die hergestellten DNA-Fragmente mit Resten der im Reaktionsansatz enthaltenen Reagenzien verunreinigt, die weitere Reaktionen störend beeinflussen können. Zur Aufreinigung wurde das „MiniElute PCR Purification Kit“ der Firma Qiagen eingesetzt.

- Fünf Volumen Puffer PB zu einem Volumen PCR-Produkt geben und durch Invertieren gründlich mischen.
- Lösung auf eine QIAquick-Säule geben und 1 Minute bei 15000 g zentrifugieren.
- Säulenmatrix mit 750 µl Waschpuffer PE waschen und wieder 1 Minute bei 15000 g zentrifugieren.
- Zur Entfernung des Ethanol-haltigen Waschpuffers den Durchfluss verwerfen und nochmals 1 Minute bei 15000 g zentrifugieren.

- Die Spin-Säule in einem sauberen 1,5 ml Reaktionsgefäß platzieren und die DNA mit 30 µl Elutionspuffer EB eluieren (Zentrifugation für 1 Minute, 15000 g).

2.2.3.9 Agarosegelelektrophorese

Bei einer Elektrophorese handelt es sich um ein biochemisches Trennverfahren, bei dem die unterschiedliche Wanderungsgeschwindigkeit geladener Moleküle in einem elektrischen Feld zu deren Trennung ausgenutzt wird (Cremer und Tiselius, 1950).

Zur Auftrennung von Nukleinsäurefragmenten unterschiedlicher Größe wurde die Agarose-Gelelektrophorese eingesetzt. Als Matrix dient Agarose, welche in polymerisierter Form wie ein molekulares Sieb wirkt. Die Porengröße und somit die Auflösung des Agarosegels kann gezielt durch Variation der Agarosekonzentration verändert werden, wobei die Größe der Poren mit steigender Agarosekonzentration sinkt. Gebräuchlich sind 0,8 - 2,0 %ige Agarosegele, welche eine Auftrennung im Bereich von 0,1 bis 20 kb erlauben (Sambrook *et al.*, 2001).

- 0,8 - 2 % Agarose (Seakem LE-Agarose, Biozym Diagnostik GmbH, Hessisch Oldendorf, BRD) in TBE-Puffer (1x) durch Aufkochen lösen.
- Nach Abkühlen auf ca. 60 °C mit Ethidiumbromid versetzen (3 µl auf 100 ml 0,8 - 2 %ige Agarose).
- Die Lösung in einen Gelträger gießen und zur Erzeugung von Probestaschen einen Kamm in einem Abstand von 0,5 - 1,5 mm über dem Gelträger platzieren.
- Das erstarrte Agarosegel in eine horizontale Elektrophorese-Kammer legen und mit TBE-Puffer (1x) überschichten.
- DNA-Proben mit Gelladepuffer versetzen und in die Probestaschen des Gels pipettieren.
- Als relatives Maß für die Größe der DNA-Fragmente dient ein in eine separate Probestasche pipettierter DNA-Größenstandard (Hyperladder I der Firma Bioline).
- Die Trennung der DNA-Fragmente erfolgt bei 80 -110 V.
- Das Gel auf einem UV-Transilluminator bei einer Wellenlänge von 312 nm betrachten bzw. fotografisch dokumentieren.

2.2.3.10 Gelextraktion von DNA-Fragmenten (Qiagen)

Die Isolation und Aufreinigung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen erfolgte mittels des „MiniElute Gel Extraktion Kit“ der Firma Qiagen.

- Nach erfolgter Agarosegelelektrophorese wird das die Ziel-DNA enthaltende Agarosefragment selektiv aus dem Gel ausgeschnitten und in ein steriles 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt.
- Solubilisierung der Gelmatrix durch Zugabe von 300 µl Puffer QG pro 100 mg Gelmatrix und nachfolgender Inkubation bei 50 °C, wobei der Ansatz gelegentlich gemischt wurde. Dabei ist auf die Farbe der Lösung zu achten, die als Indikator für den pH-Wert dient; gelb zeigt einen pH von ~7,5 an, orange oder violett deutet auf eine für die Reaktion ungünstigen pH-Wert hin, der durch die Zugaben von 10 µl 3 M Natriumacetat wieder eingestellt werden muss.
- Nach Auflösung des Gelstücks ein Gelvolumen Isopropanol zugeben und mischen.
- Maximal 700 µl der DNA-Lösung auf eine in einem 2 ml-Auffanggefäß platzierte QIA Gelextraktions-Säule geben und 1 Minute bei 15000 g zentrifugieren.
- Das Eluat verwerfen und wenn nötig die Spin-Säule erneut beladen und zentrifugieren (siehe oben).
- Waschen der Spin-Säule durch Beladen mit 500 µl Puffer QG (entfernt Agarosereste) und Abzentrifugieren sowie mit 750 µl Waschpuffer PE und Abzentrifugieren.
- Zur vollständigen Entfernung des Puffers PE den Durchfluss verwerfen und nochmals 1 Minute zentrifugieren.
- Die Spin-Säule in einem sauberen 1,5 ml-Reaktionsgefäß platzieren und die DNA mit 30 µl EB-Puffer und nachfolgende Zentrifugation (15000 g, 1 Minute, Raumtemperatur) eluieren.

2.2.3.11 Photometrische Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Zur genauen Konzentrations- und Reinheitsbestimmung einer Nukleinsäure-Präparation wurden 2 µl der DNA-Probe in 60 µl H₂O verdünnt und die Absorption mit einem Photometer bei 260 nm (Absorptionsmaximum von Nukleinsäuren),

280 nm (Absorptionsmaximum aromatischer Aminosäuren) und 310 nm (Basalabsorption) in einer UV-Einmalküvette (Schichtdicke: 1 cm) gemessen. Die Reinheit der DNA-Lösung ergibt sich aus dem Quotient OD_{260}/OD_{280} .

Bei reinen Proben liegt das Verhältnis zwischen 1,8 und 2,0. Bei der angegebenen Reinheit entspricht ein OD_{260} -Wert von 1,0 einer Konzentration von 50 $\mu\text{g/ml}$ doppelsträngiger DNA. Niedrigere Werte in der DNA-Reinheit sind auf Verunreinigungen durch Proteine, höhere auf phenolische Kontaminationen zurückzuführen. Die DNA-Konzentration konnte nach folgender Formel berechnet werden:

$$c = (OD_{260} - OD_{310}) \times 0,05 \mu\text{g}/\mu\text{l} \times \text{VF}$$

c	=	Konzentration der DNA-Probe [$\mu\text{g/ml}$]
OD_{260}	=	Absorption bei 260 nm
OD_{280}	=	Absorption bei 280 nm
OD_{310}	=	Absorption bei 310 nm
VF	=	Verdünnungsfaktor

2.2.3.12 Abschätzung der Nukleinsäure-Konzentration im Agarosegel

Alternativ zur photometrischen Konzentrationsbestimmung konnte die DNA-Konzentration im Agarosegel durch einen direkten Vergleich der Fluoreszenzintensität der Probe mit dem standardisierten Molekulargewichtsmarker abgeschätzt werden.

2.2.3.13 Restriktion von DNA

DNA-Moleküle können durch Restriktionsendonukleasen hydrolysiert werden (Arber, 1974 und 1978). Solche Restriktionsendonukleasen lassen sich in drei Klassen aufteilen, wobei die Typ I- und Typ III-Restriktionsenzyme in der Gentechnologie keine bzw. nur eine sehr untergeordnete Rolle spielen. Dagegen werden die Endonukleasen des Typs II zur sequenzspezifischen Spaltung von DNA-Molekülen bei Klonierungsexperimenten herangezogen, wobei die DNA-Hydrolyse durchweg in

tetra- bis oktameren, palindromischen Erkennungssequenzen erfolgt. Die Enzymaktivität hängt dabei von Faktoren wie der Temperatur, dem pH-Wert sowie der Ionenstärke und Magnesium-Konzentration ab (Roberts, 1983).

In dieser Arbeit wurden die Restriktionsenzyme der Firma Roche mit den dazugehörigen Restriktionspuffern eingesetzt. Die Ansätze wurden für 1-5 Stunden bei der vom Hersteller empfohlenen Temperatur inkubiert und, sofern möglich, zur Beendigung der Reaktion für 25 Minuten bei 80 °C hitzeinaktiviert.

Ein typischer Restriktionsansatz wurde nach dem in Tabelle 2.6 angegebenen Schema zusammengestellt.

Tab. 2.6: Pipettierschema für einen Standard-Restriktionsansatz.

Komponente	Menge
DNA-Lösung (1 µg/µl)	1 µl
Restriktionspuffer (10x)	1 µl
Restriktionsenzym (10 U/µl)	0,1 µl
ddH ₂ O	ad 10 µl

Mittels Agarose-Gelelektrophorese (2.2.3.9) wurde der Erfolg der Restriktion überprüft und die im Gel aufgetrennten DNA-Fragmente sofern notwendig durch Gelextraktion (2.2.3.10) isoliert.

2.2.3.14 Dephosphorylierung von 5'-DNA-Enden

Religationen von Klonierungsvektoren können durch Dephosphorylierung der 5'-endständigen Phosphatgruppen weitestgehend verhindert werden, so dass sich der Anteil der gewünschten Insertionsereignisse bei einer Ligation (2.2.3.15) deutlich erhöht. Für eine solche Dephosphorylierung wurde eine aus Garnelen (*Pandalus borealis*) isolierte Shrimp Alkalische Phosphatase (SAP; Boehringer Mannheim GmbH) verwendet. Die Reaktion erfolgte für 15 - 45 Minuten bei 37 °C. Durch eine Hitzebehandlung für 15 Minuten bei 65 °C wurde die SAP inaktiviert und der Ansatz ohne weitere Aufreinigung zur Ligation eingesetzt. Eine Klonierung von PCR-Produkten ist mit dephosphoryliertem Vektors nicht möglich, da in diesem Fall die Insert-DNA keine phosphorylierten 5'-Enden besitzt und somit eine Ligation der beiden Produkte nicht stattfinden kann.

Ein Reaktionsansatz zur Entfernung von endständigen Phosphatgruppen von Nukleinsäurefragmenten wurde nach dem in Tabelle 2.7 angegebenen Schema angesetzt.

Tab. 2.7: Pipettierschema für eine Standard-Dephosphorylierungsreaktion.

Komponente	Menge
DNA-Lösung (0,1 µg/µl)	10 µl
SAP-Puffer (10x)	2 µl
SAP (1 U/µl)	8 µl

2.2.3.15 Ligation von DNA-Fragmenten

Für Ligationen von Vektor- und Insert-DNA wurde die DNA-Ligase des Bakteriophagen T4 verwendet, welche die Bildung von Phosphodiester-Bindungen zwischen benachbarten 3'-Hydroxyl- sowie 5'-Phosphatgruppen doppelsträngiger DNA-Moleküle katalysiert. Die ATP- und Mg²⁺-abhängige T4-DNA-Ligase verknüpft sowohl glatte (*blunt ends*) als auch überhängende Enden (*sticky ends*) miteinander. Zur Ligation werden der Vektor und das zu klonierende DNA-Fragment in einem molaren Verhältnis von 1:1 bis 1:10 eingesetzt. Bei der Restriktion des Vektors mit nur einem Enzym wird dieser vor der Ligation zur Verhinderung einer Vektor-Religation mit SAP (1 µg/µl Shrimp Alkalische Phosphatase) dephosphoryliert. Bei einem Doppelverdau des Vektors mit zwei Enzymen kann auf die Phosphatase-Behandlung verzichtet werden.

Ein Standard-Ligationsansatz wurde nach dem in Tabelle 2.8 dargestellten Muster hergestellt.

Tab. 2.8: Schema für einen Standard-Ligationsansatz.

Komponente	Menge
Vektor-DNA	100 ng
DNA-Fragment	1 - 10fache molare Menge
10x Ligationspuffer	2 µl
T4-DNA-Ligase	1 µl
ddH ₂ O	ad 20 µl
→ Inkubation 2 Stunden bei 37 °C oder über Nacht bei 18 °C	

2.2.3.16 Sequenzierung

Sequenzierungen erfolgten durch das Kettenabbruchverfahren nach Sanger (1977). Dabei wurde durch enzymatische Synthese eine markierte, komplementäre Kopie des zu sequenzierenden Matrizenstranges erstellt.

Die Sequenzierungen wurden mit dem „DYEnamic ET Dye Terminator Cycle Sequencing Kit for MegaBACE DNA Analysis Systems“ der Firma Amersham Pharmacia Biosciences gemäß den Angaben des Herstellers durchgeführt, wobei der Kapillarsequenzierer MegaBACE 1000 (Amersham Biosciences) verwendet wurde.

2.2.4 Biochemische Methoden

2.2.4.1 Konzentrationsbestimmung von Proteinlösungen

Die Proteinkonzentrationsbestimmung erfolgte nach der Methode von Bradford (1976).

- Verdünnung der Bradford-Reagenz mit ddH₂O im Verhältnis 1:5.
- Aliquots dieser Lösung von je 1 ml mit 1 - 10 µl der zu testenden Proteinlösung versetzen.
- Nach ca. 10 Minuten Inkubationszeit die Extinktion bei einer Wellenlänge von 595 nm in einer Quarzküvetten messen.
- Erstellung einer Eichgrade mit BSA als Standard zur Ermittlung der Proteinkonzentration.

2.2.4.2 Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die gelelektrophoretische Auftrennung von Proteinen erfolgte unter denaturierenden Bedingungen in diskontinuierlichen SDS-Polyacrylamidgelen (Laemmli, 1970).

Für SDS-Gele, die zur Analyse von Proteinexpressionsmustern dienen, wurden die Reaktionsansätze nach dem Schema in Tabelle 2.9 gemischt.

Tab. 2.9: Pipettierschema für ein analytisches SDS-Gel.

Angaben beziehen sich auf zwei SDS-Gele.

	Reagenz	Menge [ml]
Trenngel (10 %)	Stammlösung (30 %, w/v)	2,5
	Laufgelpuffer (4x)	1,9
	SDS (10 %, w/v)	0,075
	ddH ₂ O	3,03
	APS (10 %, w/v)	0,05
	TEMED	0,005
Sammelgel (4 %)	Stammlösung (30 %, w/v)	0,665
	Sammelgelpuffer (4x)	1,25
	SDS (10 %, w/v)	0,05
	ddH ₂ O	3,0
	APS (10 %, w/v)	0,05
	TEMED	0,005

- Nach dem Polymerisationsstart der Trenngellösung durch Zugabe von APS und TEMED das Trenngel bis auf ca. 2/3 der Gesamthöhe der Gelkassette gießen und mit Isopropanol überschichten.
- Nach etwa 1 Stunde ist die Polymerisation abgeschlossen und das Isopropanol kann abgegossen und durch die ebenfalls mit APS und TEMED versetzte Sammelgellösung ersetzt werden.
- In das noch flüssige Sammelgel den Probenkamm einsetzen.
- Die Polymerisation des Sammelgels nimmt etwa 30 Minuten in Anspruch.
- Die Proteinproben mit Probenpuffer (1x - 5x) versetzen, 5 Minuten bei 95 °C denaturieren und weitere 5 Minuten bei 15000 g zentrifugieren.
- In jeder Spur des Polyacrylamidgel etwa 20 µg Protein auftragen.
- Proteinproben innerhalb von etwa 2 - 4 Stunden bei 20 mA elektrophoretisch auftrennen.
- Die Molekulargewichtsbestimmung der aufgetrennten Proteine erfolgt anhand eines Protein-Molekulargewichtstandards (Roti Standard Marker der Firma Roth).
- Die Proteinbanden können auf dem SDS-Gel mit kolloidalem Coomassie (Neuhoff *et al.*, 1985) angefärbt oder über Western Blotting (2.2.4.4) auf eine PVDF-Membran übertragen werden.

2.2.4.3 Coomassie-Färbung von SDS-Gelen

- Das SDS-Gel vorsichtig aus der Gelkassette entnehmen und das Sammelgel entfernen.
- Das Trenngel in Coomassie-Färbelösung legen, so dass es vollständig bedeckt ist, und auf einem Schüttler inkubieren.
- Sobald Banden sichtbar werden, die Färbelösung entfernen und durch Coomassie-Entfärbelösung ersetzen.
- Sind nur noch die Protein-haltigen Banden angefärbt, die Entfärbelösung verwerfen.
- Das Gel kann in H₂O gelagert werden.

2.2.4.4 Western Blotting und Immunodetektion von Proteinen

Unter Western Blotting wird ein Verfahren verstanden, bei dem Proteine, die durch Gelelektrophorese ihrer Größe nach aufgetrennt wurden, auf eine geeignete Trägermembran aus Nylon oder Nitrocellulose übertragen sowie dort immobilisiert werden. Dabei erhält man ein Replik des Bandenmusters im Gel, wobei die nun frei zugänglichen Proteine für nachfolgende biochemische Nachweisverfahren zur Verfügung steht.

- Der Proteintransfer von SDS-Polyacrylamid-Gelen auf eine PVDF Membran (Amersham) erfolgte in einer Tank-Blot-Einheit (Mighty Small Transphor Tank Transfer Unit) der Firma Hoefer (San Francisco) für 2 Stunden bei einer konstanten Stromstärke von 400 mA.
- Nach erfolgtem Proteintransfer die PVDF-Membran für 10 Sekunden in Methanol aktivieren, für 5 Minuten in ddH₂O waschen und anschließend für 7 Minuten in Transferpuffer vorinkubieren.
- Die Membran anschließend mit Ponceau S-Lösung reversibel anfärben um die Markerbanden markieren zu können.
- Die Membran mit TBS Tween entfärben und 1 Stunde in 10 % Milchpulver blocken.
- Das verwendete Antiserum ebenfalls in 10 % Milchpulver verdünnen und die Membran in dieser Lösung bei 4 °C über Nacht auf einem Roller inkubieren.

- Anschließend die Membran 5x 20 Minuten in TBS-Tween waschen und im Folgenden mit einem HRP-gekoppelten sekundären Antikörper für 2 Stunden bei Raumtemperatur inkubieren.
- Zur Entfernung von nicht gebundenem Sekundärantikörper die Membran wiederum 5x 20 Minuten in TBS-Tween waschen.
- Nachweis der Antigene mittels des ECL-Western-Blotting-Detektionssystems der Firma Amersham.

2.2.5 Bildakquisition, -verarbeitung und -darstellung

2.2.5.1 Konfokale Laserscanning-Mikroskopie

Alle Präparate wurden mit konfokalen Laserscanning-Mikroskopen aufgenommen (Axiovert 200M oder Axio Imager Z.1 mit LSM 510 META Scanning-Modul).

Die für die Aufnahmen verwendeten Einstellungen sind in Tabelle 2.10 aufgeführt. Sofern nicht anders angegeben, wurden alle Aufnahmen mit einer 10x - oder 20x - Linse bzw. einer 40x - Ölimmersionlinse gemacht.

Tab. 2.10: Einstellungen für die Laserscanning-Mikroskopie.

	Vergrößerung 10x	Vergrößerung 20x	Vergrößerung 40x
Scan-Geschwindigkeit	8	8	8
Auflösung (Pixel x Pixel)	512 x 512	512 x 512	1024 x 1024
Pinhole (Ø/µM)	100	100	100
Intervall (µM)	5,6	3,0	0,6

2.2.5.2 Bildverarbeitung

Zur Bestimmung der Zahl der Gliazellen in einem Präparat wurde der Stapel konfokaler Aufnahmen dieses Präparates in das 3D-Bildbearbeitungsprogramm „Volocity 4.0“ der Firma Improvion importiert. Bildausschnitte, die nicht in die statistische Auswertung mit einbezogen werden sollten, wurden entfernt. Bei Bedarf wurde ein feiner Filter auf den Bildstapel angewendet, um Hintergrundrauschen zu entfernen. Danach wurde mittels der in Tabelle 2.11 angegebenen Kriterien die Zahl

der zu zählenden Objekte im Bildstapel bestimmt. Die Anzahl der so gezählten Objekte wurde mit der Zahl glialer Zellkerne gleich gesetzt.

Tab. 2.11: Kriterien zur Bestimmung der Zahl glialer Zellkerne in einem Bildstapel mit „Volocity 4.0“ (Improvision).

Die zu zählenden Gliazellkerne wurden mit α -Repo immunhistochemisch markiert und mit α -Maus-568 visualisiert.

Kriterium	Anregung 568 nm (grüner Kanal)
Intensitätsbereich der zu zählenden Objekte	60 - 255
Trennung sich berührender Objekte	ja
minimales Volumen zu trennender Objekte	25 μM^3
minimales Volumen der zu zählenden Objekte	25 μM^3

2.2.5.3 Darstellung konfokaler Bildstapel

Sofern nicht anders angegeben, handelt es sich bei allen in dieser Arbeit gezeigten Abbildungen konfokaler Präparate um Projektionen von Bildstapeln auf eine Ebene. Sofern notwendig, wurde zur Reduktion von Bildrauschen ein Schwarz- bzw. Weißabgleich mit „Photoshop 7.0“ (Adobe) durchgeführt. Außerdem wurde bei Bedarf die Intensität eines oder mehrerer Kanäle erhöht oder verringert, um eine bessere Darstellung der Bildinformation zu erreichen.

2.2.6 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung der Daten und die Erstellung von Diagrammen wurde mit MS Excel 2000 vorgenommen. Sofern nicht anders angegeben, wurden für die ermittelten Daten der Mittelwert und die Standardabweichung bestimmt und auf ganze Zahlen gerundet. Abweichungen von 100 % in der Summierung der Einzelgruppen resultieren aus dieser Rundung. Auch die Prüfung der Signifikanz erfolgte mit Excel. Dazu wurde ein zweiseitiger, ungepaarter T-Test durchgeführt, wobei die Signifikanz wie folgt angegeben wird: nicht signifikant, $p > 0,05$; signifikant / *, $p \leq 0,05$; sehr signifikant / **, $p \leq 0,005$; höchst signifikant / ***, $p \leq 0,0005$.

2.2.7 Sicherheitsbestimmungen

Alle durchgeführten gentechnischen Arbeiten wurden gemäß dem „Gesetz zur Regelung von Fragen der Gentechnik“ (Gentechnikgesetz, GenTG) vom 16.12.1993 unter Berücksichtigung der in § 7 Abs. 1 aufgeführten Sicherheitsmaßnahmen durchgeführt. Die Anmeldung der Arbeiten erfolgte gemäß § 8 Abs. 1 und § 11 des Gentechnikgesetzes.

3 Ergebnisse

In dieser Arbeit sollte zunächst die Eignung von *Drosophila* als Modellsystem für die Untersuchung von glialen Gehirntumoren des Menschen geprüft werden. Im nächsten Schritt wurden anhand dieses Modells Gene untersucht, deren humane Homologe potentiell Einfluss auf die Pathogenese von Krebspatienten haben könnten.

3.1 Etablierung von *Drosophila* als Modell für die Erforschung humaner Gliome

Die PI3K/Akt-Signalkaskade ist in vielen malignen Neoplasien des Menschen dereguliert (Haas-Kogan *et al.*, 1998; Vivanco und Sawyers, 2002; Sansal und Sellers, 2004) und scheint darüber hinaus zwischen *Drosophila* und dem Menschen hochkonserviert zu sein (Hay und Sonenberg, 2004; Liu und Lehmann, 2006). Deshalb wurde hier analysiert, welche Auswirkungen die ektopische Expression einzelner Komponenten des PI3K/Akt-Signalwegs auf die Gliazellen von *Drosophila* hat.

3.1.1 Auswirkungen der Deregulation des PI3K/Akt-Signalwegs

Die ektopische Regulation der PI3K/Akt-Signalkaskade wurde mit dem UAS/Gal4-System durchgeführt, das eine gezielte zeit- und gewebespezifische ektopische Expression von Genen erlaubt. So sollte untersucht werden, ob in *Drosophila* eine aberrante Regulation dieses Signalwegs einen ähnlichen Effekt auf die Migration und Proliferation der Zellen ausübt wie in humanen Tumoren. Als Ziele für eine ektopischen Aktivierung wurden EGFR, Ras, PI3K und Akt ausgewählt, die in humanen Tumorzellen oft eine gesteigerte Aktivität zeigen, sowie PTEN, das in humanen Tumoren typischerweise einen Funktionsverlust aufweist und hier durch Expression von doppelsträngiger RNA herunterreguliert wurde. Die eben genannten

Gene werden im Folgenden auch zusammenfassend mit dem Begriff „Zielgene“ bezeichnet.

3.1.1.1 Die Fehlregulation der PI3K/Akt-Signalkaskade beeinflusst die Vitalität

Zur ektopischen Regulation der Zielgene wurden die Gal4-Treiberlinien *daughterlessGal4* (*daGal4*) und *reversed polarityGal4* (*repoGal4*) verwendet. *Da* weist ein ubiquitäres Expressionsmuster, während *repo* restriktiv in Gliazellen aktiv ist. Die Aktivierung von *λtop*, *ras*^{64B}, *PI3K*^{92E} und *Akt1* resultierte in einer hohen Mortalität der Versuchstiere. Eine Übersicht über die Ergebnisse dieses Versuchs ist in Tabelle 3.1 zu finden.

Tab. 3.1: Einfluss der ektopischen Regulation des PI3K/Akt-Signalwegs auf die Vitalität.

Als Gal4-Treiber wurde eine Kombination aus zwei *repoGal4*-Transgenen verwendet, um einen stärkeren Effekt zu erzielen. Die Insertionsorte dieser Transgene lagen auf dem zweiten und dritten Chromosom. Der *daGal4*-Treiberstamm hatte nur eine einzelne Insertion des Transgens auf dem dritten Chromosom. v = vital; (v) = weniger als 10 % der geschlüpften Fliegen hatten im Genom sowohl das UAS- als auch das Gal4-Transgen; † = letal.

UAS-Effektor	Gal4-Treiber	
	<i>repoGal4</i>	<i>daGal4</i>
UAS <i>λtop</i>	(v)	†
UAS <i>ras</i> ^{64B}	†	†
UAS <i>PI3K</i> ^{92E}	v	(v)
UAS <i>Akt1</i>	v	†
UAS <i>PTEN</i> ^{dsRNA}	v	v
UAS <i>λtop</i> ; UAS <i>ras</i> ^{64B}	†	†
UAS <i>λtop</i> ; UAS <i>PI3K</i> ^{92E}	(v)	†
UAS <i>λtop</i> ; UAS <i>Akt1</i>	(v)	†
UAS <i>λtop</i> ; UAS <i>PTEN</i> ^{dsRNA}	(v)	†
UAS <i>ras</i> ^{64B} ; UAS <i>PI3K</i> ^{92E}	†	†
UAS <i>ras</i> ^{64B} ; UAS <i>Akt1</i>	†	†
UAS <i>ras</i> ^{64B} ; UAS <i>PTEN</i> ^{dsRNA}	†	†
UAS <i>PI3K</i> ^{92E} ; UAS <i>Akt1</i>	†	†
UAS <i>PI3K</i> ^{92E} ; UAS <i>PTEN</i> ^{dsRNA}	v	†
UAS <i>Akt1</i> ; UAS <i>PTEN</i> ^{dsRNA}	v	†

Die ektopische Expression der Zielgene mit *daGal4* führte bei fast allen untersuchten Genkombinationen zur Letalität vor Erreichen des adulten Stadiums. Die einzigen Ausnahmen bildeten die Verringerung der *PTEN*-Expression durch doppelsträngige RNA, welche die Vitalität nicht beeinträchtigte, und die Expression von *PI3K^{92E}*, die zu einer Verringerung der Vitalität führte. Hier erreichten weniger als 10 % der Versuchstiere mit dem entsprechenden Genotyp das adulte Stadium, gemessen an der Gesamtzahl der geschlüpften Fliegen (Tab. 3.1).

Die Deregulation einzelner Gene mit dem Gal4-Treiber *repo* war im Fall von *ras^{64B}* letal, während die Expression von *λtop* die Vitalität einschränkte, und die ektopische Regulation von *PI3K^{92E}*, *Akt1* und *PTEN* keine Auswirkungen auf die Vitalität der Versuchstiere hatte. Die simultane Deregulation von zwei Genen führte bei Tieren mit den Genotypen *repo* >> *PI3K^{92E}*; *PTEN^{dsRNA}* und *repo* >> *Akt1*; *PTEN^{dsRNA}* nicht zu gesteigerter Mortalität. In allen anderen untersuchten Fällen war hingegen die Vitalität erheblich reduziert (Tab. 3.1).

Im nächsten Schritt wurde deshalb untersucht, wie sich die ektopische Regulation des PI3K/Akt-Signalwegs auf die Morphologie des Nervensystems auswirkte. Dabei war insbesondere von Interesse, ob infolge der genetischen Manipulation Hyperplasien oder ektopische Migration von Zellen auftraten.

3.1.1.2 Die Fehlregulation des PI3K/Akt-Signalwegs resultiert in morphologischen Aberrationen des Nervensystems

Im nächsten Schritt wurden die Auswirkungen der gliaspezifischen Aktivierung der Transgene auf das Nervensystem analysiert. Zunächst wurden die Gehirnhemisphären und das Ventralganglion von L3-Larven in der Übersicht betrachtet (Abb. 3.1). Als Gal4-Aktivatorlinie wurde ein Stamm mit Insertion des *repoGal*-Transgens auf dem dritten Chromosom verwendet, der auch für alle noch folgenden Experimente standardmäßig zum Einsatz kam. Die Deregulation einzelner Zielgene in Gliazellen resultierte in nur wenigen oder gar keinen offensichtlichen Fehlbildungen des ZNS. Eine Ausnahme bildeten Larven, die *ras^{64B}* in Gliazellen exprimierten (Abb. 3.1 C). Hier waren die optischen Stiele um ein mehrfaches dicker als im Wildtyp. Die Expression von *λtop*, *PI3K^{92E}*, *Akt1* und *PTEN^{dsRNA}* in Gliazellen ergab keine hier erkennbaren Fehlbildungen des ZNS (Ab. 3.1).

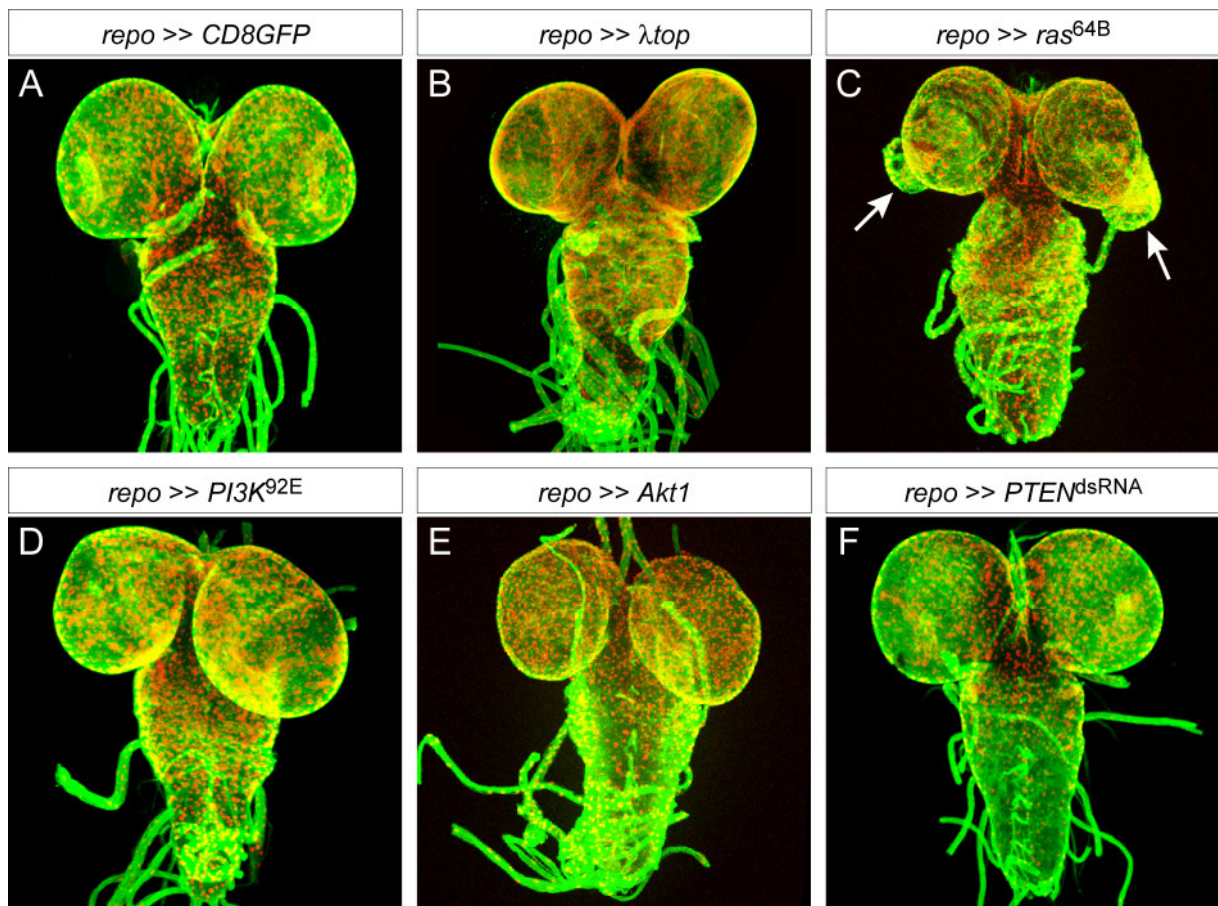


Abb. 3.1: Das ZNS von L3-Larven, die einzelne Transgene in Gliazellen exprimieren.

A - F Immunhistochemische Färbung der Gehirnhemisphären und des Ventralganglions aus L3-Larven. Die Zellkerne der Gliazellen sind rot dargestellt (α -Repo) und das Zytoplasma der Gliazellen grün (α -GFP). Die Abbildungen sind Projektionen konfokaler Bildstapel. Anterior ist oben. **A** Wildtyp. **B, D - F** Die ektopische Aktivierung von λtop , $PI3K^{92E}$ und $Akt1$ sowie die Expression von $PTEN^{dsRNA}$ durch das UAS/Gal4-System mit dem $repoGal4$ -Treiber resultierte in keinen in dieser Vergrößerung erkennbaren morphologischen Veränderungen des Nervensystems. **C** Die Expression von ras^{64B} in Gliazellen führte zu vergrößerten optischen Stielen (Pfeile).

Da in den Zellen eines Glioms stets mehrere chromosomale Aberrationen vorliegen (Sehgal, 1998), wurden in *Drosophila* ebenfalls die Auswirkungen der simultanen ektopischen Regulation von zwei Genen untersucht. Generell lässt sich dazu sagen, dass hier im Kontrast zu der ektopischen Expression der einzelnen Transgene sehr deutlich ausgeprägte morphologische Veränderungen beobachtet wurden (Abb. 3.2). Die ektopische Aktivierung von ras^{64B} mit λtop , ras^{64B} mit $PI3K^{92E}$ und λtop mit $PI3K^{92E}$ im Expressionsmuster von $repo$ führte zu massiven Wucherungen in den optischen Loben (Abb. 3.2 A, B, D). Insbesondere die simultane Expression von ras^{64B} mit λtop sowie von ras^{64B} mit $PI3K^{92E}$ resultierte in Gehirnen mit stark asymmetrischen optischen Loben, die Wucherungen und Ausbeulungen aufwiesen (Abb. 3.2 A - B). Bei Larven mit dem Genotyp $repo >> \lambda top, ras^{64B}$ waren außerdem

massive Fehlbildungen der optischen Stiele zu beobachten, die stark vergrößert erschienen und ballonartig aufgeblähte Abschnürungen zeigten (Abb. 3.2 A). Die simultane Expression von *ras*^{64B} und *Akt1* führte zu stark angeschwollenen optischen Stielen, während die Gehirnhemisphären und das Ventralganglion wildtypisch aussahen (Abb. 3.2 C). Tiere mit den Genotypen *repo* >> *λtop*, *Akt1* sowie *repo* >> *PI3K*^{92E}, *Akt1* zeigten keine auffälligen Fehlbildungen des ZNS (Abb. 3.2 E und F).

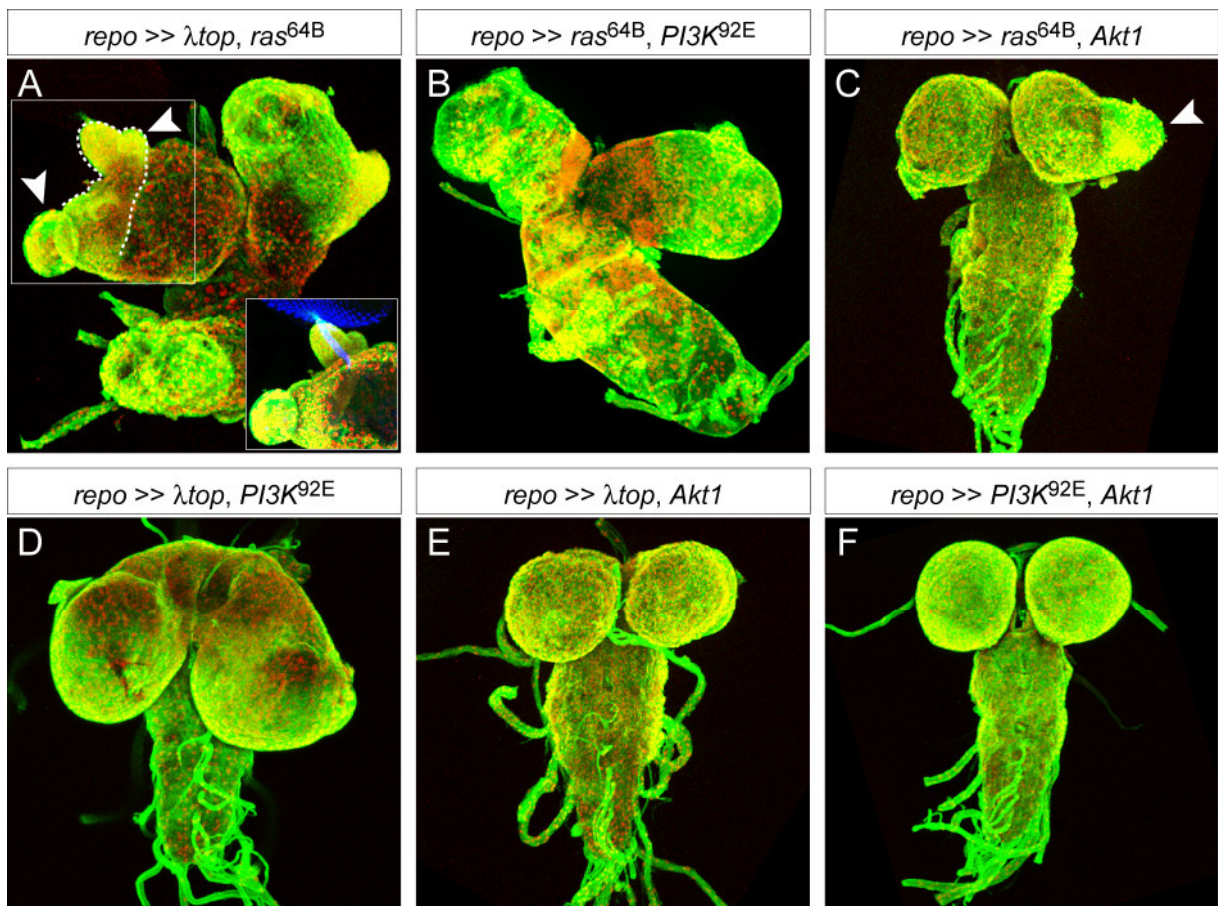


Abb. 3.2: Das ZNS von L3-Larven mit simultaner Deregulation von zwei Genen.

A - F Das ZNS von L3-Larven wurde einer immunhistochemischen Färbung mit α -Repo (rot) und α -GFP (grün) unterzogen. Bei den Abbildungen handelt es sich um konfokale Bildstapel, die auf eine Ebene projiziert wurden. Anterior ist oben. **A, B, D** Larven mit den Genotypen *repo* >> *λtop*, *ras*^{64B}, *repo* >> *ras*^{64B}, *PI3K*^{92E} und *repo* >> *λtop*, *PI3K*^{92E} hatten deutlich vergrößerte optische Loben. Bei der simultanen Aktivierung von *λtop* mit *ras*^{64B} waren außerdem die optischen Stiele extrem stark vergrößert (Pfeilköpfe in **A**). Zur Verdeutlichung der Morphologie des optischen Stiels der in **A** dargestellten Augenimaginalscheibe wurde dessen Form durch eine gestrichelte Linie hervorgehoben. In der Vergrößerung (kleine Abbildung in **A**) wurden außerdem die Neurone der Augenimaginalscheibe dargestellt (α -HRP, blau). **C** Die simultane Aktivierung von *ras*^{64B} mit *Akt1* führte zu einer Verdickung der optischen Stiele (Pfeilkopf), die Gehirnhemisphären und das Ventralganglion hingegen wirkten wildtypisch. **E, F** Larven mit dem Genotyp *repo* >> *λtop*, *Akt1* und *repo* >> *PI3K*^{92E}, *Akt1* zeigten keine morphologischen Defekte des ZNS.

Die ektopische Regulation einzelner Gene führte also nur im Fall der Aktivierung von *ras*^{64B} zu Fehlbildungen des ZNS, während die simultane Deregulation von zwei Genen bei drei der untersuchten Genotypen in ausgeprägten morphologischen Aberrationen der optischen Loben resultierte. Da das larvale Gehirn allerdings ein vergleichsweise komplexes System ist, wurde für weitere Untersuchungen die Augenimaginalscheibe verwendet.

3.1.1.3 Analyse der Morphologie der Augenimaginalscheibe bei Fehlregulation eines einzelnen Gens

Eine Augenimaginalscheibe besteht aus einem einschichtigen Epithel undifferenzierter Zellen, aus denen sich während des dritten Larvenstadiums sukzessiv in einem stereotypen Muster die Photorezeptorneurone entwickeln. Die Gliazellen wandern während dieses Stadiums aus dem optischen Stiel in die Scheibe ein, und beenden ihre Migration entlang einer Grenze posterior der morphogenetischen Furche. In der Augenimaginalscheibe sind deutlich weniger Zellen vorhanden als im Gehirn, und darüber hinaus sind Abweichungen von der typischen Anordnung und Anzahl der Zellen leicht in den zu untersuchenden Präparaten zu identifizieren (Abb. 3.).

Die genaue Anzahl der Gliazellen in der Augenimaginalscheibe und im optischen Stiel von Larven wurde mit dem 3D-Bildbearbeitungsprogramm „Volocity“ (Improvision) bestimmt. Es zeigte sich, dass die Anzahl der Gliazellen während des dritten Larvenstadiums deutlich zunimmt, wobei das Alter einer Larve anhand der Reihen an Photorezeptorneuronen (RP) bestimmt wurde. So waren in den Augenscheiben von jungen L3-Larven zunächst 155 Gliazellen vorhanden (0 - 5 RP). Diese Zahl stieg über 234 (6 - 10 RP) und 288 (11 - 15 RP) auf 345 am Ende des dritten Larvenstadiums an (16 - 20 RP) (Abb. 3.5).

Die ektopische Expression der Zielgene in Gliazellen resultierte in den meisten Fällen in einer deutlichen Varianz der Phänotypen der Augenimaginalscheiben. Diese Phänotypen ließen sich in drei Gruppen einteilen. Zunächst zeigten viele Präparate einen verdickten optischen Stiel. Weiterhin wurde in einigen Augenimaginalscheiben eine ektopische Migration von Gliazellen beobachtet. In

diesen Fällen lagen Repo-positive Zellkerne zusammen mit Axonen apikal in der Scheibe. Im Wildtyp ist die einzige vergleichbare neuronale Struktur an dieser Stelle der Bolwig-Nerv (BN). Deshalb werden im Folgenden entsprechende Strukturen als BN bezeichnet, obwohl nicht eindeutig nachgewiesen werden konnte, dass es sich tatsächlich um diesen Nerv handelt. Schließlich gab es noch Präparate, die morphologisch unauffällig waren und als wildtypisch bezeichnet werden konnten.

Die Expression von UAS λtop mit dem Treiber $repoGal4$ ergab in 63 % der untersuchten Präparate eine Vergrößerung des optischen Stiels. Insgesamt wurden 48 Augenimaginalscheiben dieses Genotyps untersucht. In 10 % der untersuchten Scheiben erfolgte ektopischer Migration glialer Zellen apikal in die Augenscheibe, während 27 % der Präparate aus Larven mit dem Genotyp $repo >> \lambda top$ keine offensichtlichen Aberrationen zeigten (Abb. 3.3 C - E und Abb. 3.4).

Durch die gliale Expression von λtop erfolgte eine Zunahme der Gliazellzahl in der Augenimaginalscheibe im Vergleich zum Wildtyp. So waren bei jungen L3-Larven (0 - 5 RP) 39 % bzw. 61 Repo-positive Zellkerne mehr vorhanden als im Wildtyp. Diese Zahl steigerte sich während des dritten Larvenstadiums kontinuierlich auf 372 (6 - 10 RP), 402 (11 - 15 RP) und schließlich 565 Gliazellen (16 - 20 RP) bzw. 164 % im Vergleich zum Wildtyp (Abb. 3.5). Ein eindeutiger Zusammenhang zwischen den beobachteten Phänotypen und der Anzahl glialer Zellen konnte aber nicht festgestellt werden. So hatten zwar Präparate mit einem verdickten optischen Stiel oder ektopischer Migration glialer Zellen in den meisten Fällen überdurchschnittlich hohe Gliazellzahlen, jedoch wurden auch bei Scheiben mit wildtypischer Morphologie mitunter Gliazellzahlen gefunden, die über dem Durchschnitt lagen. Andererseits wurde bei Präparaten mit verdicktem optischen Stiel und ektopischer Migration gelegentlich auch eine unterdurchschnittliche Anzahl glialer Zellen festgestellt, so dass sich die morphologischen Veränderungen nicht pauschal mit einer Zunahme der Zellzahl in Zusammenhang bringen lassen.

Bei der Expression von $PI3K^{92E}$ war in 24 % bzw. 11 Präparaten eine Vergrößerung des optischen Stiels und in 7 % bzw. 3 Augenimaginalscheiben Migration von Gliazellen entlang des BN zu beobachten, wobei im Vergleich zu $repo >> \lambda top$ stets deutlich weniger Repo-positive Zellkerne apikal in der Scheibe lagen. 69 % der Präparate bzw. 31 Scheiben zeigten keine morphologischen Veränderungen im Vergleich zum Wildtyp (Abb. 3.3 F - H und Abb. 3.4).

Die gliaspezifische ektopische Aktivierung von *PI3K*^{92E} resultierte insgesamt in einer Reduktion der Gliazellzahl im Vergleich zum Wildtyp. So hatten Larven mit dem Genotyp *repo* >> *PI3K*^{92E} zu Beginn des dritten Larvenstadiums (0 - 5 RP) nur 127 Gliazellen in der Augenimaginalscheibe. In Präparaten mit 6 - 10 RP wurden durchschnittlich 193 gliale Zellen gezählt, während es in Scheiben mit 11 - 15 RP 229 und bei 16 - 20 252 Zellen waren, was pauschal einer Reduktion der Gliazellzahl um 21 % im Vergleich zum Wildtyp entsprach (Abb. 3.5).

Die ektopische Aktivierung von *Akt1* in Gliazellen verursachte keine offensichtliche Zunahme der glialen Proliferation oder Migration, vielmehr zeigten alle 50 untersuchten Scheiben eine wildtypische Morphologie (Abb. 3.3 I und Abb. 3.4). Die Augenimaginalscheiben von Larven mit dem Genotyp *repo* >> *Akt1* wiesen jedoch im Durchschnitt 41 % weniger Gliazellen als im Wildtyp auf. In Präparaten mit 0 - 5 RP wurden 90 Repo-positive Zellkerne gezählt, während Larven mit 6 - 10 RP 126, mit 11 - 15 RP 158 und mit 16 - 20 RP 234 gliale Zellkerne hatten (Abb. 3.5).

Auch bei der Verringerung der *PTEN*-Expression in Gliazellen durch RNA Interferenz sahen die meisten der Präparate wildtypisch aus (98 % von 48 betrachteten Augenimaginalscheiben). 2 % bzw. eine Scheibe zeigte einen schwach ausgeprägten Migrationsphänotyp. Darüber hinaus waren oft Defekte in der Verteilung der Gliazellen basal in der Augenimaginalscheibe zu beobachten (Abb. 3.3. J - K und Abb. 3.4). Insgesamt führte die Deregulation von *PTEN* zu einer Verringerung der Gliazellzahl um 39 %. So wurde für Augenimaginalscheiben mit 0 - 5 RP eine Anzahl von 85 Gliazellen ermittelt, bei 6 - 10 RP waren es 177, bei 11 - 15 RP 176 und bei 16 - 20 RP 185 Repo-positive Zellkerne (Abb. 3.5).

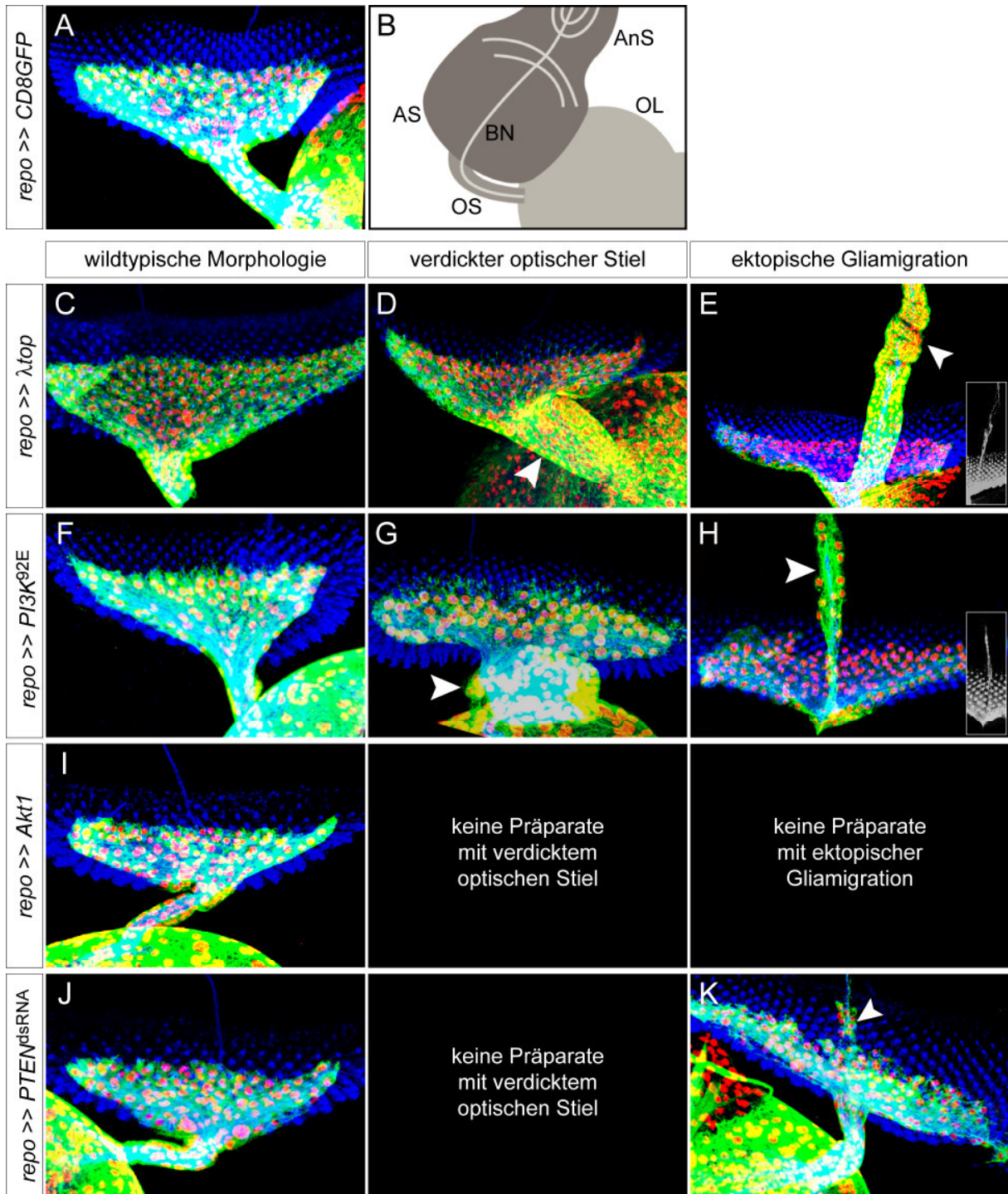


Abb. 3.3: Augenimaginalscheiben aus Larven mit Deregulation einzelner Gene in Gliazellen.

A - K Anhand der immunhistochemischen Färbung mit α -Repo (rot), α -GFP (grün) und α -HRP (blau) wurde die Morphologie der Präparate analysiert. Obwohl α -GFP und α -Repo im Präparat nicht kolokalisieren, sind in den Abbildungen gelbe Bereiche sichtbar. Diese entstehen durch die Projektion mehrerer konfokaler Schnittebenen in ein Bild. Anterior ist oben. Die Expression der Transgene UAS *CD8GFP*, UAS *λtop*, UAS *PI3K^{92E}*, UAS *Akt1* und UAS *PTEN^{dsRNA}* wurde mittels *repoGal4* induziert. **B** Schematische Darstellung der Augenimaginalscheibe. Die Augenscheibe (AS) ist über den optischen Stiel (OS) mit der Gehirnhemisphäre (optischer Lobus, OL) verbunden. Anterior schließt sich an die AS die Antennenscheibe (AnS) an. Apikal in der Scheibe liegt der Bolwig-Nerv (BN), der zum larvalen Sehsinnesorgan führt. Die ektopische Genexpression resultierte entweder in einer wildtypischen Morphologie (**C, F, I, J**), in einer Verdickung des optischen Stiels (**D, G**, Pfeilkopf) oder in ektopischer Migration von Gliazellen entlang des BN (**E, H, K**, Pfeilkopf; die kleinen Abbildungen in **E** und **H** zeigen die apikal in der Scheibe liegenden Axone).

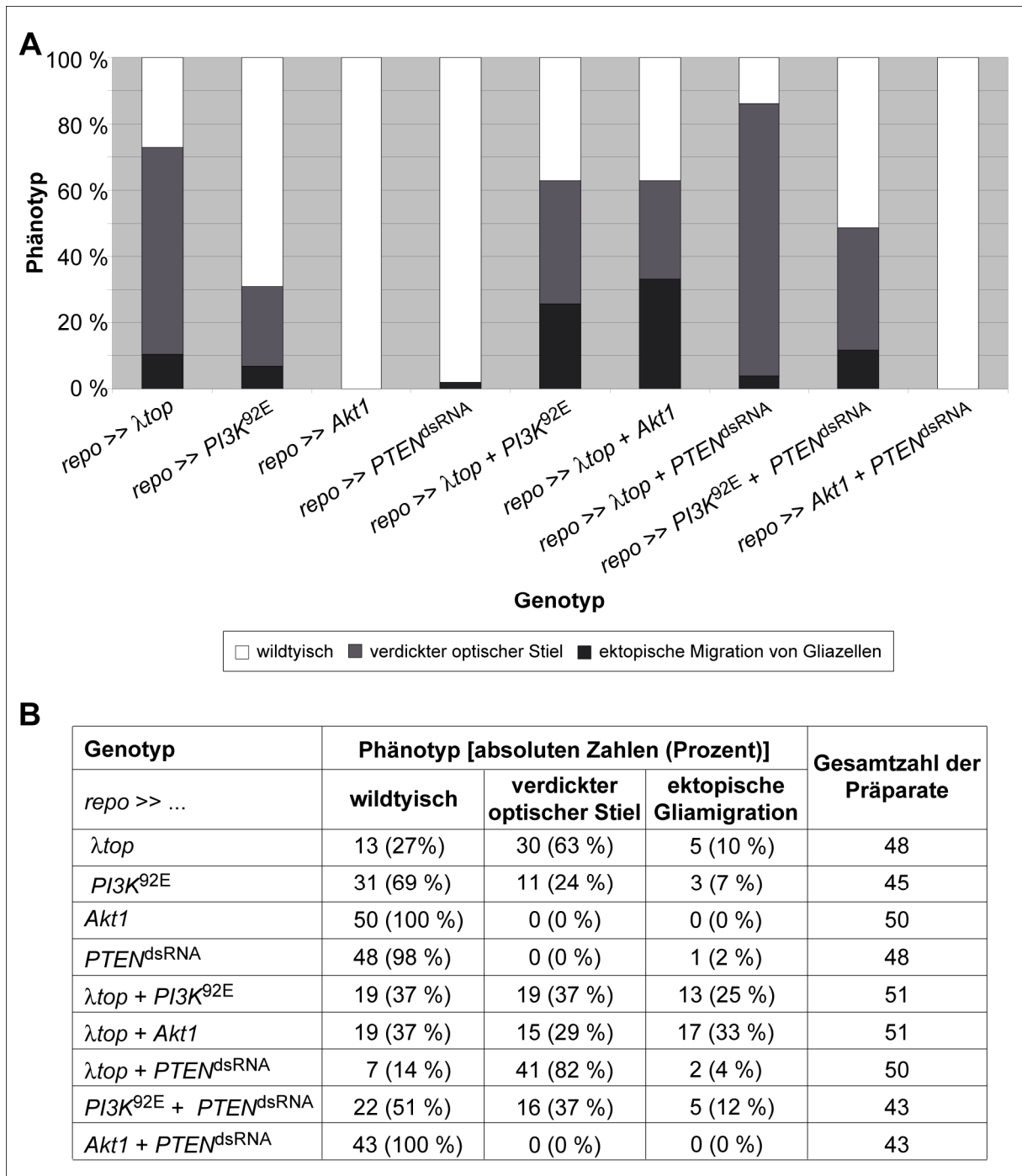


Abb. 3.4: Statistische Verteilung der Phänotypen von Augenimaginalscheiben aus Larven mit Deregulation der Zielgene.

Die aus der Fehlregulation der Genotypen resultierenden Phänotypen wurden in die drei verschiedenen Kategorien „wildtypische Morphologie“, „verdickter optischer Stiel“ und „ektopische Gliamigration“ eingeteilt. Im Diagramm **A** sind die prozentualen Anteile der einzelnen Phänotypen bei den untersuchten Genotypen graphisch dargestellt, während die Tabelle **B** einen Überblick über die genauen prozentualen Anteile der Phänotypen bei den einzelnen Genotypen sowie die absolute Anzahl der Augenimaginalscheiben gibt.

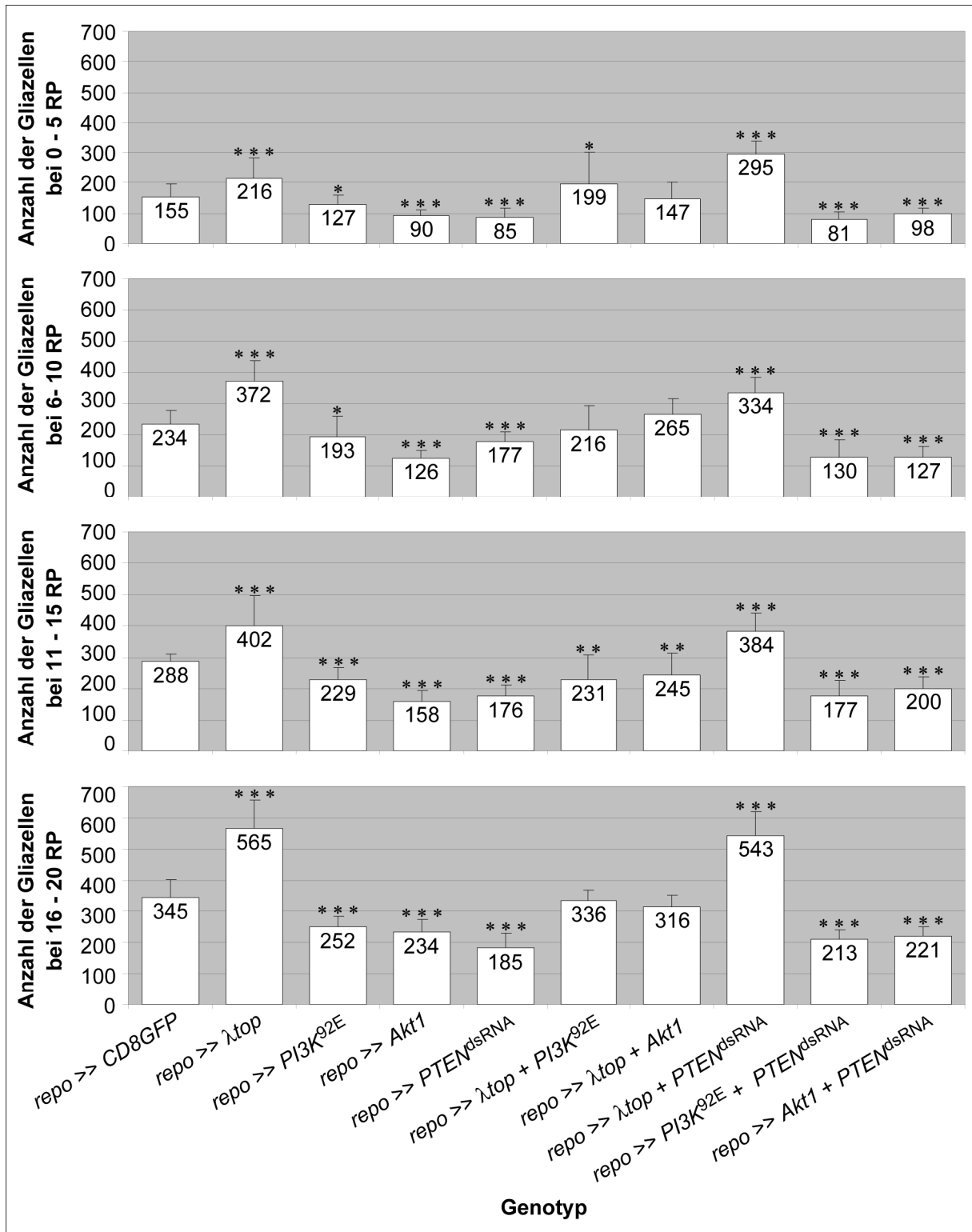


Abb. 3.5: Anzahl der Gliazellen verschiedener Genotypen in Augenimaginalscheiben unterschiedlichen Alters.

Die Zahl der Gliazellen in den Augenscheiben der verschiedenen Genotypen wurde mit Hilfe des 3D-Bildbearbeitungsprogramms „VLOCITY“ (Improvisation) bestimmt. Die Imaginalscheiben wurden anhand der Reihen an Photorezeptorneurone, die als Maßstab für das Alter dienten, in vier verschiedene Gruppen eingeteilt (0 - 5, 6 - 10, 11 - 15 und 16 - 20 Reihen an Photorezeptorneurone). Für jede Altersgruppe eines Genotyps wurden zwischen 10 und 15 Imaginalscheiben ausgewertet. Im Diagramm ist die Anzahl der Gliazellen dargestellt. Die Resultate sind in Bezug auf die für den Wildtyp ermittelten Werte von unterschiedlicher Signifikanz (nicht signifikant, $p > 0,05$; signifikant / *, $p \leq 0,05$; sehr signifikant / **, $p \leq 0,005$; höchst signifikant / ***, $p \leq 0,0005$).

Die ektopische Regulation der Zielgene beeinflusste nicht nur das Migrationsverhalten und die Anzahl der Gliazellen, sondern auch die Anordnung dieser Zellen im Verhältnis zu den Axonen der Photorezeptorneurone. Dies wurde besonders deutlich bei Betrachtung des optischen Stiels.

Die Markierung der Gliazellen der Augenimaginalscheibe mit GFP zeigte im konfokalen Laserscanning-Mikroskop feine gliale Ausläufer zwischen den Axonen des optischen Stiels. Weitere Gliazellen bildeten eine gleichmäßige Schicht um den inneren Kern aus Axonen und die sie umhüllenden Gliazellen (Abb. 3.6 A). Die Deregulation der Zielgene führte zu Veränderungen dieser regelmäßigen Anordnung. Die Expression von λtop mit dem Treiber *repoGal4* resultierte in sehr vielen glialen Zellkernen um das Axonbündel herum (Abb. 3.6 B). Im optischen Stiel von Larven, die $PI3K^{92E}$, *Akt1* oder $PTEN^{dsRNA}$ im *repoGal4*-Muster exprimierten, zeigten sich zwischen den Axonen deutlich sichtbare gliale Ausläufer (Abb. 3.6 C - E). Diese waren bei Larven mit dem Genotyp *repo* >> *Akt1* allerdings wesentlich stärker ausgeprägt als bei *repo* >> $PI3K^{92E}$ oder *repo* >> $PTEN^{dsRNA}$. Die Gliazellen lagen hier als kompakte Strukturen zwischen den Axonen.

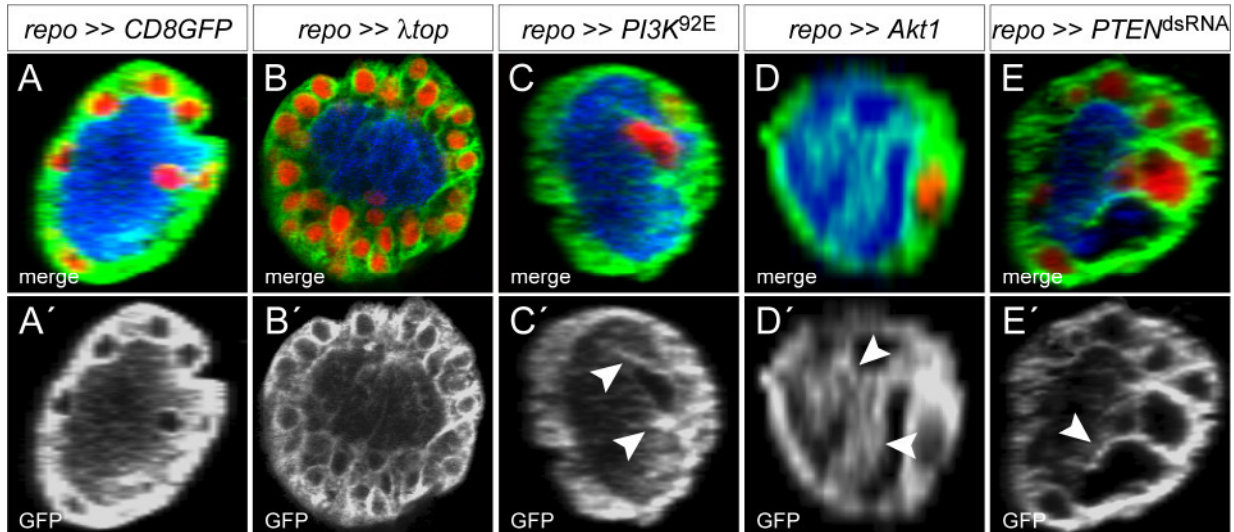


Abb. 3.6: Querschnitt durch den optischen Stiel von L3-Larven, die einzelne Transgene mit dem Gal4-Treiber *repo* exprimieren.

A - E Immunhistochemische Färbung des optischen Stiels aus L3-Larven. In den Präparaten sind die Zellkerne der Gliazellen mit α -Repo (in rot dargestellt), das Zytoplasma der Gliazellen mit α -GFP (grün bzw. weiss) und die Nervenzellen mit α -HRP (blau) markiert. Bei den Abbildungen handelt es sich um orthogonale Rekonstruktion konfokaler Bildstapel. **A', A'** Wildtyp **B, B'** Die Axone des optischen Stiels von Larven mit dem Genotyp *repo* >> λtop waren von mehr glialen Zellen umgeben als im Wildtyp. **C, C' - E, E'** Die Aktivierung von $PI3K$ und *Akt1* sowie die Expression von $PTEN^{dsRNA}$ mit dem Gal4-Treiber *repo* resultierte in prominenten glialen Strukturen zwischen den Axonen, die vor allem bei der Expression von *Akt1* einen großen Teil des normalerweise Neurone enthaltenden Bereich des Nervs beanspruchten (Pfeilköpfe).

Die ektopische Regulation einzelner Gene führte also bei einem Teil der Larven zu morphologischen Veränderungen der Augenimaginalscheibe. Die Penetranz war allerdings meist nur gering und viele der untersuchten Präparate sahen wildtypisch aus. Im optischen Stiel wurden deutliche Veränderungen in der Struktur der Gliazellen beobachtet.

3.1.1.4 Analyse der Morphologie der Augenimaginalscheibe bei simultaner Fehlregulation von zwei Genen

Im Folgenden wurde untersucht, welche Effekte die simultanen Deregulation von zwei Genen auf die Morphologie der Augenimaginalscheibe hatte.

Von Larven mit den Genotypen *repo* >> *λtop*, *PI3K^{92E}* wurden insgesamt 51 Augenimaginalscheiben untersucht. Von diesen zeigten 13 Scheiben (25 %) ektopische Migration glialer Zellen entlang des BN. Oft traten auch Fehlbildungen des optischen Stiels auf, der wesentlich dicker erschien als im Wildtyp (in 19 Präparaten bzw. 37 %). In beiden Fällen schien die Migration der Gliazellen basal in die Scheibe eingeschränkt zu sein. Weitere 37 % der untersuchten Scheiben wiesen keinen offensichtlich von der Morphologie des Wildtyps abweichenden Phänotyp auf (Abb. 3.7 A - C und Abb. 3.4). Im Gegensatz zu der Expression von *λtop* oder *PI3K^{92E}*, bei denen 10 % bzw. 7 % der untersuchten Scheiben ektopische Gliamigration gezeigt hatten, führte die simultane Fehlregulation dieser beiden Transgene also zu einer Steigerung des prozentualen Anteils von Augenscheiben mit ektopischer Migration von Gliazellen auf die apikale Seite der Scheibe.

Die Anzahl der Gliazellen in den Augenimaginalscheiben von Larven, die *PI3K^{92E}* mit *λtop* überexprimierten, war zu Beginn des dritten Larvenstadiums etwas höher als im Wildtyp und lag bei 199 (0 - 5 RP), während Larven mit 6 - 10 RP 216, mit 11 - 15 RP 231 und mit 16 - 20 RP 336 Repo-positive Zellkerne hatten (Abb. 3.5). Die simultane Expression von *PI3K^{92E}* und *λtop* führte also einerseits zu häufigerem Auftreten ektopischer Gliamigration im Vergleich zur Aktivierung der einzelnen Transgene. Andererseits entsprach die Anzahl der Repo-positive Kerne in den Augenimaginalscheiben im Durchschnitt der Gliazellzahl des Wildtyps, während die Deregulation von *λtop* zu einer Zunahme der Gliazellzahl geführt hatte, und die ektopische Expression von *PI3K^{92E}* zu einer Verringerung.

Die Augenimaginalscheiben von Larven, die UAS λtop mit UAS $Akt1$ im $repoGal4$ -Muster exprimierten, zeigten zu 33 % (17 von 51 analysierten Präparate) ektopische Migration von Gliazellen entlang einer neuronalen Struktur apikal in der Augenimaginalscheibe. Gleichzeitig waren oftmals basal in der Scheibe weniger gliale Zellen vorhanden. 29 % bzw. 15 der betrachteten Scheiben zeigten eine Verdickung des optischen Stiels und 37 % (19 Präparate) keine Abweichungen von der Morphologie des Wildtyps (Abb. 3.7 D - F und Abb. 3.4). Damit war hier ein ähnliches Phänomen zu beobachten wie bei der simultanen Expression von λtop und $PI3K^{92E}$, bei der ektopische Gliamigration deutlich häufiger auftrat als bei der ektopischen Aktivierung der einzelnen Konstrukte.

Bei Larven mit dem Genotyp $repo \gg \lambda top, Akt1$ wurde eine Gliazellzahl ermittelt, die durchschnittlich 96 % des Wildtyps entsprach. Augenscheiben aus Larven mit 0 - 5 RP wiesen 147 Repo-positive Zellkerne auf, während in Präparaten mit 6 - 10, 11 - 15 und 16 - 20 RP 265, 245 und 316 Gliazellen gezählt wurden (Abb. 3.5). Wie auch bei Larven mit dem Genotyp $repo \gg \lambda top, PI3K^{92E}$ entsprach hier die Anzahl der glialen Zellkerne in der Augenscheibe im Durchschnitt dem Wildtyp, während die Expression von λtop zu einer größeren und die Aktivierung von $Akt1$ zu einer geringeren Anzahl Repo-positiver Zellkerne geführt hatte. Die Phänotypen von Larven mit den Genotypen $repo \gg \lambda top, PI3K^{92E}$ und $repo \gg \lambda top, Akt1$ zeigten also deutliche Parallelen zueinander, die sich in verstärktem Auftreten von Augenscheiben mit ektopischer Migration von Gliazellen entlang des BN und einer dem Wildtyp entsprechenden Gliazellzahl äußerten.

Die gliale Verringerung der $PTEN$ -Expression in Kombination mit der Aktivierung von λtop führte zu einer starken Proliferation der Gliazellen, die sich in 82 % bzw. 41 von 50 Präparaten in einer Verdickung des optischen Stiels ausprägte. 2 der Präparate (4 %) wiesen ektopische Migration von Gliazellen auf, während 7 Augenscheiben (14 %) keine morphologischen Aberrationen zeigten (Abb. 3.7 G - I und Abb. 3.4). Die simultane Expression von λtop und $PTEN^{dsRNA}$ führte also zu einer Reduktion der Präparate mit Migrationsphänotyp um 6 % und einem Anstieg der Scheiben mit verdicktem optischen Stiel um 19 % gegenüber der alleinigen Aktivierung von λtop . Für Larven mit dem Genotyp $repo \gg \lambda top, PTEN^{dsRNA}$ wurde eine deutlich höhere Anzahl glialer Zellen ermittelt als im Wildtyp. So wurden in den vier verschiedenen Altersgruppen (0 - 5, 6 - 10, 11 - 15 und 16 - 20 RP) 295, 334, 384 und 543

Gliazellen gezählt, was gegenüber dem Wildtyp im Durchschnitt 56 % mehr Repopositiven Zellkernen entsprach und den Zahlen der alleinigen Aktivierung von *λtop* gleich (Abb. 3.5). Die Expression des Transgens UAS *PTEN*^{dsRNA} schien also nur geringe Auswirkungen auf den Phänotyp zu haben.

Bei der simultanen Deregulation von *PTEN* und *PI3K*^{92E} mit dem Gal4-Treiber *repo* war die Migration der Gliazellen in die Augenimaginalscheibe beeinträchtigt. Insbesondere bei Scheiben aus älteren Larven war der optische Stiel dicker (16 von 43 Präparaten bzw. 37 %). Gelegentlich kam es auch zu ektoptischer Migration von Gliazellen (5 Augenscheiben, entsprechend 12 %), während 22 (51 %) der Präparate keine Aberrationen aufwiesen (Abb. 3.7 J - L und Abb. 3.4). Hier nahm also die Zahl der Scheiben mit ektoptischen Gliamigration um 5 % gegenüber der alleinigen Expression von *PI3K*^{92E} zu, und es traten 13 % mehr Präparate mit einem veränderten optischen Stiel auf.

Bei der simultanen ektoptischen Regulation von *PI3K*^{92E} und *PTEN* waren in Augenimaginalscheiben mit 0 - 5 RP 81 Gliazellen vorhanden, während es in Scheiben mit 6 - 10 RP 130 und bei 11 - 15 RP 177 Zellen waren. In Präparaten mit 16 - 20 RP wurden 213 Gliazellen gezählt (Abb. 3.5). Somit waren bei der simultanen Expression *PI3K*^{92E} und *PTEN*^{dsRNA} im Durchschnitt 42 % weniger Gliazellen als in Augenimaginalscheiben des Wildtyps vorhanden. Dies entsprach etwa der durchschnittlichen Gliazellzahl von Larven mit dem Genotyp *repo* >> *PTEN*^{dsRNA}. Bei diesen wurden in den Augenimaginalscheiben 39 % weniger Gliazellen gefunden als im Wildtyp, wohingegen bei der alleinigen Expression von *PI3K*^{92E} eine Reduktion um 21 % festgestellt wurde.

Die Augenimaginalscheiben aus Larven mit dem Phänotyp *repo* >> *Akt1*, *PTEN*^{dsRNA} wirkten wildtypisch. Insgesamt wurden hier 43 Präparate analysiert (Abb. 3.7 M und Abb. 3.4). Bei Tieren mit dem Genotyp *repo* >> *Akt1*, *PTEN*^{dsRNA} wurden 98, 127, 200 und 221 Gliazellen ermittelt (bei Präparaten mit 0 - 5, 6 - 10, 11 - 15 und 16 - 20 RP) (Abb. 3.5). Ebenso wie die ektoptische Expression von *Akt1* oder *PTEN*^{dsRNA} alleine führte auch die simultane Deregulation beider Transgene zu einer Verringerung der Gliazellzahl um durchschnittlich 37 % im Vergleich zum Wildtyp.

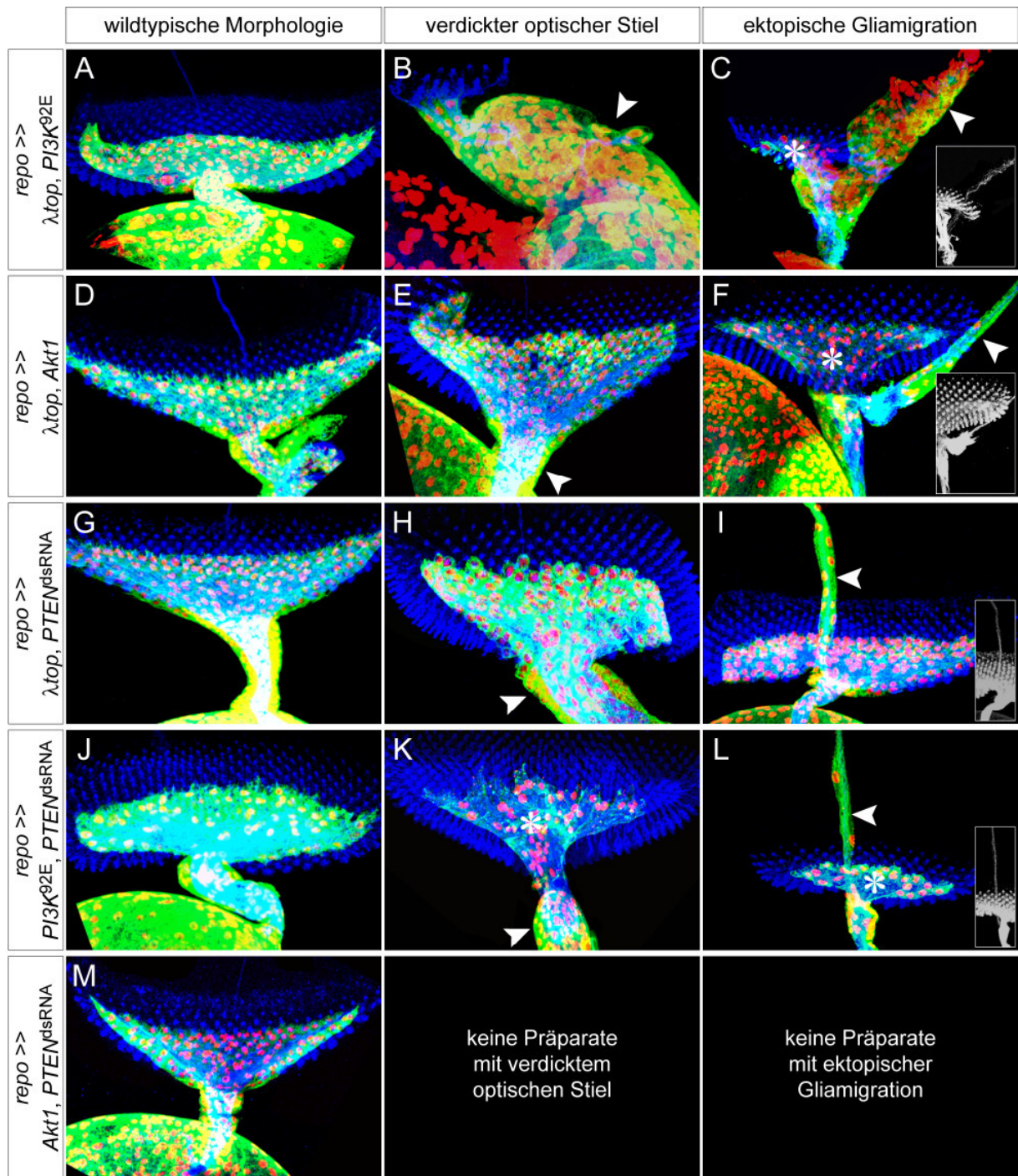


Abb. 3.7: Augenscheiben aus Larven mit simultaner Deregulation von zwei Genen.

A - M Die Präparate wurden mit α -Repo (rot), α -GFP (grün) und α -HRP (blau) angefärbt. Die Abbildungen sind Projektionen konfokaler Bildstapel. Anterior ist oben. Die Augenimaginalscheiben von Larven mit den Genotypen *repo >> λtop, PI3K^{92E}*, *repo >> λtop, Akt1*, *repo >> λtop, PTEN^{dsRNA}*, *repo >> PI3K^{92E}, PTEN^{dsRNA}* und *repo >> Akt1, PTEN^{dsRNA}* zeigten variable Phänotypen. **Linke Spalte** Ein Teil der untersuchten Präparate zeigte eine wildtypische Morphologie. **Mittlere Spalte** Abgesehen von Larven, die UAS *Akt1* mit UAS *PTEN^{dsRNA}* unter der Kontrolle von *repoGal4* exprimierten, wiesen alle untersuchten Genotypen in einem Teil der Präparate eine Verdickung des optischen Stiels auf (Pfeilköpfe). **Rechte Spalte** Wiederum abgesehen von Larven mit dem Genotyp *repo >> Akt1, PTEN^{dsRNA}* kam es bei allen untersuchten Genotypen gelegentlich zu ektopischer Migration von Gliazellen entlang des BN (Pfeilköpfe; die kleinen Abbildungen zeigen die apikal in der Scheibe liegenden Axone). Darüber hinaus war mitunter eine verringerte Gliazellzahl basal in der Scheibe zu beobachten (**C, F, K, L, Sterne**).

Insgesamt resultierte also die simultane Deregulation von zwei Genen in deutlich stärker ausgeprägten und häufiger auftretenden Defekten als die ektopische Regulation eines einzelnen Gens. Es konnte sowohl eine Stimulation der glialen Proliferation als auch ektopische Migration beobachtet werden. Letztere trat vor allem bei Larven mit dem Genotyp *repo >> λtop, PI3K^{92E}* und *repo >> λtop, Akt1* auf. Die Deregulation von *PTEN* durch Expression von doppelsträngiger RNA hatte nur schwache Auswirkungen auf die Phänotypen, so dass anzunehmen ist, dass durch die Expression des Transgens *UAS PTEN^{dsRNA}* nur eine geringe Funktionsreduktion von PTEN erreicht wurde.

3.1.2 Carpet Glia zeigen in Augenscheiben mit Migrationsphänotyp eine aberrante Morphologie und Lokalisation

Die Gliazellen in Augenimaginalscheiben des Wildtyps nehmen verschiedene Aufgaben wahr, und lassen sich anhand ihrer Morphologie und Lokalisation sowie ihres Genexpressionsmusters in verschiedene Subtypen einteilen (Rangarajan *et al.*, 1999; Hummel *et al.*, 2002, Silies *et al.*, 2007). Eine wichtige Funktion bei der normalen Entwicklung der Augenimaginalscheibe hat die Carpet Glia, welche die Migration anderer Gliazellen in die Augenscheibe reguliert (Silies *et al.*, 2007).

Die Zellkerne der Carpet Glia lassen sich aufgrund ihrer Größe identifizieren und befinden sich meist am Übergang vom optischen Stiel zur Augenscheibe (Abb. 3.8 A - C). Auch bei Augenimaginalscheiben mit ektopischer Migration von Gliazellen entlang des BN war in vielen Fällen zumindest ein vergrößerter Zellkern zu erkennen, der jedoch apikal in der Scheibe entlang des BN lag (Abb. 3.8 D - G).

Allein anhand der Größe der glialen Zellkerne lässt sich allerdings nicht sicher bestimmen, ob ein größer erscheinender Zellkern tatsächlich einer Carpet Glia zugehörig ist. Ebenso wenig lässt sich eine Aussage über die Morphologie oder Position der Zelle machen. Eine gute Möglichkeit dazu bietet die Verwendung der GFP Exon Trap-Linie #261 (Abb. 3.9). Eine immunhistochemische Färbung fixierter Augenimaginalscheiben der Exon Trap-Linie #261 zeigte während der verschiedenen Entwicklungsstadien ein deutliches GFP-Signal im bereits differenzierten Bereich der Augenimaginalscheibe. Zusätzlich war entlang der Axone im apikalen Teil der Scheibe ein GFP-Signal zu detektieren (Abb. 3.9).

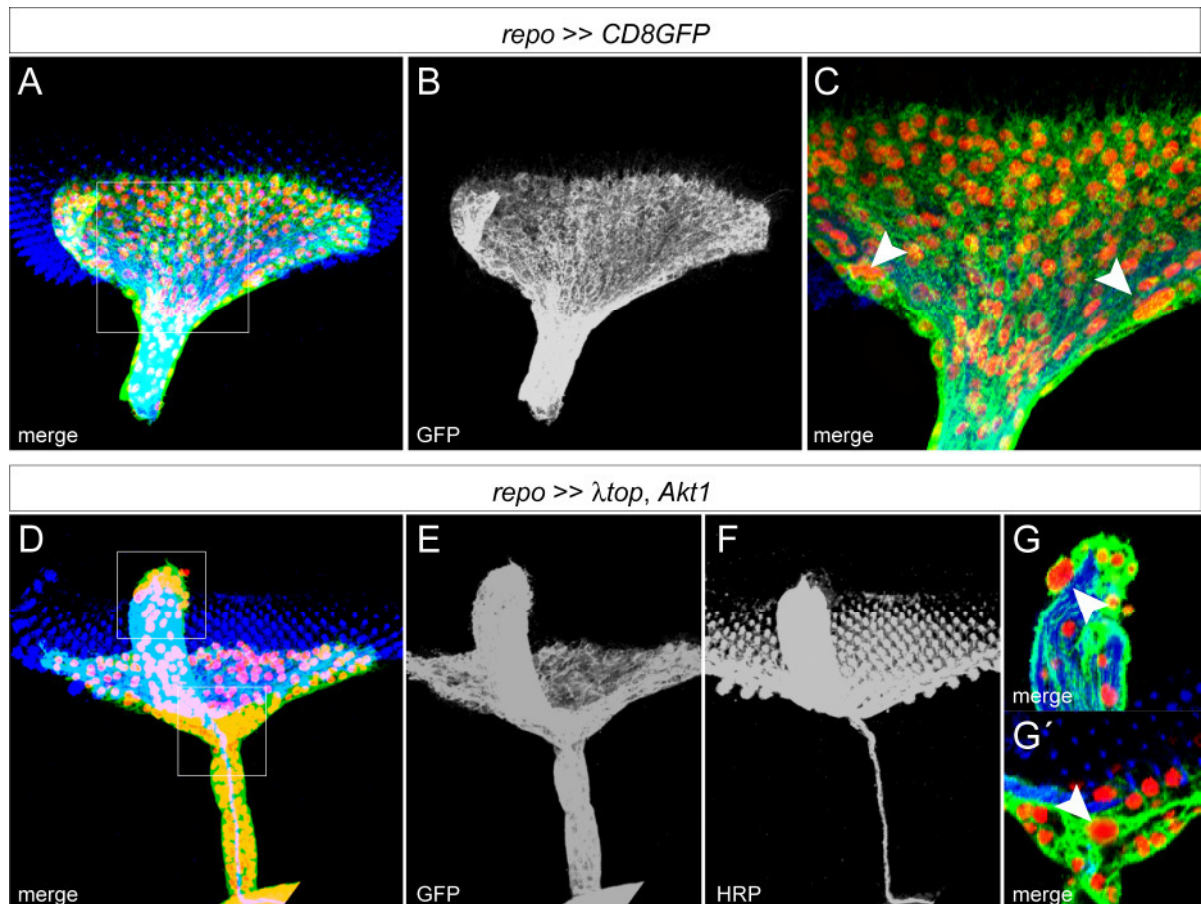


Abb. 3.8: In der Augenimaginalscheibe gibt es zwei gliale Zellkerne, die sich von den übrigen aufgrund ihrer Größe unterscheiden.

A - G Konfokale Analyse des Musters von Gliazellen und Neuronen in Augenimaginalscheiben aus Larven des dritten Larvalstadiums. **C** und **G** sind konfokale Einzelbilder, die übrigen Abbildungen sind Projektionen konfokaler Bildstapel. Die Präparate wurden einer immunhistochemischen Färbung unterzogen (rot, α -Repo; grün bzw. weiss, α -GFP; blau bzw. weiss, α -HRP). Anterior ist oben. **A - C** In Augenimaginalscheiben des Wildtyps befanden sich am Übergang vom optischen Stiel zur Scheibe zwei gliale Zellkerne, die größer waren als die übrigen (Pfeilköpfe). **D - G** Auch in Augenimaginalscheiben mit Migrationsphänotyp, hier vor dem genetischen Hintergrund der ektopischen Expression von *λtop* und *Akt1* in Gliazellen, waren vergrößerte Repo-positive Kerne zu sehen. Diese lagen oft apikal in der Scheibe, wo sie mit neuronalen Strukturen kolokalisierten.

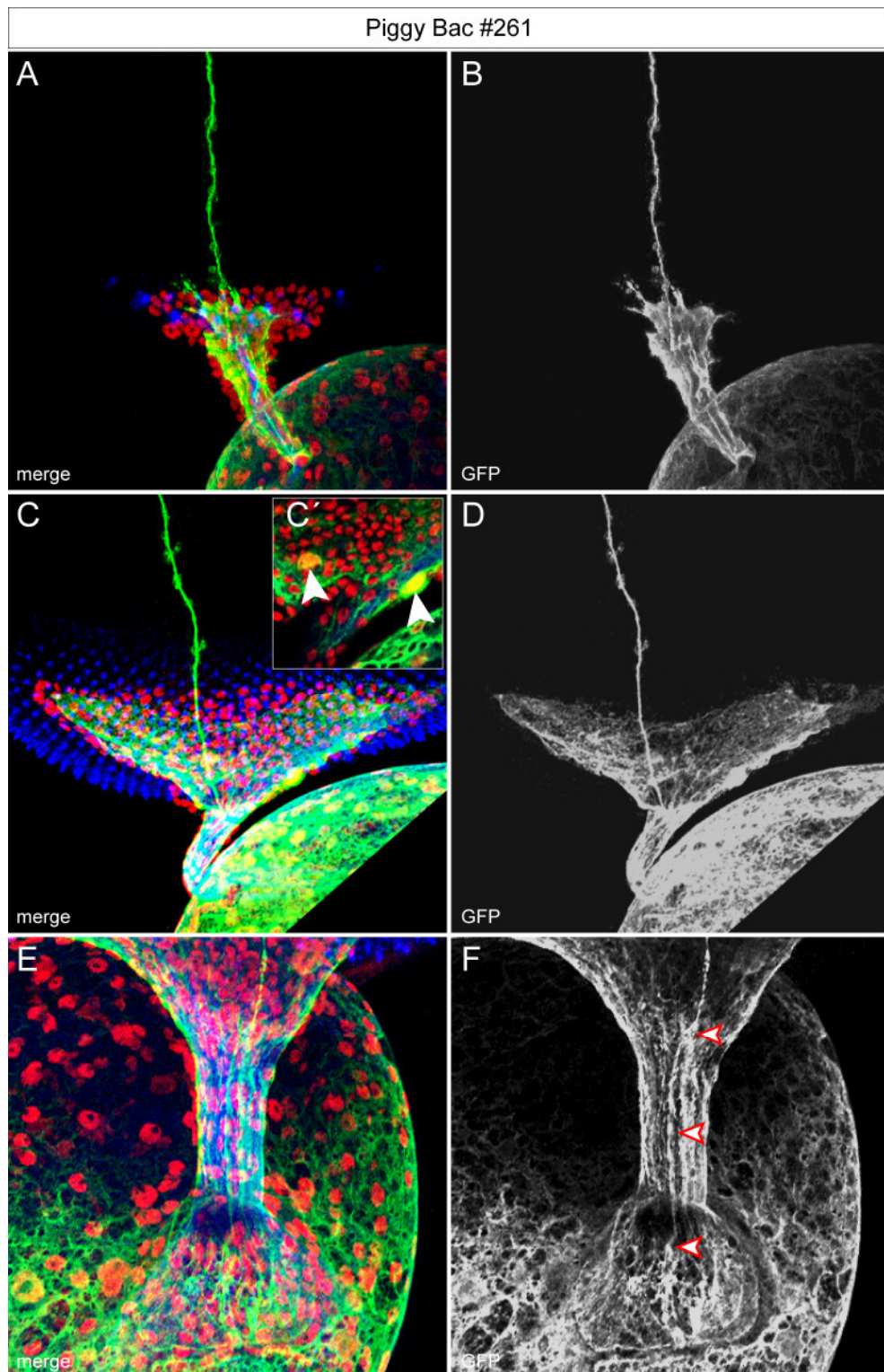


Abb. 3.9: Visualisierung der Morphologie und Position der Carpet Glia durch ectopisch exprimiertes GFP.

A - F Immunhistochemische Färbung von Augenimaginalscheiben aus Larven des dritten Larvalstadiums. Die Zellkerne der Gliazellen sind rot dargestellt (α -Repo), das Zytoplasma der Gliazellen grün bzw. weiss (α -GFP) und die Nervenzellen blau (α -HRP). Die Abbildungen **A - F** sind Projektionen konfokaler Bildstapel, und **C'** ist ein konfokales Einzelbild, in dem Zellkerne dargestellt sind, die wahrscheinlich zu den Carpet Glia gehören (Pfeilköpfe). Anterior ist oben. **A - F** Augenimaginalscheiben verschiedenen Alters aus Larven der Piggy Bac-Linie #261. Die Pfeilköpfe in **F** weisen auf den Verlauf des GFP-Signals hin, das sich weiter apikal in der Scheibe entlang des BN fortsetzt.

Anhand der zytoplasmatischen Markierung der Carpet Glia mit GFP zeigte sich, dass die Position und Morphologie dieser Zellen in Augenimaginalscheiben mit Migrationsphänotyp variabel war (Abb. 3.10). Dieser Sachverhalt soll anhand von Larven mit dem Genotyp Piggy Bac #261, *repo* >> *λtop*, *Akt1* verdeutlicht werden. Insgesamt wurden 30 Augenscheiben aus Larven mit diesem Genotyp betrachtet. Elf der Scheiben zeigten einen Migrationsphänotyp, während in den restlichen 19 Präparaten keine ektopische Migration von Gliazellen zu beobachten war. Bei letzteren war die Morphologie der Carpet Glia immer dem Wildtyp ähnlich (Abb. 3.10 A - C). Der Migrationsphänotyp war in den untersuchten Präparaten unterschiedlich stark ausgeprägt, wobei ein Zusammenhang zwischen der Position der Carpet Glia und der Anzahl ektopisch migrierender Gliazellen bestand. So war in drei Präparaten, bei denen die vergrößerten Zellkerne der Carpet Glia am Übergang vom optischen Stiel zur Augenimaginalscheibe lagen, entlang des BN ein GFP-Signal zu sehen, dass mit den Axonen kolokalisierte. Gleichzeitig waren nur wenige gliale Zellkerne entlang des BN zu detektieren (Abb. 3.10 D - F). In den übrigen acht Präparaten mit Migrationsphänotyp war in einem breiten Bereich um den BN herum eine GFP-Färbung erkennbar. In diesen Fällen lag auch zumindest einer der Carpet Glia-Zellkerne in dem entsprechenden Gebiet, ebenso wie eine große Anzahl weiterer glialer Zellkerne (Abb. 3.10 G - I). In allen Augenimaginalscheiben mit Migrationsphänotyp waren basal in der Scheibe nur einige dünne zelluläre Fortsätze der Carpet Glia zu sehen (Abb. 3.10 E und H). Es scheint also einen Zusammenhang zwischen der Position der Carpet Glia und der Anzahl der ektopisch migrierenden Zellen zu geben.

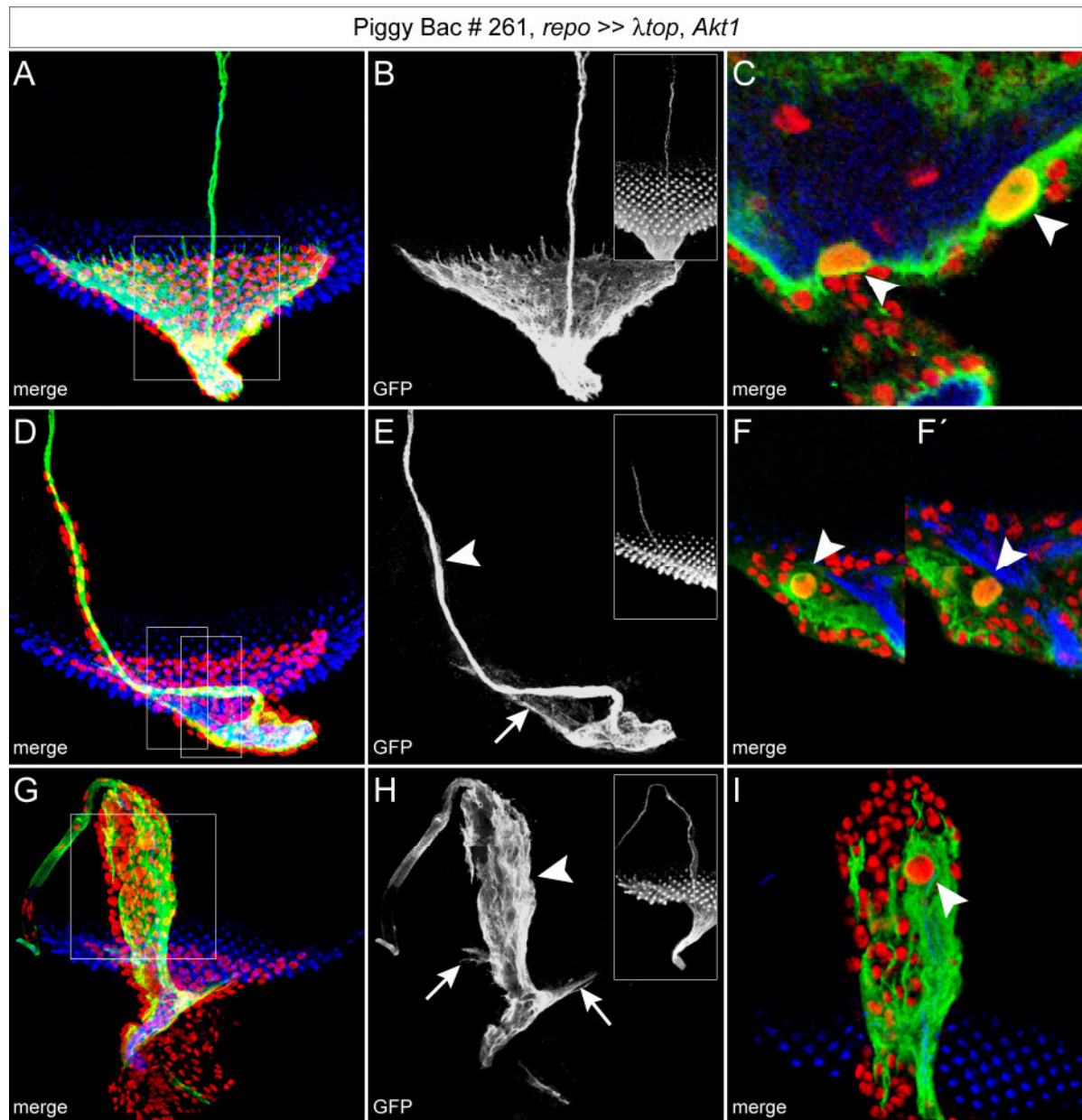


Abb. 3.10: Morphologie und Position der Carpet Glia sind in Augenscheiben mit Migrationsphänotyp anders als im Wildtyp.

A - I Augenimaginalscheiben aus Larven des dritten Larvalstadiums mit dem Genotyp Piggy Bac #261, *repo* >> *λtop*, *Akt1* wurden zur Visualisierung der Morphologie mit Antikörpern markiert. Die Zellkerne der Gliazellen sind rot dargestellt (α -Repo), das Zytoplasma der Gliazellen grün bzw. weiss (α -GFP) und die Nervenzellen blau (α -HRP). Die Abbildungen sind Projektionen konfokaler Bildstapel, abgesehen von **C**, **F** und **I**, die Vergrößerungen konfokaler Einzelbilder der in **A**, **C** und **G** durch Rahmen angedeuteten Bildausschnitte sind. Anterior ist oben. **A - C** In Augenimaginalscheiben mit wildtypischer Morphologie entspricht die Form und Position der Carpet Glia dem Wildtyp (**A**, **B**). Die vergrößerten Gliazellkerne lagen am Übergang vom optischen Stiel zur Augenscheibe (**C**, Pfeilköpfe). **D - F** Von den Carpet Glia waren basal in der Scheibe nur einige dünne Ausläufer zu sehen (**D**, **E**). Die vergrößerten Gliazellkerne lagen am Übergang vom optischen Stiel zur Augenscheibe (**F**, Pfeilköpfe). **G - I** Auch hier waren basal in der Scheibe nur einige Ausläufer der Carpet Glia vorhanden. In einem breiten Bereich um die apikal über die Scheibe verlaufenden Neurone war jedoch ein GFP-Signal zu sehen (**G**, **H**). Auch einer der vergrößerten Gliazellkerne lag hier (**I**, Pfeilkopf).

3.1.3 Einfluss von Akt auf die Gliazellen der Augenimaginalscheibe

Die Akt-Kinase phosphoryliert ein breites Spektrum verschiedener Ziele, darunter GSK3, P21/Waf1/Cip1, P27/Kip2, Tor, TSC2, FKHR, Bad oder NFkB, durch die sie auch Einfluss auf die Zellmotilität nimmt (Manning und Cantley, 2007). Nachfolgend sollte untersucht werden, ob Akt1 stimulierend oder inhibierend auf die Migration von Zellen wirkt (Abb. 3.11).

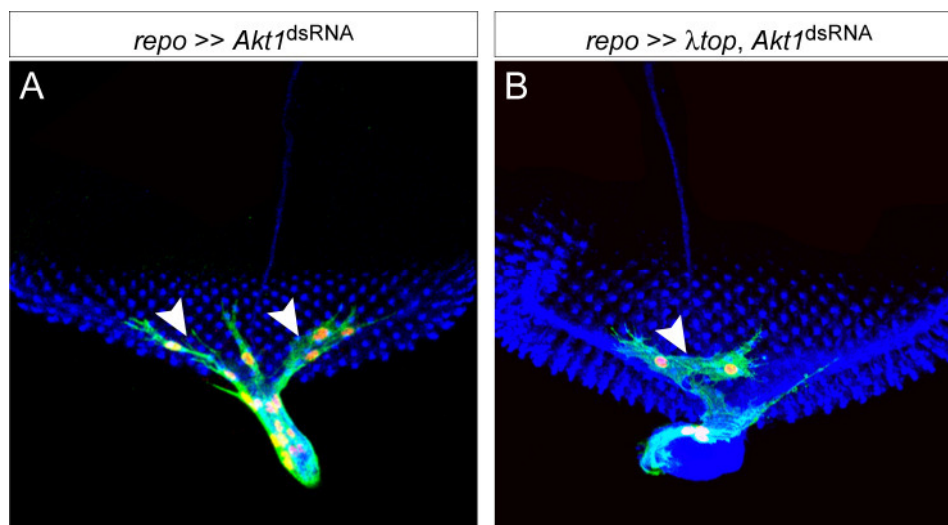


Abb. 3.11: Akt1 beeinflusst die Gliazellzahl in der Augenimaginalscheibe.

A - B Konfokale Analyse von Augenimaginalscheiben aus Larven mit dem Genotyp *repo >> Akt1*. Die Zellkerne der Gliazellen sind rot dargestellt (α -Repo), das Zytoplasma der Gliazellen grün (α -GFP) und die Nervenzellen blau (α -HRP). Die Abbildungen sind Projektionen konfokaler Bildstapel. Anterior ist oben. Larven mit den Genotypen *repo >> Akt1^{dsRNA}* und *repo >> lambda top, Akt1^{dsRNA}* zeigten eine drastische Reduktion der Gliazellen in der Augenimaginalscheibe (Pfeilköpfe).

Die RNA Interferenz-vermittelte Verringerung der *Akt1*-Expression in Gliazellen resultierte in einer extremen Abnahme der Anzahl glialer Zellen in der Augenscheibe. Ebenso führte auch die simultane Expression von UAS *Akt1^{dsRNA}* und UAS *lambda top* mit *repoGal4* zu einer ähnlichen drastischen Reduktion der Gliazellzahl (Abb. 3.11 A und B). Von beiden Genotypen wurden zehn Augenimaginalscheiben analysiert. Für *repo >> Akt1^{dsRNA}* wurde eine durchschnittliche Anzahl von 24 Gliazellen festgestellt, während es bei *repo >> lambda top, Akt1^{dsRNA}* 39 waren (bei 10 - 20 Reihen an Photorezeptorneuronen).

Akt1 scheint also für die Regulation der Zellzahl wichtig zu sein. Darüber hinaus wirkt es in Kombination mit aktiviertem *lambda top* stimulierend auf die Migration von Gliazellen (Abb. 3.7 und 3.4).

3.1.4 Untersuchung der Funktion von PTEN

Etwa 30 % aller Glioblastome weisen Deletionen des *PTEN*-Locus auf. Eine Konsequenz daraus ist die Stimulation der zellulären Proliferation (Li *et al.*, 1997). In dieser Arbeit wurde bisher gezeigt, dass ein gliaspezifischer *knock down* von *PTEN* durch RNA Interferenz in der Augenimaginalscheibe zu einer Reduktion der Gliazellen um etwa 40 % führte. Die Morphologie der Scheibe blieb dabei weitgehend unbeeinträchtigt. Allerdings wurden morphologische Defekte in der Struktur des optischen Stiels nachgewiesen (Abb. 3.3 - 3.6).

Für eine weitere Charakterisierung der Auswirkungen, die sich aus der Deregulation von *PTEN* ergeben, wurden nun die peripheren Nerven untersucht (Abb. 3.12).

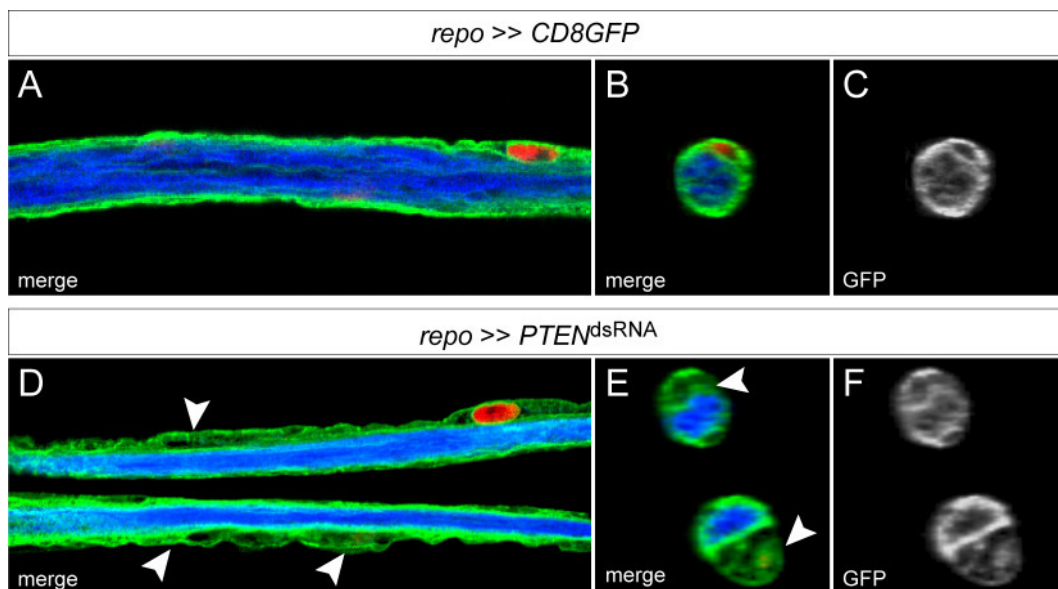


Abb. 3.12: RNA Interferenz-vermittelte Verringerung der Expression von *PTEN* in Gliazellen resultiert in morphologischen Aberrationen der peripheren Nerven.

A - F Periphere Nerven aus Larven des dritten Larvalstadiums wurden mit verschiedenen Antikörpern markiert. Die glialen Zellkerne sind rot (α -Repo), das Zytoplasma der Gliazellen grün bzw. weiss (α -GFP) und die Nervenzellen blau (α -HRP) dargestellt. Die Abbildungen **links** sind einzelne konfokale Schnittebenen, während in der **Mitte** und **rechts** orthogonale Rekonstruktionen konfokaler Bildstapel dargestellt sind. **A - C** Wildtyp. **D - F** Die Pfeilköpfe weisen auf Stellen in den peripheren Nerven der Larven mit dem Genotyp *repo >> PTEN^{dsRNA}* hin, an denen die Hülle aus Gliazellen um die Axone herum besonders dick ist.

In den peripheren Nerven sind die Axone mit verschiedenen Arten von Gliazellen assoziiert und von diesen in unterschiedlichen Schichten umgeben (Stork *et al.*, 2008). Bei wildtypischen Larven bildeten die Gliazellen eine gleichmäßige, relativ dünne Hülle um das Axonbündel (Abb. 3.12 A - C). Die peripheren Nerven von

Larven mit dem Genotyp *repo* >> *PTEN*^{dsRNA} zeigten hingegen eine Schicht aus Gliazellen um die Axone herum, die teilweise wesentlich dicker als im Wildtyp erschien (Abb. 3.12 D - F).

Da die verringerte Expression von *PTEN* offenbar in morphologischen Veränderungen der Gliazellen in den peripheren Nerven resultierte, wurde im nächsten Schritt überprüft, ob dieses Phänomen auf eine Zunahme der Gliazellzahl zurückzuführen ist. Dazu wurde zunächst die Anzahl der Gliazellen in den peripheren Nerven von Larven des Wildtyps bestimmt (Abb. 3.13 und 3.14).

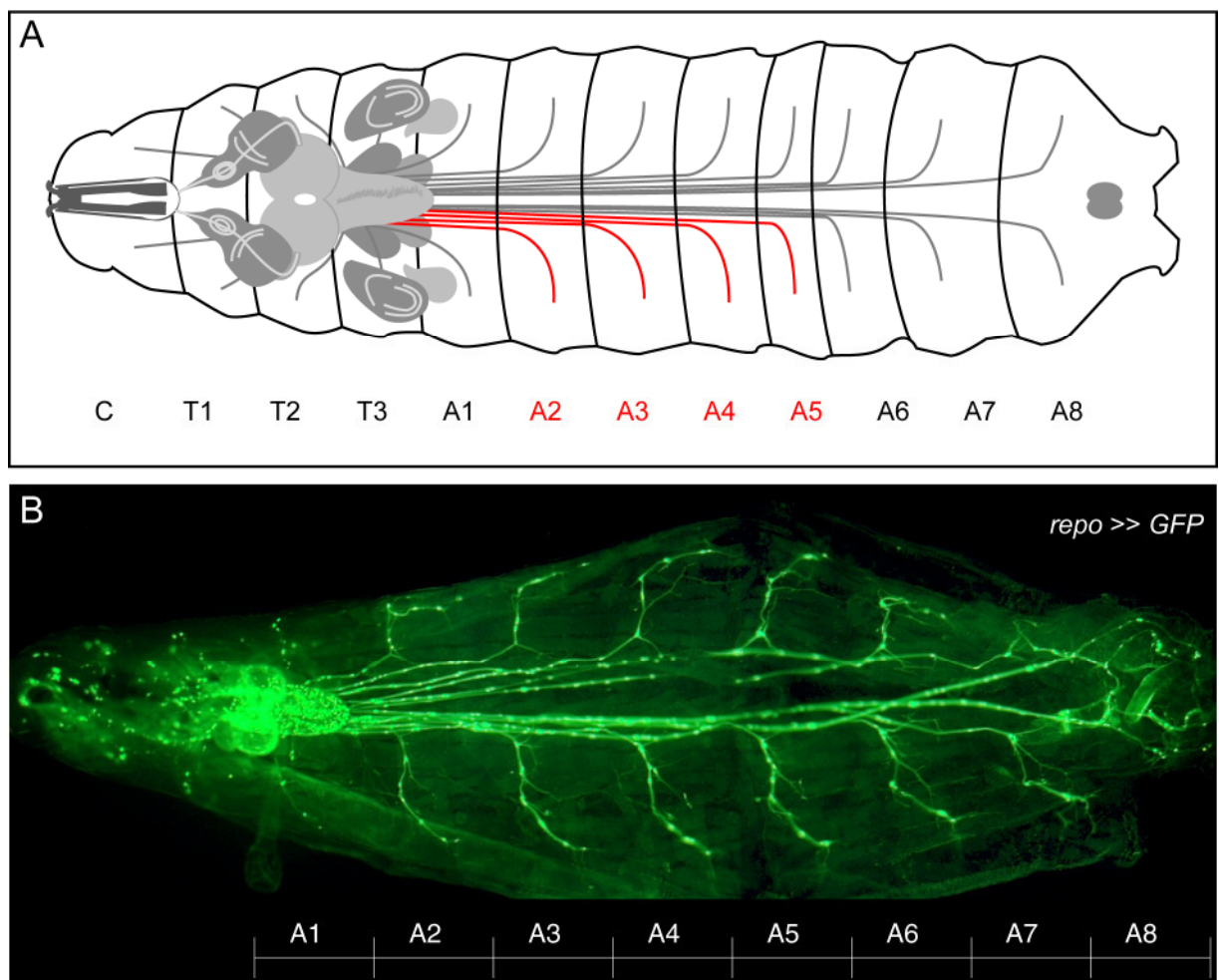


Abb. 3.13: Das Nervensystem einer Larve von *Drosophila* des dritten Larvenstadiums als schematische Darstellung und in einer mikroskopischen Aufnahme.

A Das Schema stellt eine Larve mit Gehirn, Imaginalscheiben und peripheren Nerven dar. Jedes Segment wird von zwei Nerven innerviert, welche die Muskeln mit dem Gehirn verbinden. In rot eingezeichnet sind die Nerven, für die die Anzahl der glialen Zellkerne bestimmt wurde.

B Mikroskopische Aufnahme des frei präparierten Nervensystems einer Larve des dritten Larvalstadiums. Die glialen Zellkerne wurden mit α -GFP (grün) markiert.

Die Bestimmung der Gliazellzahl in den peripheren Nerven des Wildtyps wurde sowohl anhand von endogen exprimiertem GFP als auch mittels einer immunhistochemischen α -Repo-Färbung durchgeführt. Die einzelnen Zellkerne waren allerdings anhand der Antikörper-Markierung wesentlich besser zu identifizieren (Abb. 3.14).

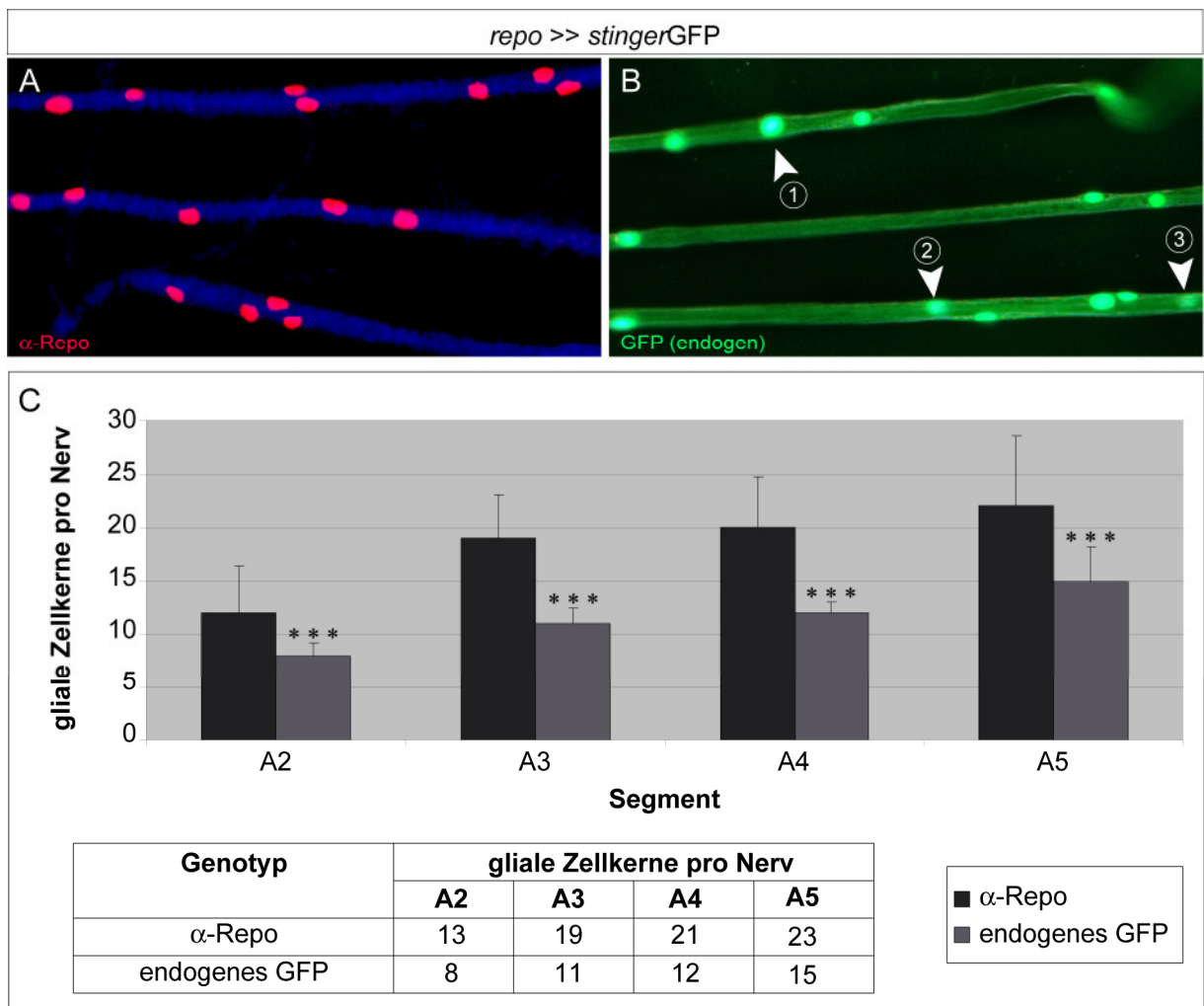


Abb. 3.14: Statistische Bestimmung der Gliazellzahl in den peripheren Nerven des Wildtyps mit verschiedenen Methoden.

A, B Konfokale Einzelbilder von peripheren Nerven aus Larven mit dem Genotyp *repo >> stingerGFP*. Anterior ist links. **A** Die Abbildung zeigt periphere Nerven, die einer immunhistochemischen Färbung mit α -Repo (rot) und α -HRP (blau) unterzogen wurden. Die einzelnen Zellkerne waren eindeutig zu identifizieren. Das HRP-Signal verdeutlichte außerdem den Verlauf des Nervis. **B** Anhand des endogenen GFP-Signals ließen sich ebenfalls die glialen Zellkerne erkennen. Allerdings waren die einzelnen Signale unterschiedlich stark (Pfeilköpfe ① und ②). Gelegentlich war eine eindeutige Identifikation eines GFP-Signals als Zellkern nicht möglich (Pfeilkopf ③). **C** Zur Ermittlung der Anzahl glialer Zellkerne in den peripheren Nerven wurden je 25 Larven untersucht und die Zellkerne in den Nerven einer Körperhälfte gezählt, die die Segmente A2 - A5 innervierten. Im Diagramm ist die durchschnittliche Anzahl der glialen Zellkerne in den Nerven der Segmente A2 - A5 dargestellt, die einerseits bei Larven des dritten Larvenstadiums aufgrund ihres endogenen GFP-Signals zu erkennen waren, und andererseits anhand einer immunhistochemischen α -Repo-Markierung. Die Tabelle stellt eine Zusammenfassung der Werte dar. Die Resultate waren höchst signifikant (***, $p \leq 0,0005$).

Anhand des endogenen GFP-Signals konnte für den Nerv, der das Segment A2 innervierte, eine Anzahl von 8 Gliazellkernen ermittelt werden (Abb. 3.14). In Nerven, die in die Segmente A3, A4 und A5 führten, wurden im Durchschnitt 11, 12 und 15 gliale Zellkerne gezählt. Die Auswertung der immunhistochemischen Färbung mit dem α -Repo Antikörper ergab für alle betrachteten Segmente eine höhere Anzahl glialer Zellkerne. In dem im Segment A2 terminierenden Nerv wurden 13 Gliazellkerne gezählt. Bei dem im Segment A3 terminierenden Nerv waren es 19, während für die Nerven, welche die Segmente A4 und A5 innervierten, 21 bzw. 23 Repo-positive Zellkerne ermittelt wurden (Abb. 3.14).

Für die weiteren Experimente wurde als Indikator für die Zahl der Gliazellen in den peripheren Nerven die immunhistochemische α -Repo Färbung verwendet, da diese Methode als zuverlässiger erachtet wurde.

Larven, die in Gliazellen *repo* >> *PTEN*^{dsRNA} exprimierten, hatten in ihren peripheren Nerven insgesamt eine ähnliche Anzahl Repo-positiver Zellkerne wie der Wildtyp (Abb. 3.15)

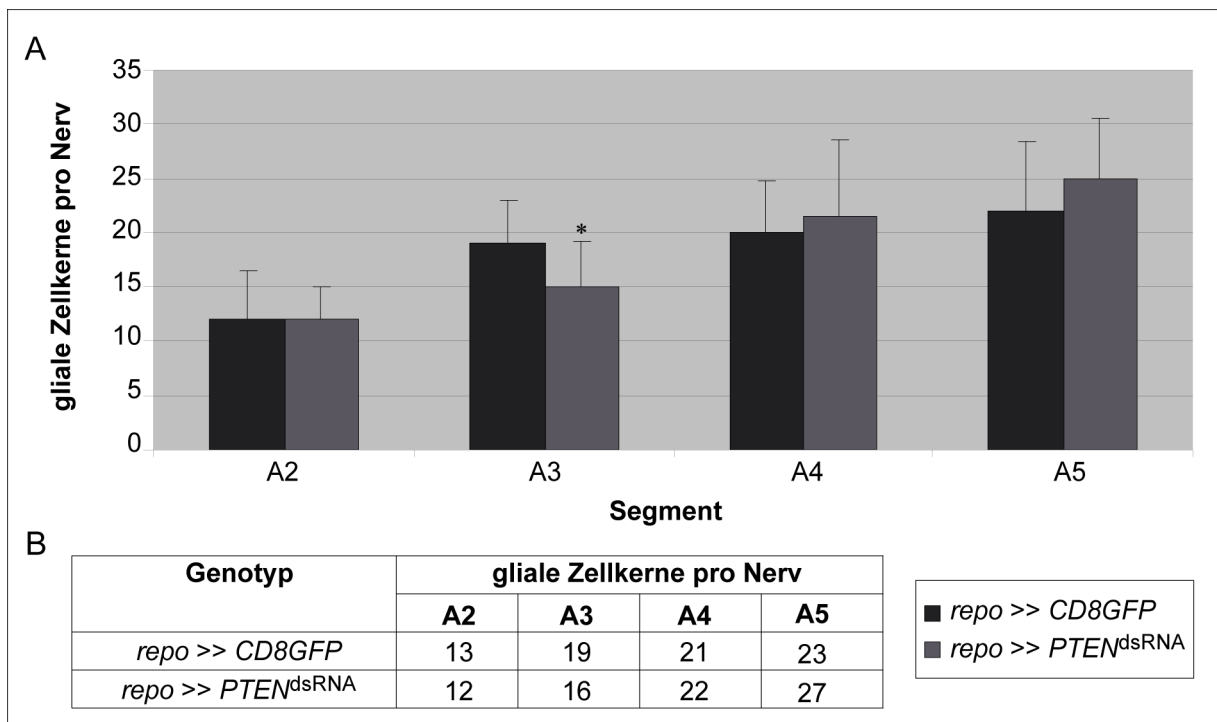


Abb. 3.15: Quantifikation der Gliazellkerne in den peripheren Nerven von Wildtyp und Larven mit einer RNA Interferenz-induzierten verringerten Expression von *PTEN*.

Zur Ermittlung der Anzahl glialer Zellkerne in den peripheren Nerven wurden je 25 Larven untersucht und die Zellkerne in den Nerven einer Körperhälfte gezählt, die die Segmente A2 - A5 innervierten. Im Diagramm **A** ist der Durchschnitt der glialen Zellkerne des Wildtyps und von Tieren mit dem Genotyp *repo* >> *PTEN*^{dsRNA} dargestellt. Die ermittelten Werte waren nicht signifikant ($p > 0,05$), mit Ausnahme der Gliazellzahl des Nerven, der das Segment A3 innervierte (**, $p \leq 0,05$). In der Tabelle **B** ist eine Zusammenfassung der ermittelten Zahlen zu finden.

Für genetisch nicht manipulierte L3-Larven wurde für die Nerven, welche die Segmente A2 - A5 innervierten, 13, 19, 21 und 23 gliale Nuklei ermittelt, während bei der Expression von *PTEN*^{dsRNA} im *repoGal4*-Muster für den Nerv, der im Segment A2 terminierte, eine Anzahl von 12 Gliazellkernen gezählt wurde. Bei A3 waren es 16, bei A4 22 und A5 27 (Abb. 3.15).

Die Zunahme der Dicke der Gliazellschicht in den peripheren Nerven infolge der RNA Interferenz-induzierten verringerten Expression von *PTEN* ist also nicht auf eine gesteigerte Gliazellzahl zurückzuführen. Eine mögliche Erklärung für diesen Phänotyp könnte somit sein, dass die einzelnen Zellen an Größe zunehmen. So ist in der Literatur beispielsweise beschrieben, dass verstärkte Aktivität von PI3K zu einer Zunahme der Dicke der Perineuralglia um die peripheren Nerven führt (Lavery *et al.*, 2007). Analog dazu könnte die Deregulation von PTEN in einem vergleichbaren Effekt resultieren.

3.1.5 Ektopische Expression von Ras

In den vorangegangenen Experimenten wurden die morphologischen Effekte der ektopischen Regulation von *EGFR*, *PI3K*^{92E}, *Akt1* und *PTEN* durch das UAS/Gal4-System analysiert, welche von zentraler Bedeutung für die Aktivierung, Signalweiterleitung und Termination der PI3K/Akt-Signalkaskade sind. Neben Rezeptortyrosinkinasen wie dem EGFR ist jedoch auch Ras ein wichtiger Aktivator dieses Signalwegs. Ras stabilisiert PI3K nahe der Plasmamembran und aktiviert dessen katalytische Untereinheit, p110 (Rodriguez-Viciano *et al.*, 1994; Orme *et al.*, 2006).

Die ektopische Aktivierung von *ras*^{64B} in Gliazellen resultierte in heterogenen Phänotypen. So wurde in drei von insgesamt elf untersuchten Scheiben ektopische Migration von Gliazellen und in sechs eine Vergrößerung des optischen Stiels im Vergleich zum Wildtyp beobachtet. In beiden Fällen waren weniger Gliazellen an ihrer normalen Position basal in der Augenimaginalscheibe (Abb. 3.16 B und C). Darüber hinaus gab es zwei Präparate, die nur marginale Fehlbildungen aufwiesen, wie etwa Lücken zwischen den Gliazellen basal in der Scheibe (Abb. 3.16 A).

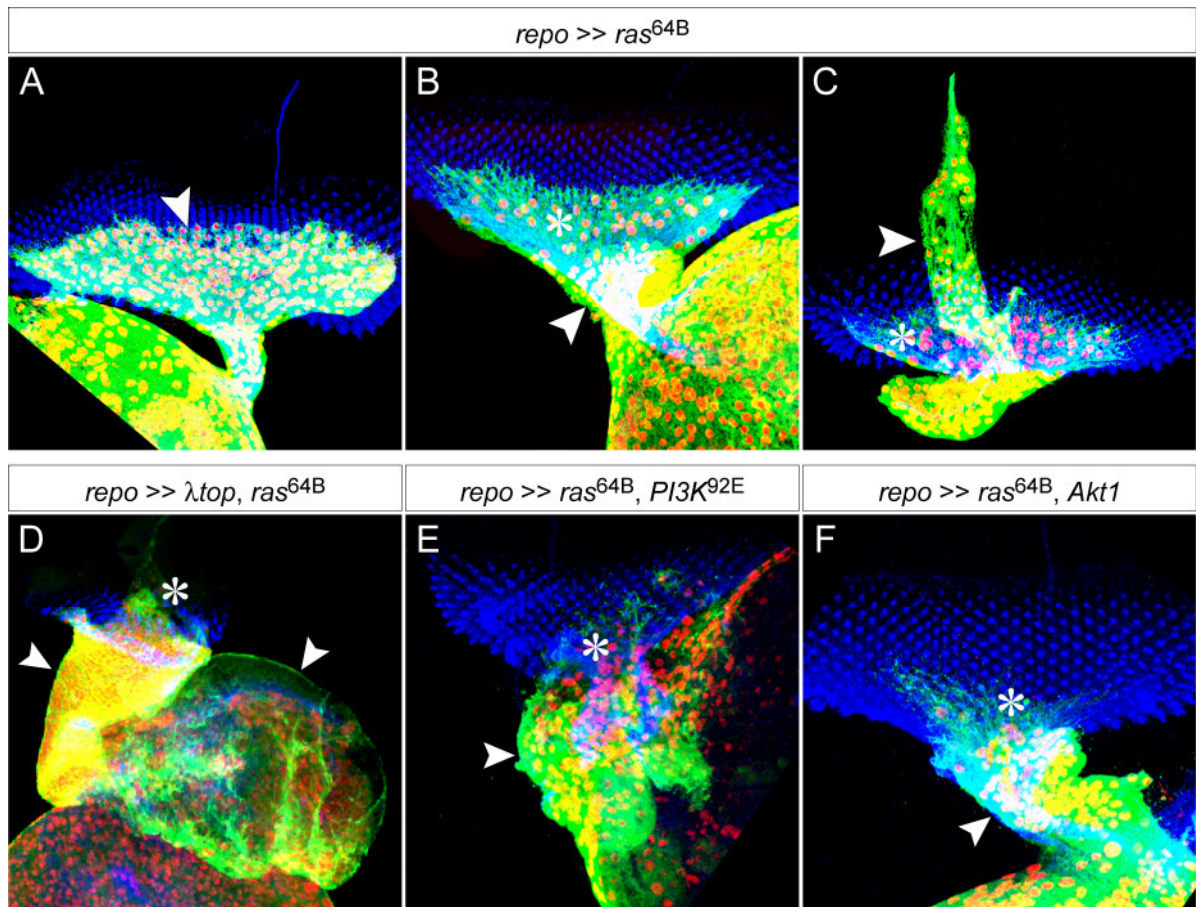


Abb. 3.16: Augenimaginalscheiben aus Larven mit ektopische Expression von ras^{64B} alleine und in Kombination mit λtop , $PI3K^{92E}$ und $Akt1$.

A - F Immunhistochemische Färbung von Augenimaginalscheiben aus L3-Larven. In den Präparaten sind die Zellkerne der Gliazellen mit α -Repo (rot), das Zytoplasma der Gliazellen mit α -GFP (grün) und die Nervenzellen mit α -HRP (blau) markiert. Bei den Abbildungen handelt es sich um Projektionen konfokaler Bildstapel auf eine Ebene. Anterior ist oben. **A - C** Die Aktivierung von ras^{64B} führte entweder zu marginalen Defekten der Gliazellen basal in der Augenscheibe, die sich in Lücken zwischen den einzelnen Zellen äußerten (**A**, Pfeilkopf), zu einer Verdickung des optischen Stiels (**B**, Pfeilkopf) oder zu ektopischer Migration von Gliazellen entlang des BN (**C**, Pfeilkopf). **D - F** Koexpression von ras^{64B} mit λtop , $PI3K^{92E}$ oder $Akt1$ stimulierte die Proliferation von Gliazellen im optischen Stiel (Pfeilköpfe). **B - F** Die Expression von ras^{64B} beeinträchtigte die Migration von Gliazellen basal in die Augenscheibe (Sterne).

Die simultane Expression von ras^{64B} mit λtop , $PI3K^{92E}$ oder $Akt1$ stimulierte die gliale Proliferation, wobei die Anordnung der Photorezeptorneurone in der Augenimaginalscheibe im Wesentlichen erhalten blieb (Abb. 3.16 D - F). Die Zunahme der glialen Proliferation war bei der Kombination $repoGal4 >> \lambda top, ras^{64B}$ am stärksten. Der optische Stiel dieser Larven erschien als ballonartig angeschwollene Struktur (Abb. 3.16 D). Larven mit dem Genotyp $repoGal4 >> ras^{64B}$, $PI3K^{92E}$ zeigten im Vergleich dazu eine deutlich geringere Proliferation glialer Zellen (Abb. 3.16 E). Bei einer Koexpression von ras^{64B} und $Akt1$ mit $repoGal4$ war die

Zunahme der Gliazellzahl noch einmal geringer als bei den beiden eben genannten Genotypen (Abb. 3.16 F).

Diesen drei Genotypen war jedoch nicht nur die gesteigerte Proliferation gemeinsam, sondern auch ein Migrationsdefekt der Gliazellen, der sich in einer Beeinträchtigung der Migration glialer Zellen in die Augenimaginalscheibe ausprägte. So waren bei simultaner Expression von λtop und ras^{64B} die Gliazellen unregelmäßig in der Scheibe verteilt (Abb. 3.16 D). Larven, die ras^{64B} und $Akt1$ bzw. ras^{64B} und $PI3K^{92E}$ im $repoGal4$ -Muster überexprimierten, hatten in der Augenscheibe fast keine Gliazellen (Abb. 3.16 E und F). In keiner der untersuchten Scheiben wurde eine ektoische Migration von Gliazellen entlang des BN beobachtet. Für jeden Genotyp wurden zwischen zehn und fünfzehn Scheiben analysiert.

3.1.6 Medikamenten-induzierte Inhibition ektoisch aktivierter Gene

Da im Rahmen dieser Arbeit gezeigt werden konnte, dass die ektoische Regulation des PI3K/Akt-Signalwegs bei *Drosophila* zu Hyperplasie und ektoischer Migration führt, sollte im Folgenden untersucht werden, ob sich der Einfluss der ektoisch exprimierten Gene durch die Applikation von für den Menschen entwickelten Medikamenten supprimieren lässt.

Für diesen Versuch wurden UAS λtop und UAS $PI3K^{92E}$ mit dem Gal4-Treiber $repo$ exprimiert (Abb. 3.17 C - E). Diese Kombination wurde gewählt, da 25 % aller Augenscheiben aus Larven mit diesem Genotyp ektoische Migration von Gliazellen entlang des BN zeigten (Abb. 3.4). Darüber hinaus waren die morphologischen Veränderungen bei diesem Genotyp oft wesentlich ausgeprägter als etwa bei der Gal4-vermittelten Expression von UAS λtop und UAS $Akt1$ in Gliazellen.

Während das Gehirn im Wildtyp insgesamt eine relativ symmetrische Form aufwies, waren die optischen Loben bei Expression von λtop und $PI3K^{92E}$ in Gliazellen deformiert und unregelmäßig (Abb. 3.17 A und C). Im Wildtyp wanderten die Gliazellen basal in die Augenimaginalscheibe ein und blieben ein Stück hinter der von den Photorezeptorneuronen vorgegebenen Grenze zurück, während bei Larven mit dem Genotyp $repo \gg \lambda top, PI3K^{92E}$ ektoische Migration von Gliazellen entlang des BN auftrat und der optische Stiel dicker war als im Wildtyp (Abb. 3.17 B, D und E).

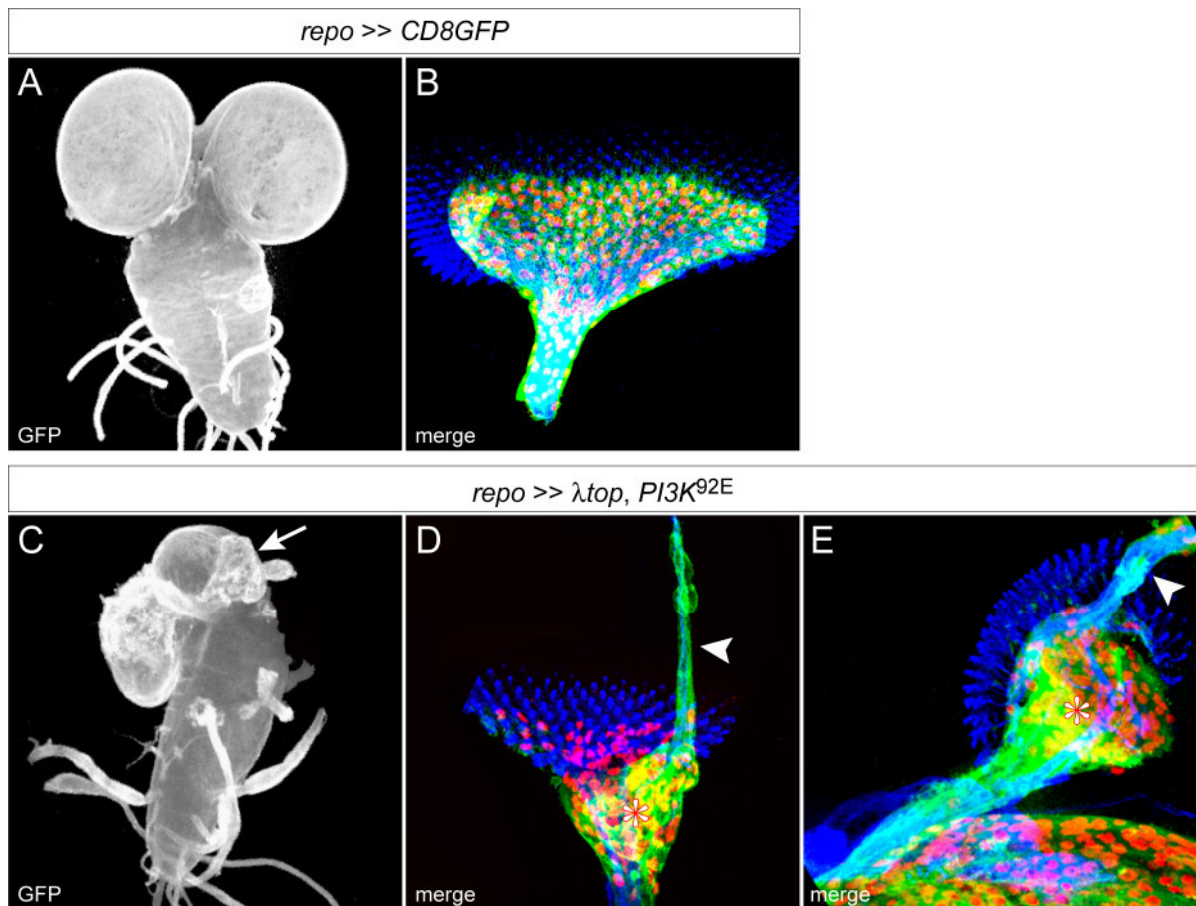


Abb. 3.17: Simultane Expression von λtop und $PI3K^{92E}$ in Gliazellen resultiert in morphologischen Defekten des Nervensystems.

A - E Immunhistochemische Färbung von Gehirnen und Augenimaginalscheiben aus Larven des dritten Larvalstadiums. Die Präparate sind mit α -Repo (rot), α -GFP (grün bzw. weiss) und α -HRP (blau) markiert. Die Abbildungen sind Projektionen konfokaler Bildstapel. Anterior ist oben. **A, B** Wildtyp. **C - E** Die Expression von λtop und $PI3K^{92E}$ in Gliazellen führte zu deformierten optischen Loben mit beulenartigen Ausbuchtungen (**C**, Pfeil) und Fehlbildungen der Augenimaginalscheiben, die sowohl ektopische Migration (**D** und **E**, Pfeile) als auch vermehrte Proliferation (**D** und **E**, Sterne) von Gliazellen aufwiesen.

Zunächst wurde der Effekt von Gefitinib auf das ZNS von Larven mit dem Genotyp $repo >> \lambda top, PI3K^{92E}$ getestet. Für jede Konzentration des Inhibitors wurden zwischen acht und zehn Augenscheiben und Gehirne untersucht. Gleiches gilt auch für die Analyse der Effekte von Wortmannin und Triciribine, die im Anschluss beschrieben werden. Bei einer Gefitinib-Konzentration von $0,5 \mu M$ im Futter war der optische Stiel verdickt, und viele Gliazellen migrierten entlang des BN. Das Gehirn war stark asymmetrisch, mit knotenartigen Ausbeulungen der Loben (Abb. 3.18 A - C). Diese Fehlbildungen konnten mit steigender Konzentration des EGFR-Inhibitors verringert werden. Applikation von $5 \mu M$ Gefitinib führte zur Reduktion der glialen Proliferation. Die optischen Loben waren jedoch noch immer deformiert (Abb. 3.18 D - F). Bei einer Konzentration von $50 \mu M$ Gefitinib zeigten die Scheiben

eine weitere Normalisierung hin zum Wildtyp, und auch das Gehirn war weniger stark fehlgebildet (Abb. 3.18 G-I). Bei 250 μM Gefitinib im Futter schien die Proliferation der Gliazellen auf ein normales Maß reduziert. Allerdings erfolgte nach wie vor ektopische Migration von Gliazellen entlang des BN, wenn auch deutlich weniger als ohne Inhibitor. Das Gehirn erschien wildtypisch (Abb. 3.18 J - L). Da Gefitinib jedoch nur EGFR und nicht PI3K inhibiert, wurde keine vollständige Rettung des Phänotyps erreicht.

Die Imaginalscheiben aus Larven, denen Wortmannin gefüttert wurde, zeigten schon bei niedrigen Konzentrationen des Inhibitors eine Rettung zum Wildtyp.

So waren 0,5 μM Wortmannin im Futter ausreichend, um die durch Aktivierung von λtop und $PI3K^{\theta 2E}$ induzierte gesteigerte Proliferation und ektopische Migration in Augenimaginalscheiben zu inhibieren und die Symmetrie des Gehirns wieder herzustellen. Auch bei höheren Konzentrationen des Inhibitors trat der gleiche Effekt auf. Die betrachteten Gehirne waren bei allen Wortmannin-Konzentrationen denen des Wildtyps identisch. (Abb. 3.19 A - H).

Der Akt-Inhibitor Triciribine konnte die durch die Expression von λtop und $PI3K^{\theta 2E}$ mit dem Treiber repoGal4 hervorgerufenen Defekte in geringen Konzentrationen (0,5 μM bzw. 5 μM Triciribine) nur unvollständig inhibieren. So war zwar die Morphologie der Gehirnhemisphären und des Ventralganglions wildtypisch, und die Proliferation der Gliazellen in der Augenimaginalscheiben war stark reduziert. Es wurde allerdings auch ektopische Migration von Gliazellen entlang des BN beobachtet. Dieser Migrationsphänotyp konnte aber durch hohe Konzentrationen des Inhibitors (50 μM oder 250 μM Triciribine) gehemmt werden (Abb. 3.20). Obwohl Triciribine weder EGFR noch PI3K inhibiert, sondern deren Effektor Akt, konnte hier also eine Verbesserung der morphologischen Defekte erreicht werden.

Die Applikation von für den Menschen entwickelten Medikamenten konnte also in *Drosophila* morphologische Defekte verringern. Dabei hatten nicht nur Gefitinib und Wortmannin eine positive Wirkung, die direkt gegen die deregulierten Genprodukte gerichtet waren, sondern auch Triciribine, welches die *downstream* von EGFR und PI3K agierende Akt-Kinase hemmt.

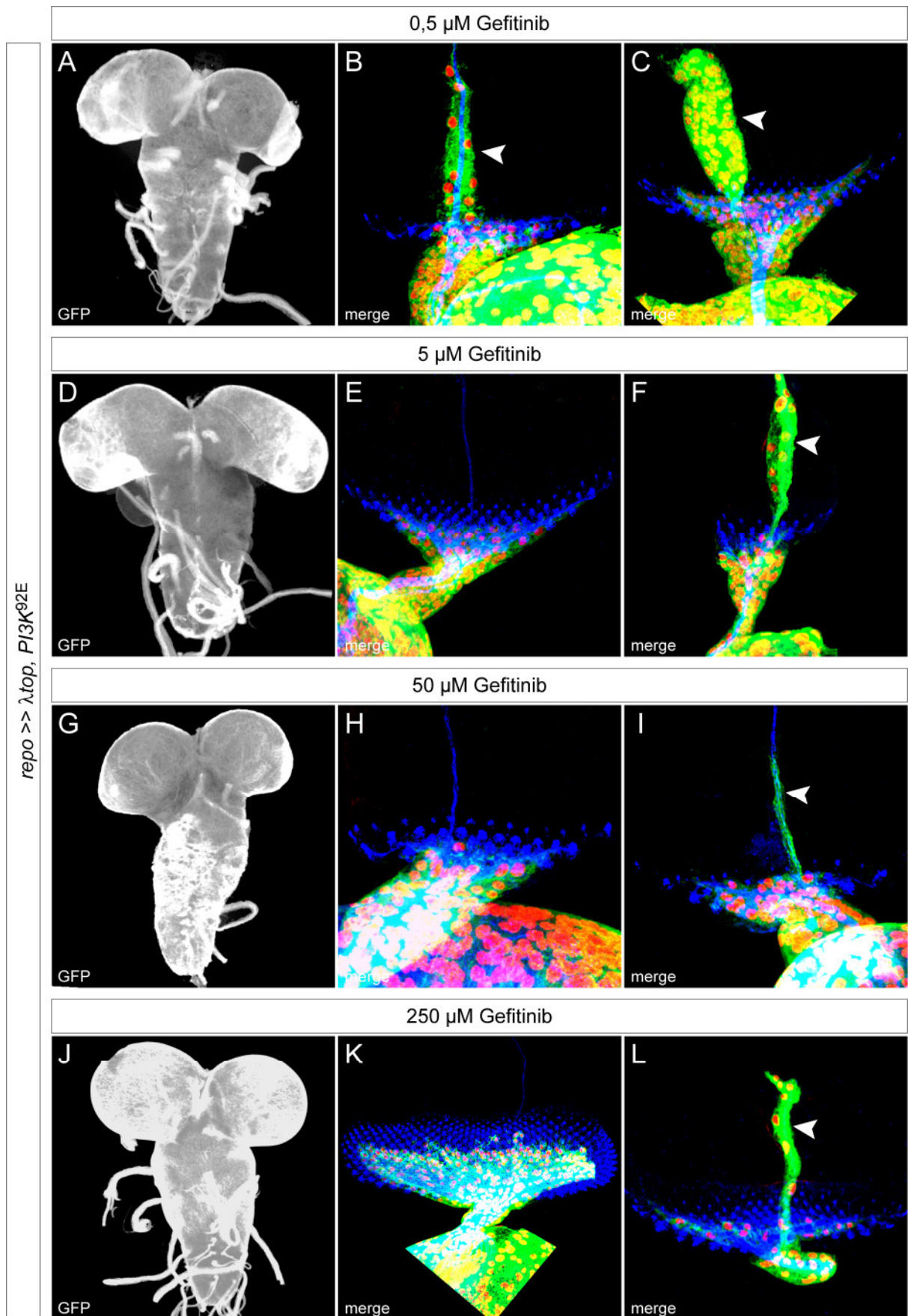


Abb. 3.18: Der EGFR-Inhibitor Gefitinib reduziert die durch die ektopische Expression von λtop und $PI3K^{92E}$ in Gliazellen induzierte Proliferation, aber nicht die Migration.

Die Beschreibung der Abbildung ist dem Text zu entnehmen.

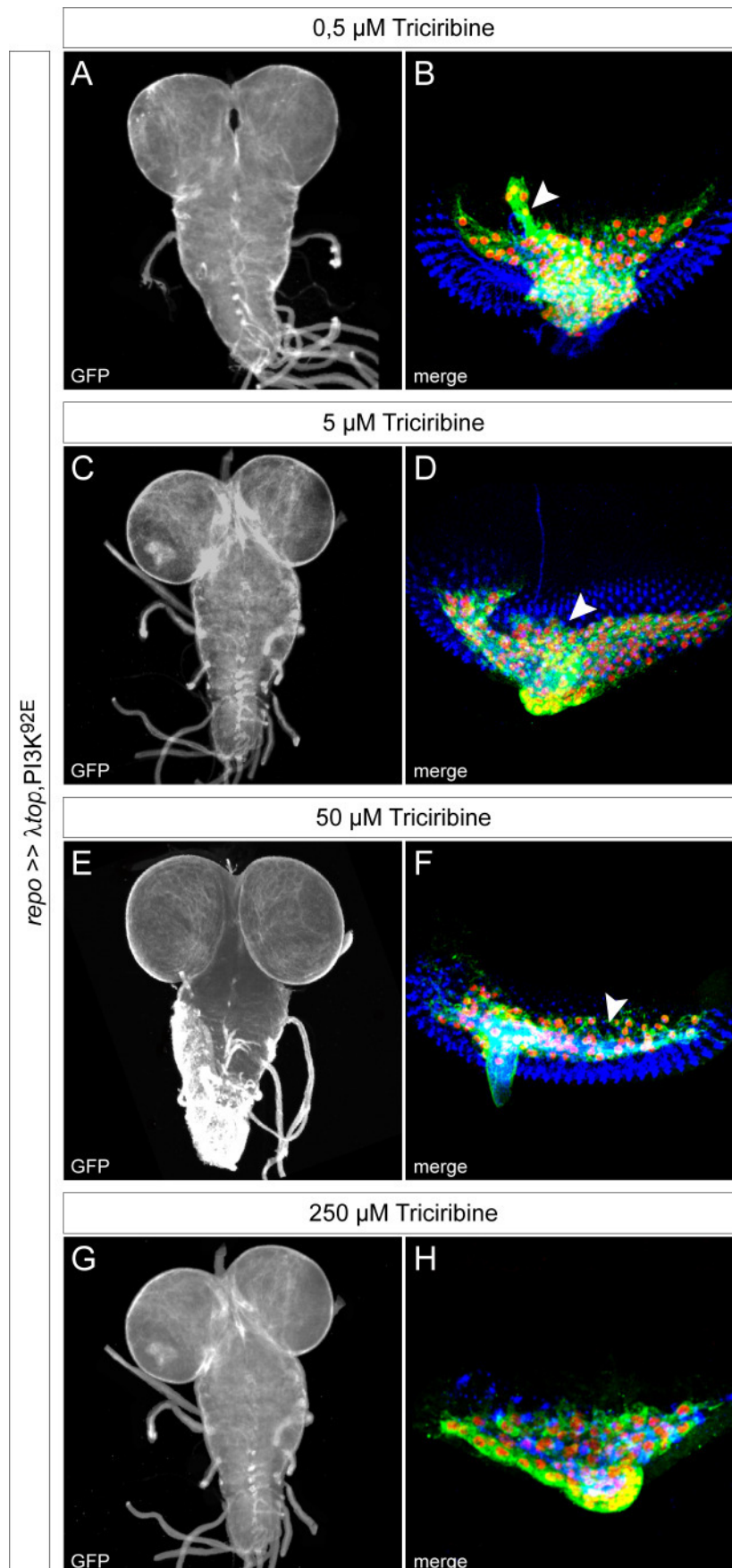


Abb. 3.19: Der EGFR-Inhibitor Wortmannin unterdrückt den Effekt von simultan in Gliazellen exprimiertem λ top und PI3K^{92E}.

Die Beschreibung dieser Abbildungen ist im Text zu finden.

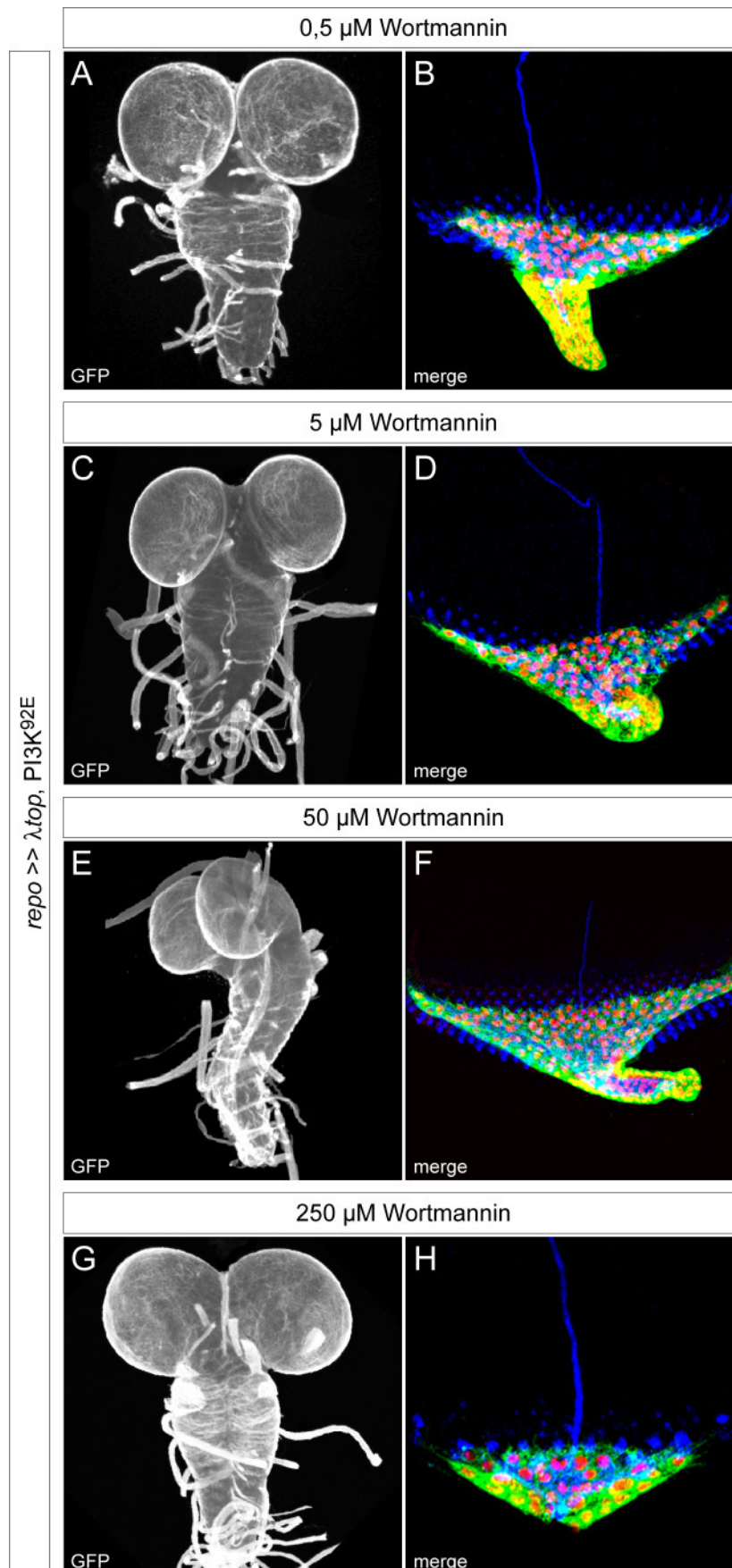


Abb. 3.20: Die Verabreichung des Akt-Inhibitors Triciribine reduziert den Effekt von simultan in Gliazellen exprimiertem λtop und PI3K^{92E} .

Eine Beschreibung der dargestellten Abbildungen ist dem Text zu entnehmen.

3.2 Einfluss verschiedener Rezeptortyrosinkinasen auf Gliazellen

Sämtlichen Rezeptortyrosinkinasen stehen potentiell dieselben Signalkaskaden zur Signalweiterleitung zur Verfügung. Trotzdem sind RTKs nicht beliebig austauschbar. Durch zeit- und gewebespezifische Regulation werden bestimmte Effektoren bevorzugt aktiviert und lösen damit genau definierte zelluläre Reaktionen aus (Marshall, 1995; Murphy *et al.*, 2002).

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Aktivierung des EGFR die Migration von Gliazellen stimuliert. Im Folgenden wurde nun der Fragestellung nachgegangen, ob die ektopische Regulation anderer RTKs zu einer noch stärker ausgeprägten ektopischen Migration führt. Dazu wurden als Kandidaten PVR (PDGFR - and VEGFR Receptor Homologue) und Htl (Heartless) ausgewählt, da deren humane Homologe häufig in Tumorzellen gesteigerte Aktivität zeigen (Morrison *et al.*, 1994; Valentinis und Baserga, 2001; Lokker *et al.*, 2002).

Augenimaginalscheiben aus Larven, die *λtop* im *repo*-Muster exprimierten, zeigten ektopische Migration von Gliazellen entlang des BN (Abb. 3.21 A). Die ektopische Expression von *λpvr* in Gliazellen wurde mit dem *repoGal4*-Treiber mit Insertion auf dem zweiten Chromosom durchgeführt, da bei der Verwendung des *repoGal4*-Stamms mit Insertion auf dem dritten Chromosom die Larven vor Erreichen des dritten Larvenstadiums starben. Larven mit dem Genotyp *repo >> λpvr* zeigten einen Phänotyp vergleichbar mit *repo >> λtop*. Auch hier migrierte eine große Zahl Gliazellen entlang des BN. Insgesamt wurden 16 Präparate betrachtet, von denen 14 einen Migrationsphänotyp aufwiesen. Die Expression von *λpvr* mit dem Gal4-Treiber *repo* schien sich darüber hinaus negativ auf die Gliazellzahl in den Augenimaginalscheiben auszuwirken (Abb. 3.21 B). Eine quantitative Bestimmung wurde jedoch nicht durchgeführt, da nur sehr wenige Larven mit dem Genotyp *repo >> λpvr* das dritte Larvenstadium erreichten. Die Aktivierung von *λhtl* mit *repoGal4* resultierte in den insgesamt neun untersuchten Augenimaginalscheiben in einer drastischen Zunahme der Proliferation von Gliazellen im optischen Stiel (Abb. 3.21 C).

Von den hier ektopisch aktivierten RTKs hatten also der EGFR und der PVR einen stimulierenden Einfluss auf die Migration von Gliazellen der Augenimaginalscheibe, während Htl die Proliferation förderte.

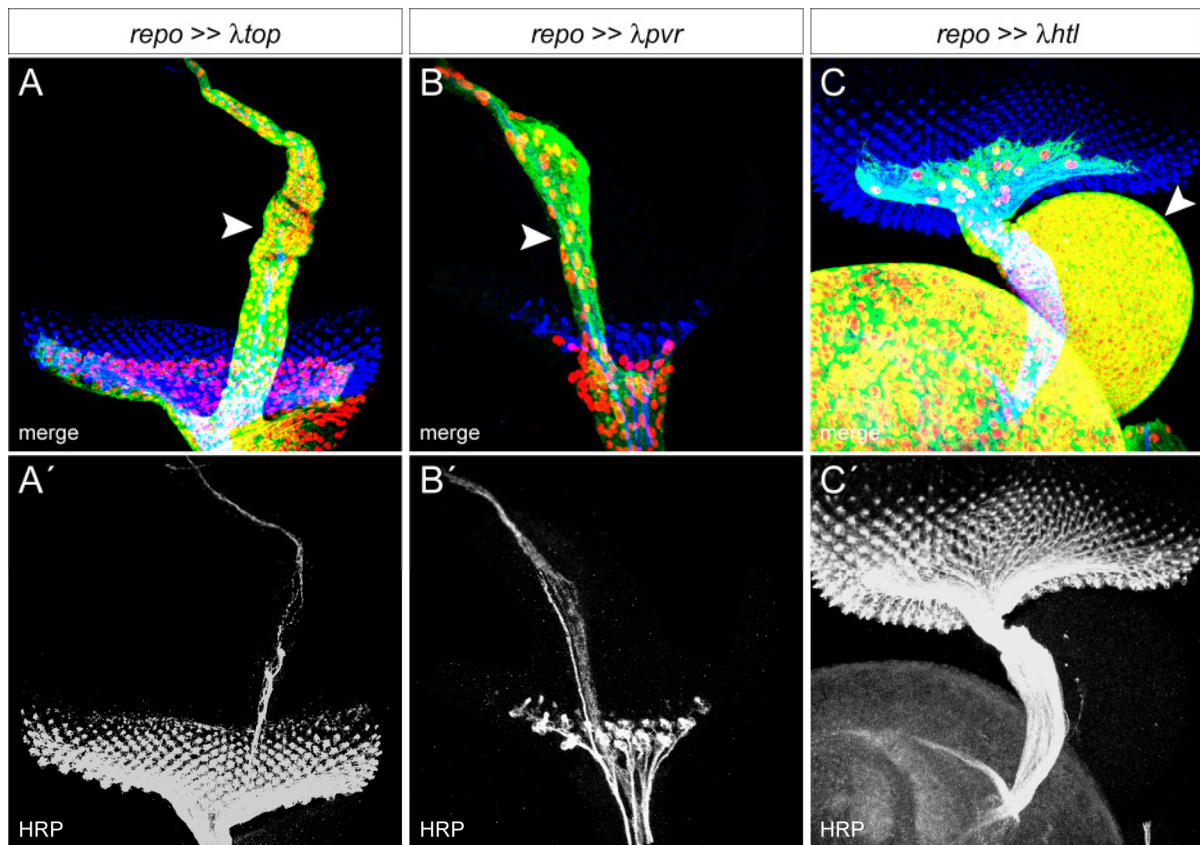


Abb. 3.21: Ektopische Aktivierung verschiedener Rezeptortyrosinkinasen in Gliazellen mit dem UAS/Gal4-System.

A - C Neurone und Gliazellen von Augenimaginalscheiben aus Larven des dritten Larvalstadiums wurden mittels einer immunhistochemischen Färbung visualisiert. Die Zellkerne der Gliazellen sind rot dargestellt (α -Repo), das Zytoplasma der Gliazellen grün bzw. weiss (α -GFP) und die Nervenzellen blau (α -HRP). Die Abbildungen sind Projektionen konfokaler Bildstapel. Anterior ist oben. **A** Ektopische Expression von λ_{top} mit $repoGal4$ resultierte in ektopischer Migration von Gliazellen entlang einer neuronalen Struktur. **B** Aktivierung von λ_{pvr} zeigte einen Phänotyp vergleichbar mit λ_{top} . Auch hier erfolgte ektopische Migration von Gliazellen. **C** Die Expression von aktiviertem *heartless* mit $repoGal4$ führte zu einer Zunahme der glialen Proliferation im optischen Stiel.

3.2.1 Ektopische Expression von EGFR und PVR in Gliazellen

3.2.1.1 Die Aktivierung von EGFR und PVR in Gliazellen reduziert die Vitalität

Die Expression der zu untersuchenden Transgene λ_{top} , pvr und λ_{pvr} mit dem Treiber $daGal4$ führte in allen Fällen zur Letalität bereits vor Erreichen des adulten Stadiums. Die Aktivierung von λ_{top} mit $repoGal4$ zeigte eine Reduktion der Vitalität, während sowohl die gesteigerte Aktivität des wildtypischen pvr als auch von konstitutiv aktivem λ_{pvr} in Gliazellen letal war (Tab. 3.2).

Tab. 3.2: Einfluss der ektopischen Expression von λtop , pvr und λpvr auf die Vitalität.

Als *repoGal4*-Treiber wurde eine Kombination aus zwei *repoGal4*-Transgenen verwendet, um einen stärkeren Effekt zu erzielen. Die Insertionsorte dieser Transgene lagen auf dem zweiten und dritten Chromosom. (v) = weniger als 10 % der geschlüpften Fliegen hatten die Allelkombination aus UAS- und Gal4-Transgenen; † = letal.

UAS-Effektor	Gal4-Treiber	
	<i>repoGal4</i>	<i>daGal4</i>
UAS λtop	(v)	†
UAS <i>pvr</i>	†	†
UAS λpvr	†	†

Der Zeitpunkt in der Entwicklung, an dem die gliale Expression von λpvr zur Letalität führte, variierte in Abhängigkeit von der Temperatur und dem *repoGal4*-Treiber. Bei Verwendung des *repoGal4*-Transgens auf dem zweiten Chromosom starben die Larven bei 18 °C im dritten Larvalstadium, und bei 25 °C im zweiten Larvenstadium, während Tiere, die λpvr mit dem *repoGal4*-Treiber mit Insertion auf dem dritten Chromosom exprimierten, bei 18 °C als L1-Larven starben, und bei 25 °C bereits als Embryonen (Tab. 3.3).

Tab. 3.3: Die durch Expression von λpvr in Gliazellen induzierte Letalität variiert in Abhängigkeit von der Außentemperatur und dem Gal4-Treiber.

E = embryonal letal, L1 / L2 / L3 = letal im ersten / zweiten / dritten Larvenstadium. *repoGal4* (II) = *repoGal4*-Transgen mit Insertion auf dem zweiten Chromosom, *repoGal4* (III) = *repoGal4*-Transgen mit Insertion auf dem dritten Chromosom.

Gal4-Treiber	bei 18 °C	bei 25 °C
<i>repoGal4</i> (II) >> λpvr	L3	L2
<i>repoGal4</i> (III) >> λpvr	L1	E

Generell ist zu sagen, dass die Larven in den angegebenen Entwicklungsstadien starke Bewegungsdefekte aufwiesen. Während beispielsweise Wildtyp-Larven des dritten Larvenstadiums den Futterbrei verlassen und an den Wänden des Röhrchens hochkriechen, lagen Larven mit dem Genotyp *repoGal4* (III) >> λpvr meist unbeweglich auf der Oberfläche des Futterbreis.

3.2.1.2 Analyse der morphologische Defekte bei Fehlregulation von EGFR und PVR

Im Folgenden wurden die phänotypischen Veränderungen des ZNS von Larven verglichen, die λtop bzw. λpvr exprimierten. Dabei wurden zunächst die Augenimaginalscheiben betrachtet (Abb. 3.22).

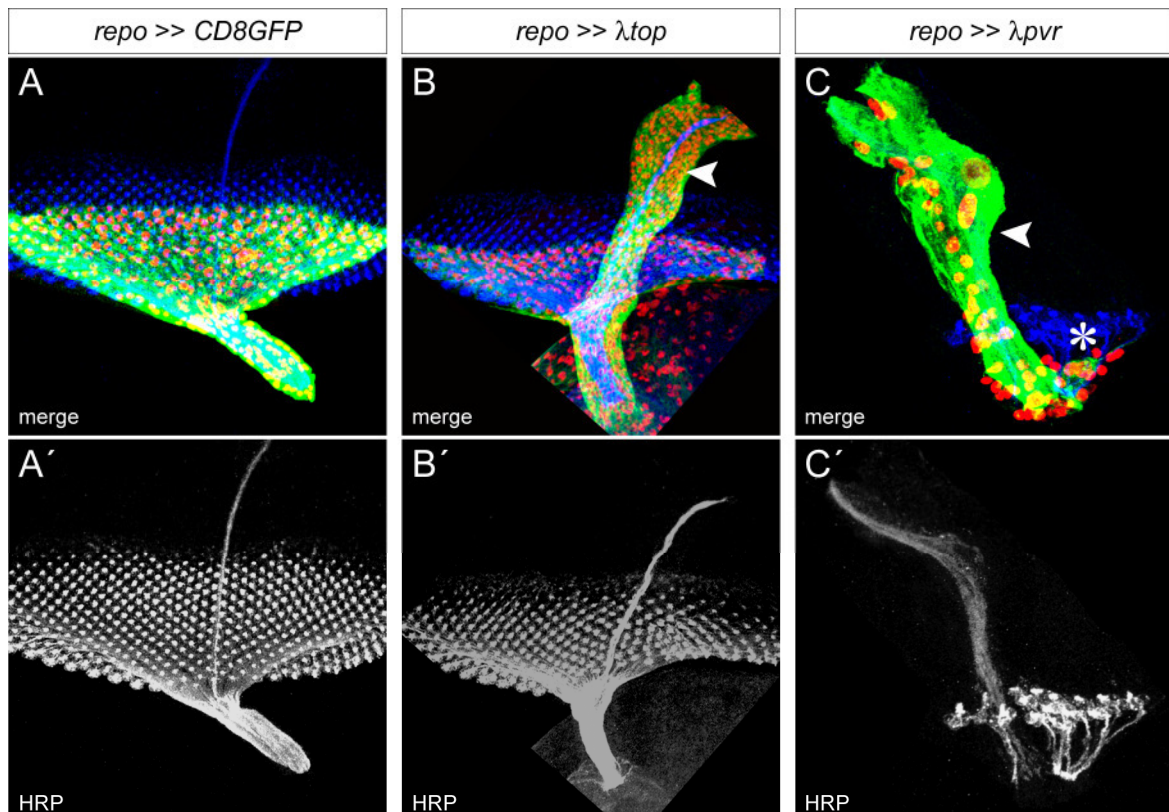


Abb. 3.22: Einfluss von ektopisch in Gliazellen exprimiertem λtop und λpvr auf die Augenimaginalscheiben von L3-Larven.

A - C Immunhistochemische Färbung von Augenimaginalscheiben aus L3-Larven. Die Zellkerne der Gliazellen sind rot dargestellt (α -Repo), das Zytoplasma der Gliazellen grün (α -GFP) und die Nervenzellen blau bzw. weiss (α -HRP). Die Abbildungen sind Projektionen konfokaler Bildstapel. Anterior ist oben. **A** Wildtyp. **B, C** In den Augenimaginalscheiben von Larven, die λtop und λpvr exprimierten, lagen Gliazellkerne apikal in der Scheibe entlang des BN (Pfeilköpfe). Bei Expression von λpvr befanden sich basal in der Augenscheibe weniger Gliazellen als im Wildtyp (**C**, Stern).

In der Augenimaginalscheibe von Larven mit dem Genotyp $repo >> \lambda top$ lagen viele gliale Zellen entlang des BN, während sich ein weiterer Teil der Gliazellen basal in der Scheibe befand (Abb. 3.22 B). Die Augenimaginalscheiben von Larven, die λpvr in Gliazellen exprimierten, zeigten einen noch stärker ausgeprägten Migrationsphänotyp als bei $repo >> \lambda top$. Die Gliazellen wanderten nahezu ausschließlich entlang des BN, und nicht basal in die Scheibe (Abb. 3.22 C).

Die Expression von λtop und λpvr beeinträchtigt jedoch nicht nur die Lokalisation der Gliazellen in der Augenimaginalscheibe, sondern auch die Morphologie der Gehirnhemisphären und der peripheren Nerven (Abb. 3. 23).

Das Gehirn von Larven, die λtop in Gliazellen exprimierten, erschien weitgehend dem Wildtyp zu entsprechen (Abb. 3.23 B). Die Expression von λpvr mit dem Gal4-Treiber *repo* führte hingegen zu extremen Defekten der Gehirnhemisphären, die kleiner und miteinander fusioniert schienen (Abb. 3.23 C).

Die peripheren Nerven des Wildtyps hatten vom Gehirn bis hin zu den Stellen, an denen sie sich verzweigen, um die einzelnen Muskeln zu innervieren, einen nahezu konstanten Durchmesser. Auch die Zellkerne der Gliazellen waren relativ gleichmäßig verteilt (Abb. 3.23 D und G). Infolge der gliaspezifischen Expression von λtop und λpvr hatten die peripheren Nerven einen variablen Durchmesser mit knotenartige Verdickungen. Bei λtop traten diese Ausbeulungen nur an ein bis zwei Stellen im Nervensystem jeder Larve auf, und die Nerven waren meist nur wenig dicker als im Wildtyp. Insgesamt schienen jedoch mehr Gliazellkerne vorhanden zu sein (Abb. 3.23 E und H). Bei der Expression von λpvr war eine deutlich stärkere Abweichung von der Morphologie des Wildtyps zu beobachten. Die Nerven waren vor allem nahe des Ventralganglions um ein mehrfaches dicker als im Wildtyp, und jeder Nerv hatte mehrere knotenartige Ausbeulungen, die jedoch nicht mit einer erhöhten Anzahl Repo-positiver Zellkerne korrelierten (Abb. 3.23 F und I).

Da die Expression von λtop und λpvr die Gliazellzahl in den peripheren Nerven zu verändern schien, wurde deren genaue Anzahl bestimmt. Im Nervensystem von wildtypischen Larven des dritten Larvenstadiums waren in den Segmenten A2 - A5 pro Nerv 13, 19, 21 bzw. 23 Repo-positive Zellkerne zu finden (Abb. 3.24). Larven mit dem Phänotyp *repo >> λtop* dagegen hatten in allen untersuchten Nerven deutlich mehr gliale Zellkerne. So waren in Nerven, die im Segment A2 terminierten, 20 Repo-positive Zellkerne vorhanden. Die Nerven, die die Segmente A3, A4 und A5 innervierten, hatten durchschnittlich 35, 39 bzw. 44 gliale Zellkerne (Abb. 3.24).

Die Expression von UAS λpvr im *repoGal4*-Muster resultierte dagegen in einer Reduktion der glialen Zellkerne in den peripheren Nerven. Der Nerv, der das Segment A2 innervierte, hatte 10 Repo-positive Zellkerne. In dem Nerv, der in das Segment A3 führte, wurden 13 Gliazellen gezählt, während es für die Segmenten A4 und A5 13 bzw. 15 gliale Zellkerne waren (Abb. 3.24).

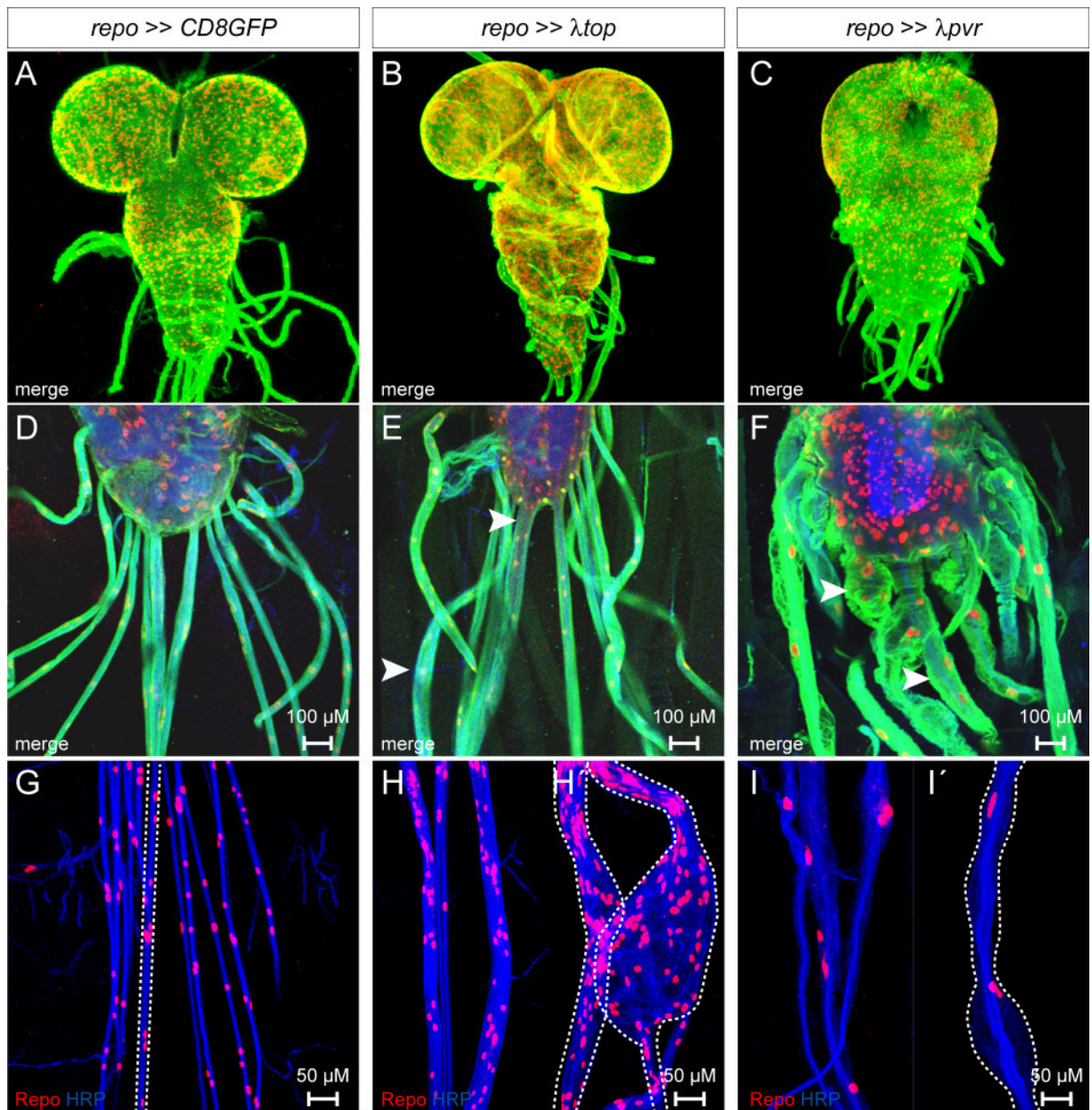


Abb. 3.23: Die Expression von λtop und λpvr in Gliazellen führt zu Defekten des Gehirns und der peripheren Nerven.

A - I Konfokale Analyse der Morphologie von Augenimaginalscheiben aus Larven des dritten Larvalstadiums. Die Zellkerne der Gliazellen sind mit α -Repo (rot), das Zytoplasma der Gliazellen mit α -GFP (grün) und die Nervenzellen mit α -HRP (blau) markiert. Die Abbildungen sind Projektionen konfokaler Bildstapel. Anterior ist oben. Dargestellt sind larvale Gehirne in der Übersicht (**A - C**), der posteriore Teil des Ventralganglions mit den davon ausgehenden Nerven (**D - F**) und periphere Nerven im Bereich des zweiten bzw. dritten Abdominalsegments (**G - I**). **Linke Spalte** Wildtyp. **Mittlere Spalte** Der Durchmesser der peripheren Nerven war bei Larven mit dem Genotyp *repo >> λtop* größer als im Wildtyp (**E**, Pfeilköpfe). Auch die Anzahl der Gliazellkerne schien größer zu sein (**H**). Gelegentlich waren ballonartig aufgeblähte Abschnitte zu beobachten (**H'**). **Rechte Spalte** Infolge der ektopischen Expression von λpvr mit dem Gal4-Treiber *repo* zeigten die Nerven einen sehr großen Durchmesser (**F**, Pfeilköpfe) und relativ wenige Zellkerne (**I**). Die gestrichelten Linien in **G - I** deuten die Umrisse einzelner Nerven an.

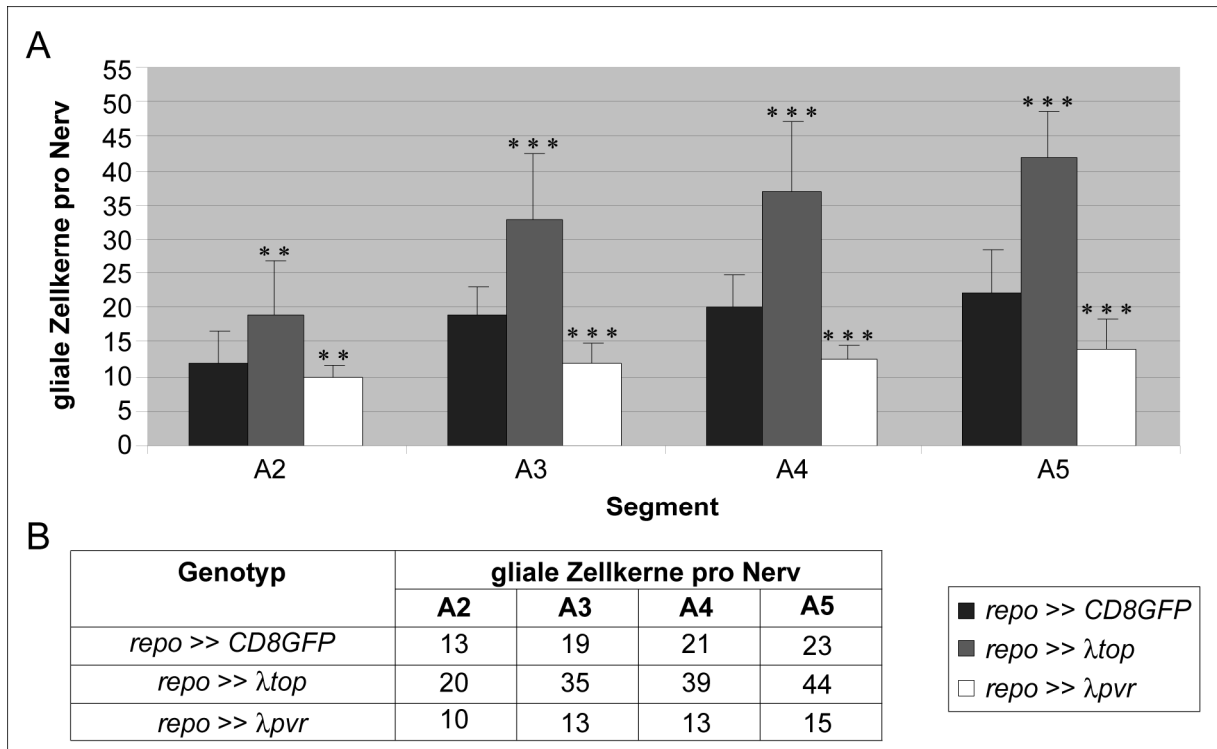


Abb. 3.24: Anzahl Repo-positiver Zellkerne in den peripheren Nerven des Wildtyps und bei Expression von λ_{top} und λ_{pvr} .

Zur Ermittlung der Anzahl glialer Zellkerne in den peripheren Nerven wurden je 25 Larven untersucht und die Zellkerne in den Nerven einer Körperhälfte gezählt, die die Segmente A2 - A5 innervierten. Im Diagramm **A** ist der Mittelwert der glialen Zellkerne des Wildtyps und von Tieren mit dem Genotyp *repo >> λ_{top}* und *repo >> λ_{pvr}* dargestellt. Die ermittelten Werte sind in Bezug auf die für den Wildtyp ermittelten Zahlen höchst signifikant ($p \geq 0,0005$), mit Ausnahme der Gliazellzahlen, die für die Nerven ermittelt wurden, die das Segment A2 innervierten ($p \geq 0,005$). Die Tabelle **B** gibt einen Überblick über die Werte.

Die ektopische Aktivierung von λ_{top} und von λ_{pvr} stimulierte die Migration von Gliazellen entlang des BN und führte zu einem größeren Durchmesser der peripheren Nerven. Die Expression von λ_{pvr} in Gliazellen resultierte jedoch in einer weitaus größeren Verdickung der peripheren Nerven, als das bei λ_{top} der Fall war. Darüber hinaus ging die Expression von λ_{top} mit einer Zunahme der Gliazellzahl in den peripheren Nerven einher, während bei λ_{pvr} weniger Gliazellen als im Wildtyp vorhanden waren.

3.2.1.3 Einzelzellanalyse

Um besser beurteilen zu können, welche Auswirkungen die ektopische Genexpression auf die einzelnen Zellen hat, wurde die Expression der Transgene

λ_{top} und λ_{pvr} nur in wenigen Gliazellen aktiviert. Dazu wurde das UAS/Gal4-System in Kombination mit dem FRT/FLP-System verwendet.

Die Expressionsstärke des FLP-Transgens ist in Abhängigkeit vom Insertionsort im Genom variabel. Für die folgenden Experimente wurde eine Kombination aus zwei FLP-Transgenen verwendet, die unter Kontrolle des *repo*-Promotors exprimiert wurden (*repoFLP5* in Kombination mit *vasarepoFLP12*). Augenimaginalscheiben von Larven, die diese Transgene exprimierten, zeigten immer mehrere GFP-positive Zellen, jedoch nicht so viele, dass deren Anzahl nicht mehr zu bestimmen wäre.

Um zu ermitteln, welchen Einfluss die Expression von λ_{top} oder λ_{pvr} in einzelnen Zellen vor einem wildtypischen Hintergrund auf die Zellzahl hat, wurde zunächst die durchschnittliche Anzahl der GFP-positiven Zellen pro Augenimaginalscheibe des Wildtyps bestimmt (*repoFLP, tub>CD2>Gal4, UAS EGFP*) und mit der Anzahl der der GFP-positiven Zellen von Larven verglichen, die zusätzlich noch UAS λ_{top} oder UAS λ_{pvr} exprimierten (Abb. 3.25).

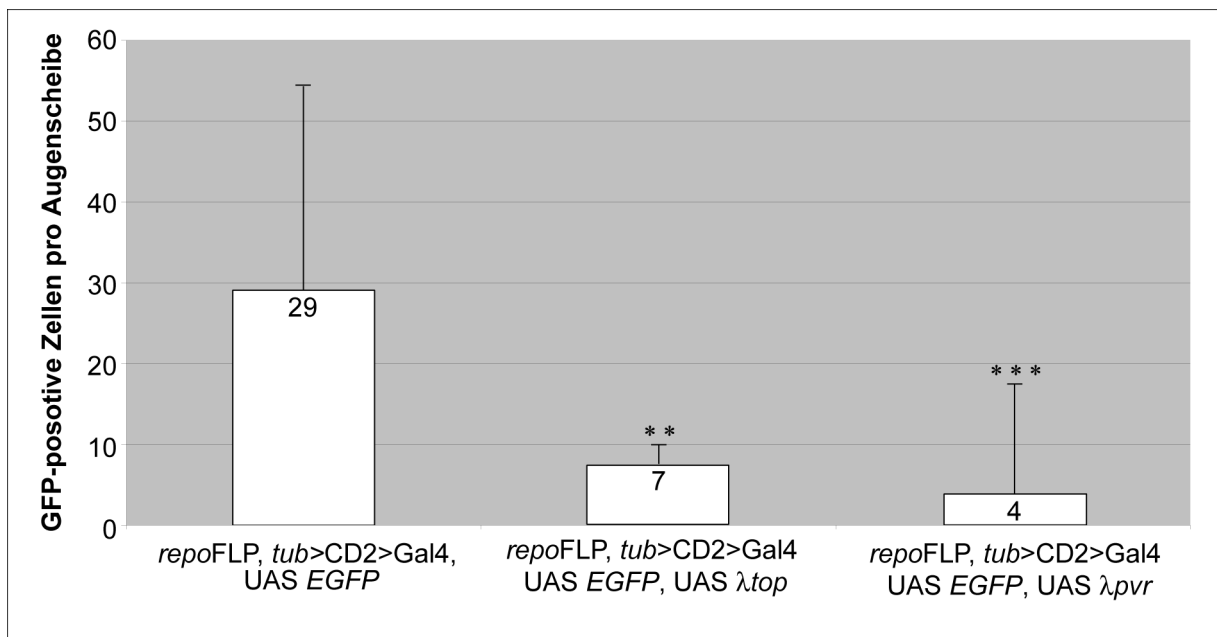


Abb. 3.25: Einfluss von λ_{top} und λ_{pvr} auf die Anzahl GFP-markierter Gliazellklone.

Die Grafik stellt die durchschnittliche Anzahl der GFP-positiven Klone in einer Augenimaginalscheibe des Wildtyps und von Larven dar, die λ_{top} und λ_{pvr} in einzelnen Zellen exprimierten. Für den Genotyp *repoFLP, tub>CD2>Gal4, UAS EGFP* wurden 29, für *repoFLP, tub>CD2>Gal4, UAS EGFP, UAS λ_{top}* 30 und für *repoFLP, tub>CD2>Gal4, UAS EGFP, UAS λ_{pvr}* 32 Scheiben ausgewertet. Die ermittelten Zahlen sind in Bezug auf die Werte, die für den Wildtyp ermittelt wurden, für Larven mit dem Genotyp *repoFLP, tub>CD2>Gal4, UAS EGFP, UAS λ_{top}* sehr signifikant (** / $p \leq 0,005$) und für *repoFLP, tub>CD2>Gal4, UAS EGFP, UAS λ_{pvr}* höchst signifikant (***/ $p \leq 0,0005$).

Eine Augenimaginalscheibe des Wildtyps hatte durchschnittlich 29 GFP-positive Zellen (Abb. 3.25). Die Gal4-vermittelten Expression von UAS λtop oder UAS λprv führte zu einer deutlichen Verringerung dieser Zahl. Die Aktivierung von λtop reduzierte die Anzahl der GFP-positiven Zellen auf sieben pro Scheibe, und von λprv sogar auf nur vier (Abb. 3.25). Die Expression von λtop und λprv in einzelnen Zellen resultierte also in einer Reduktion dieser Zellen.

Die Gliazellen der Augenimaginalscheibe gehören zu verschiedenen Subpopulationen (Silies *et al.*, 2007) (Abb. 3.26). Deshalb wurde nun analysiert, ob die Verringerung der GFP-positiven Zellen infolge der Expression von λtop und λprv alle Gliazellen betrifft oder spezifisch einer bestimmten Subpopulation zuzuordnen ist. Dafür wurde zunächst bestimmt, wie hoch der prozentuale Anteil der einzelnen Subpopulationen im Wildtyp ist. Gliazellen, die sich noch im optischen Stiel befanden, wurden nicht weiter berücksichtigt.

Bei Betrachtung der einzelnen Arten von Gliazellen in der Augenimaginalscheibe ergab sich im Wildtyp ein prozentualer Anteil von 56 % Migrating Glia, 25 % Wrapping Glia und 13 % Differentiating Glia. 2 % der Gliazellen in der Augenimaginalscheibe waren Carpet Glia, und die verbleibenden 4 % der Gliazellen Marginal Glia (Abb. 3.27). Die Resultate der ektopischen Expression von λtop und λprv waren einander sehr ähnlich. Wurde in den Zellklonen λprv exprimiert, ergab sich ein Verhältnis von 32 % Migrating Glia, 39 % Wrapping Glia, 12 % Differentiating Glia, 7 % Carpet Glia und 10 % Marginal Glia (Abb. 3.27). Vergleichbar war die Situation bei der Expression von λtop , wo ein durchschnittlicher Anteil von 35 % Migrating Glia, 43 % Wrapping Glia, 12 % Differentiating Glia, 4 % Carpet Glia und 6 % Marginal Glia festgestellt wurde (Abb. 3.27).

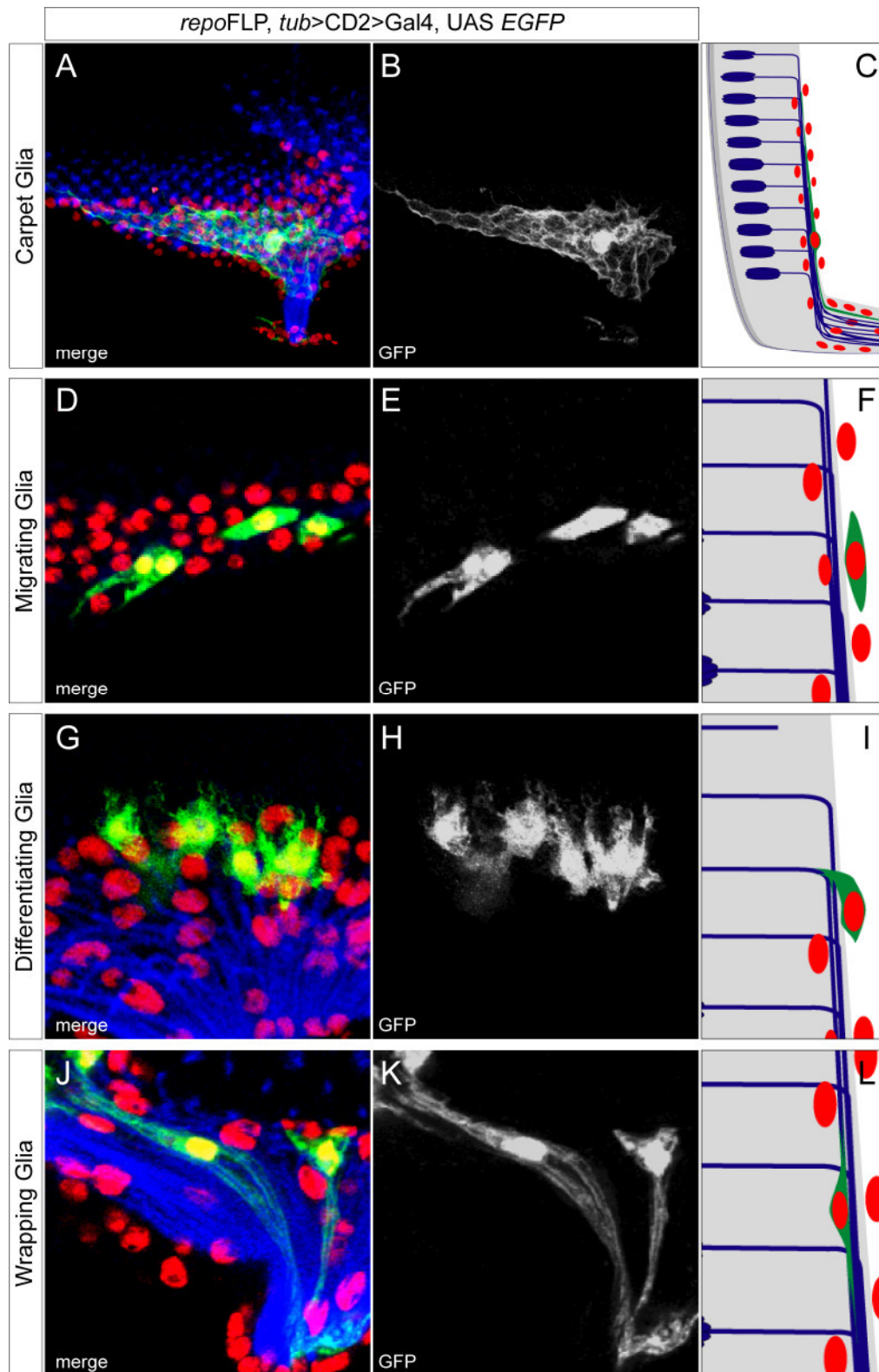


Abb. 3.26: Die Gliazellen der Augenimaginalscheibe gehören zu verschiedenen Untergruppen.

Die **linke und mittlere Spalte** zeigt immunhistochemische Färbung von Augenimaginalscheiben aus L3-Larven (rot: α -Repo, grün bzw. weiss: α -GFP, blau: α -HRP). Alle Abbildungen sind einzelne konfokale Schnittebenen und zeigen Zellklone, welche die verschiedenen Klassen von Gliazellen der Augenimaginalscheibe repräsentieren. Anterior ist oben. Die **rechte Spalte** enthält schematische Darstellungen von Querschnitten durch Augenimaginalscheiben, in denen die Positionen der einzelnen Gliazellgruppen in der Scheibe eingezeichnet sind. Das Farbschema entspricht dem der konfokalen Aufnahmen.

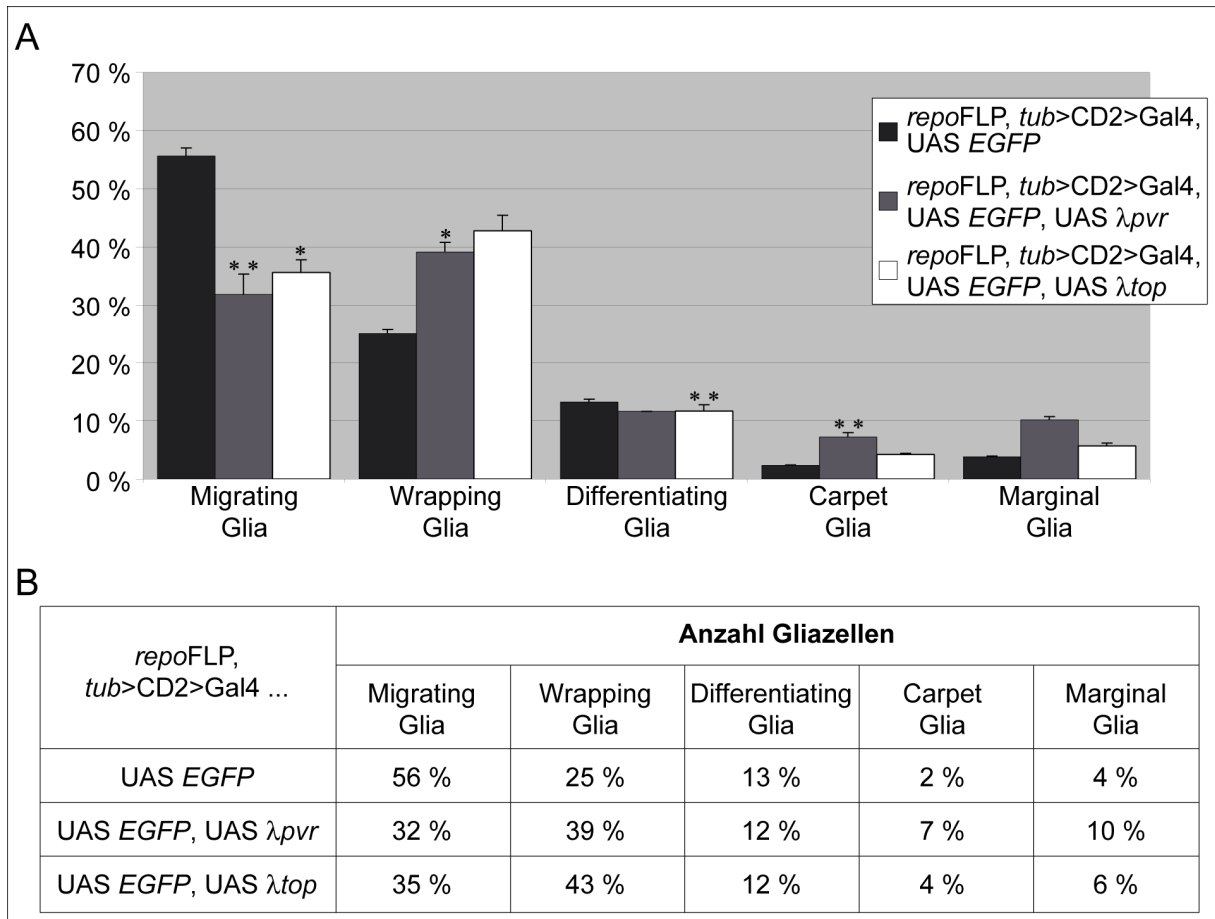


Abb. 3.27: Prozentuale Anteile der Gliazellarten in der Augenscheibe des Wildtyps und bei Expression der Transgene *UAS λtop* und *UAS λprv* mit *repoGal4*.

Zur Quantifizierung der einzelnen Arten von Gliazellen in der Augenimaginalscheibe wurden pro Genotyp etwa 50 Scheiben betrachtet, die GFP-positiven Zellen gezählt und den verschiedenen Gliazellarten zugeordnet. Die Grafik **A** stellt die prozentualen Anteile der verschiedenen Arten von Gliazellen der untersuchten Genotypen dar, die in der Tabelle **B** noch einmal angegeben sind. Die Resultate sind in Bezug auf die für den Wildtyp ermittelten Zahlen von unterschiedlicher Signifikanz (nicht signifikant, $p > 0,05$; signifikant / * = $p \leq 0,05$; sehr signifikant / ** = $p \leq 0,005$).

Die ektopische Expression von *λprv* und *λtop* resultierte also in einer Verringerung der GFP-positiven Zellen im Vergleich zum Wildtyp. Darüber hinaus war das Verhältnis der einzelnen Arten von Gliazellen zueinander bei Expression von *λtop* und *λprv* mit dem Gal4-Treiber *repo* anders als im Wildtyp. Insbesondere eine Verringerung des prozentualen Anteils der migrierenden Gliazellen und ein Anstieg des Anteils der umhüllenden Glia war auffallend.

Möglicherweise betreffen die Auswirkungen der ektopischen Genexpression also vor allem die migrierenden Glia, während andere Gliazellarten davon weniger in Mitleidenschaft gezogen werden. Dem entsprechend könnte die Zunahme des prozentualen Anteils der anderen Gliazellarten primär aus der Verringerung der migrierenden Glia resultiert.

Die meisten Zellen, die λ_{pvr} exprimierten, zeigten eine wildtypische Morphologie. Allerdings wurden gelegentlich auch davon abweichenden Strukturen beobachtet, vor allem bei Zellen, die basal der Photorezeptorneurone in der Scheibe lagen. Die Zellen waren sehr lang gestreckt und bildeten an ihrem anterioren Ende Filopodien aus. Mitunter dehnten sich die Zellen über die von den Photorezeptorneuronen vorgegebene anteriore Grenze hinaus aus. Auch andere, nicht GFP-positive Zellen migrierten zu weit (Abb. 3.28 I - L). Hingegen sahen Zellen, die den anderen Gliazellarten der Augenimaginalscheibe zuzuordnen waren, morphologisch weitgehend normal aus (Abb. 3.28 A - H).

Ebenso wirkten die meisten Zellen, die λ_{top} exprimierten, wildtypisch (Abb. 3.29 A - H). Gelegentlich wurden jedoch einzelne Zellen mit einer sternförmigen Morphologie beobachtet, die keinem der glialen Subtypen eindeutig zuzuordnen waren (Abb. 3.29 I - J).

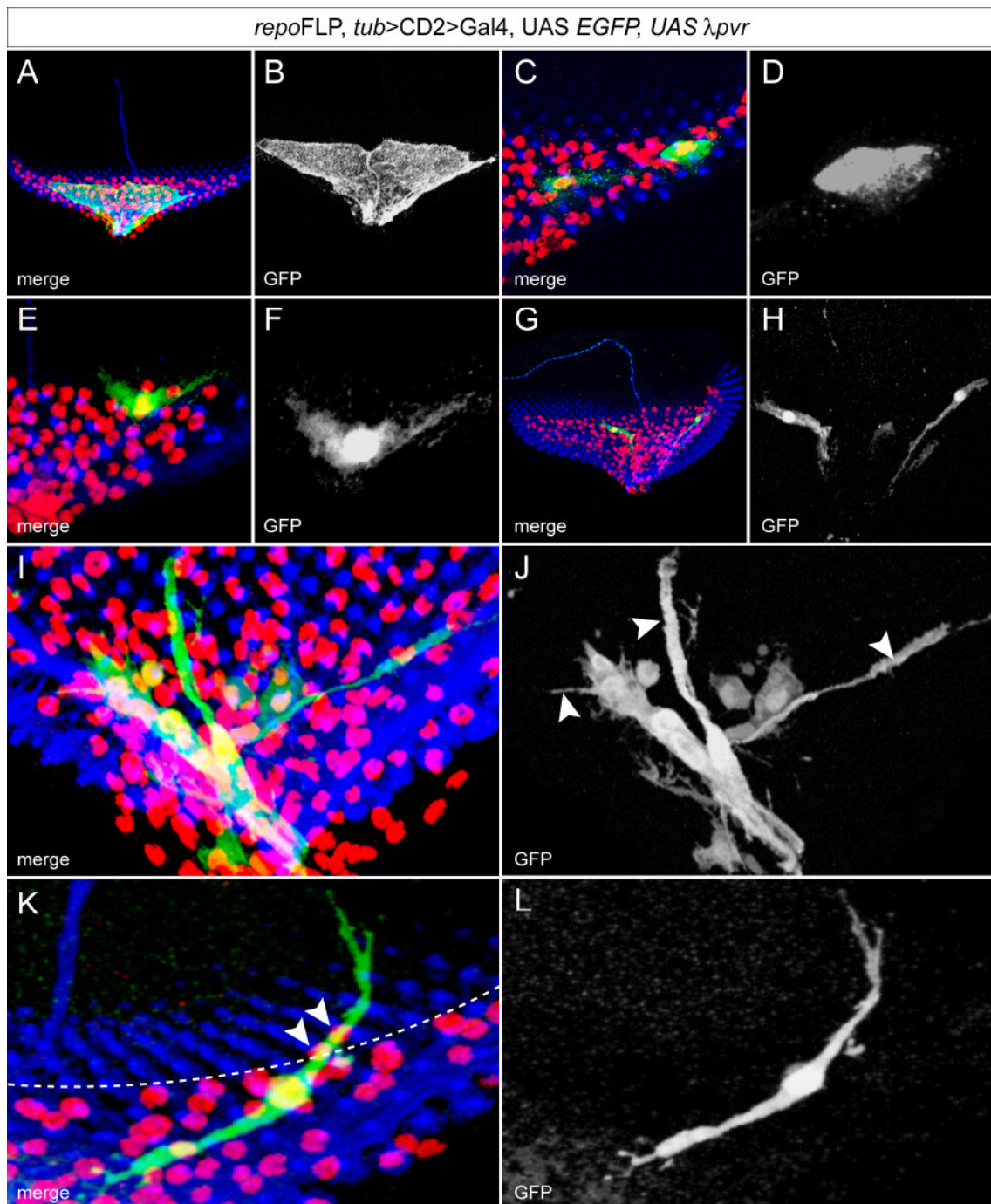


Abb. 3.28: Morphologie von Gliazellen mit *repoGal4*-induzierter Expression von UAS λpvr .

A - L Immunhistochemische Färbung von Augenimaginalscheiben aus Larven des dritten Larvenstadiums. Die Zellkerne der Gliazellen sind rot dargestellt (α -Repo), das Zytoplasma der Gliazellen grün (α -GFP) und die Photorezeptorzellen blau (α -HRP). Die Abbildungen sind Projektionen konfokaler Bildstapel. **A - H** Die meisten GFP-positiven Zellen entsprachen morphologisch dem Wildtyp und waren eindeutig den Subtypen Carpet Glia (**A, B**), Migrating Glia (**C, D**), Differentiating Glia (**E, F**) und Wrapping Glia (**G, H**) zuzuordnen. **I, J** Die hier dargestellten Zellen lagen basal der Photorezeptorneurone in der Scheibe, so dass es sich wahrscheinlich um Migrating Glia handelt. Die lang gestreckte Struktur und die Filopodien sind jedoch ungewöhnlich (Pfeilköpfe). **K, L** Diese Zelle gehört wahrscheinlich zur Gruppe der Migrating Glia, obwohl sie extrem lang gestreckt ist und filopodienartige Ausläufer am anterioren Ende hat. Im Bereich dieses Zellklons lagen Repo-positive Zellkerne (**K**, Pfeilköpfe), die sich über die von den anderen Gliazellkernen respektierte Grenze (hier durch die gestrichelte Linie angedeutet) hinaus bewegt hatten.

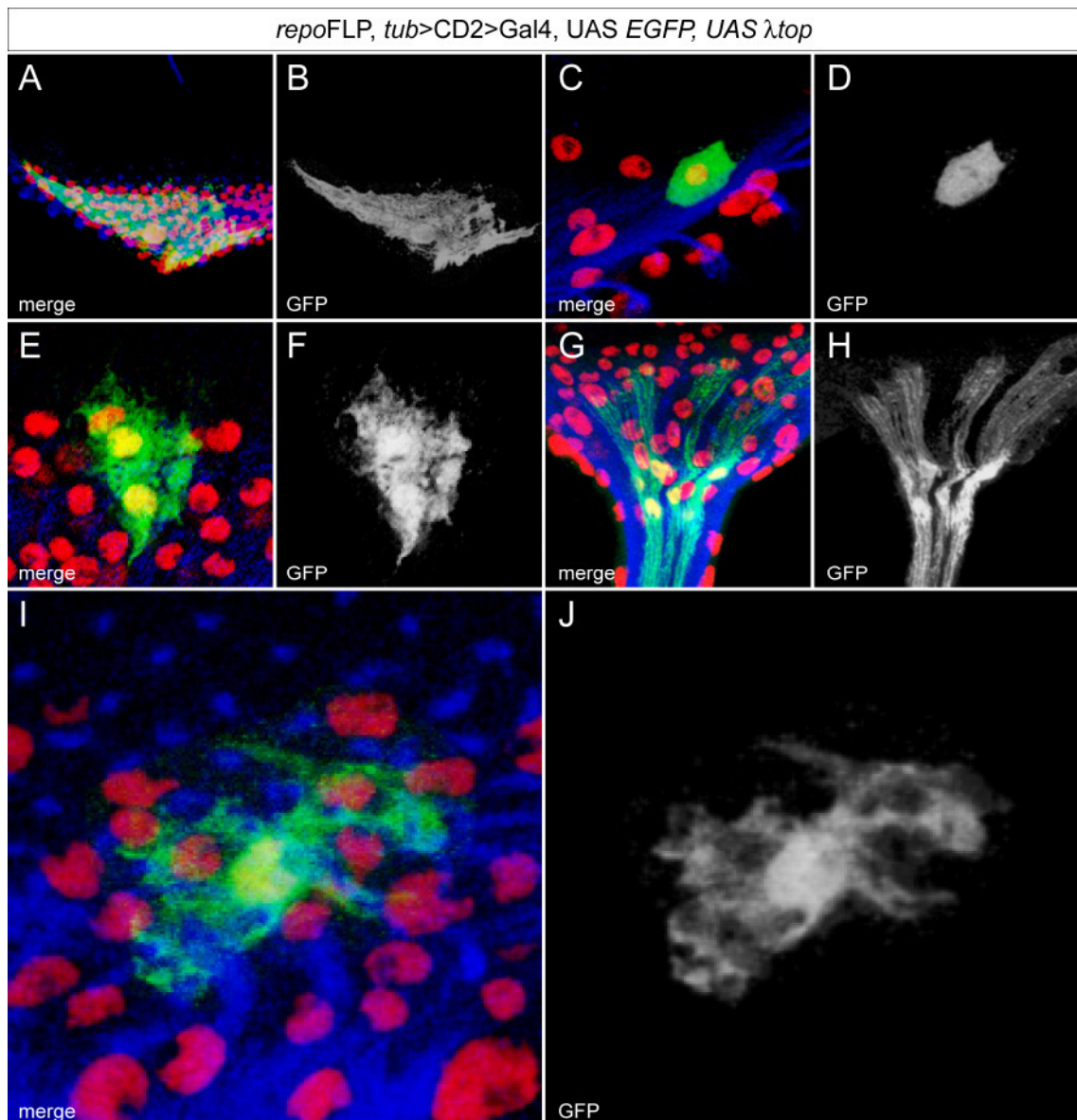


Abb. 3.29: Morphologie von Gliazellen der Augenimaginalscheibe bei *repoGal4*-induzierter Expression von UAS λtop .

A - J Konfokale Analyse von Augenimaginalscheiben aus Larven, die λtop in einzelnen Gliazellen exprimierten. Die Zellkerne der Gliazellen sind rot dargestellt (α -Repo), das Zytoplasma der Gliazellen grün bzw. weiss (α -GFP) und die Nervenzellen blau (α -HRP). Die Abbildungen sind Projektionen konfokaler Bildstapel. Anterior ist oben. **A - H** Die meisten GFP-positiven Zellen entsprachen morphologisch dem Wildtyp und waren eindeutig den Subtypen Carpet Glia (**A, B**), Migrating Glia (**C, D**), Differentiating Glia (**E, F**) und Wrapping Glia (**G, H**) zuzuordnen. **I, J** Eine Zuordnung der hier gezeigten Zelle zu einer der glialen Subgruppen war nicht möglich.

3.2.2 Expressionsanalyse von PVR

Bisher wurden die Auswirkungen der ektopischen Expression von UAS λpvr im Expressionsmuster von *repoGal4* untersucht. PVR wird aber auch natürlicherweise

für die Entwicklung von Gliazellen benötigt. So wird PVR in den Mittellinienglia und Hämocyten sowie nahezu ubiquitär in Epithelzellen des Embryos exprimiert (Rosin *et al.*, 2004).

Da PVR-mutante Tiere vor Erreichen des dritten Larvenstadiums sterben, wurde ersatzweise untersucht, welchen Einfluss die Expression einer dominant negativen Form dieses Proteins durch das UAS/Gal4-System auf die Augenimaginalscheiben von Larven hat. Larven mit dem Genotyp *repo >> pvr^{DN}* zeigten eine normale Anzahl und Verteilung Repo-positiver Zellkerne in der Scheibe. Allerdings waren die Zellen abgerundet, und mitunter waren auch Lücken zwischen den einzelnen Zellen zu sehen. Die migratorische Front der Gliazellen erschien unregelmäßig (Abb. 3.30).

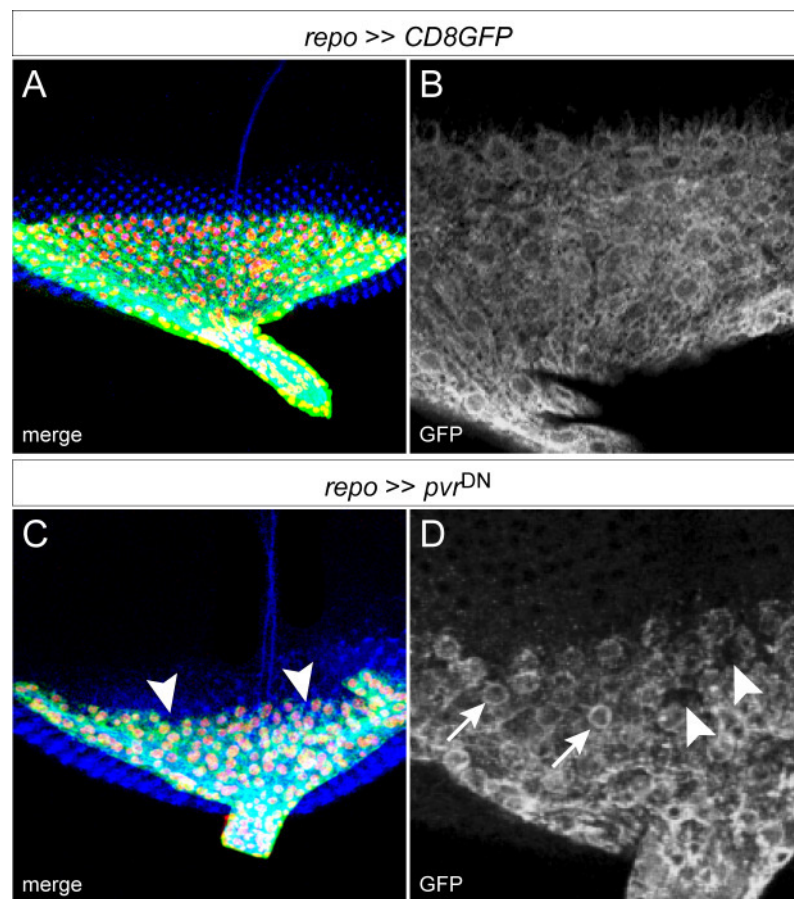


Abb. 3.30: Augenimaginalscheiben mit Expression einer dominant negativen Form von PVR in Gliazellen.

A - D Augenimaginalscheibe einer L3-Larven, die einer immunhistochemischen Färbung mit α -Repo (rot), α -GFP (grün bzw. weiss) und α -HRP (blau) unterzogen wurde. Anterior ist oben. **A** und **C** sind Projektionen konfokaler Bildstapel, **B** und **D** Vergrößerungen einzelner konfokale Schnittebenen aus diesen Stapeln. **A**, **B** Wildtyp. **C**, **D** Die Anzahl und Verteilung der Gliazellen in der Augenimaginalscheibe mit ektopischer Expression einer dominant negativen Form von PVR in Gliazellen wirkte normal, die migratorische Front erschien jedoch unregelmäßig (**C**, Pfeilköpfe). Bei Betrachtung eines konfokalen Einzelbilds waren Lücken zwischen den einzelnen Gliazellen zu erkennen (**D**, Pfeilköpfe), und die Zellen hatten eine abgerundete Form (**D**, Pfeile).

Anhand einer immunhistochemischen Färbung mit einem α -PVR-Antikörper zeigte sich, dass PVR in Zellen der Augenimaginalscheibe exprimiert wird. Die immunhistochemische Färbung mit α -PVR ergab ein deutliches Signal im Epithel, das die Augenimaginalscheibe umschließt (Abb. 3.31 G und H). Noch kräftiger war das von Hämocyten ausgehende α -PVR-Signal, die an der Augenscheibe hafteten (Abb. 3.31 C und D). Der Bereich der Augenimaginalscheibe, in dem sich die Gliazellen befanden, zeigte allerdings keine spezifische PVR-Färbung (Abb. 3.31 E und F). Anhand des PVR-Antikörpers konnte also die Expression von PVR in den Gliazellen der Augenimaginalscheibe nicht nachgewiesen werden. Da aber aufgrund der morphologischen Defekte durch Expression von dominant negativem *pvr* mit dem Gal4-Treiber *repo* davon auszugehen ist, dass PVR eine Funktion in den Gliazellen der Augenimaginalscheibe hat, könnte eine mögliche Ursache eine sehr schwache Expression des Epitops sein, was ein nur schwer zu detektierendes Signal des Antikörpers zur Folge hätte.

In den peripheren Nerven zeigte sich dagegen ein deutliches, klar abgegrenztes Signal des PVR-Antikörpers (Abb. 3.32). Anhand von Kofärbungen mit α -GFP, das hier einerseits mit dem Gal4-Treiber *moody* ektopisch in Subperineuralzellen aktiviert wurde, sowie mit *viking*GFP, das in der neuralen Lamelle exprimiert wurde, konnte festgestellt werden, dass das von α -PVR erkannte Epitop in den Perineuralglia der peripheren Nerven liegt (Abb. 3.32).

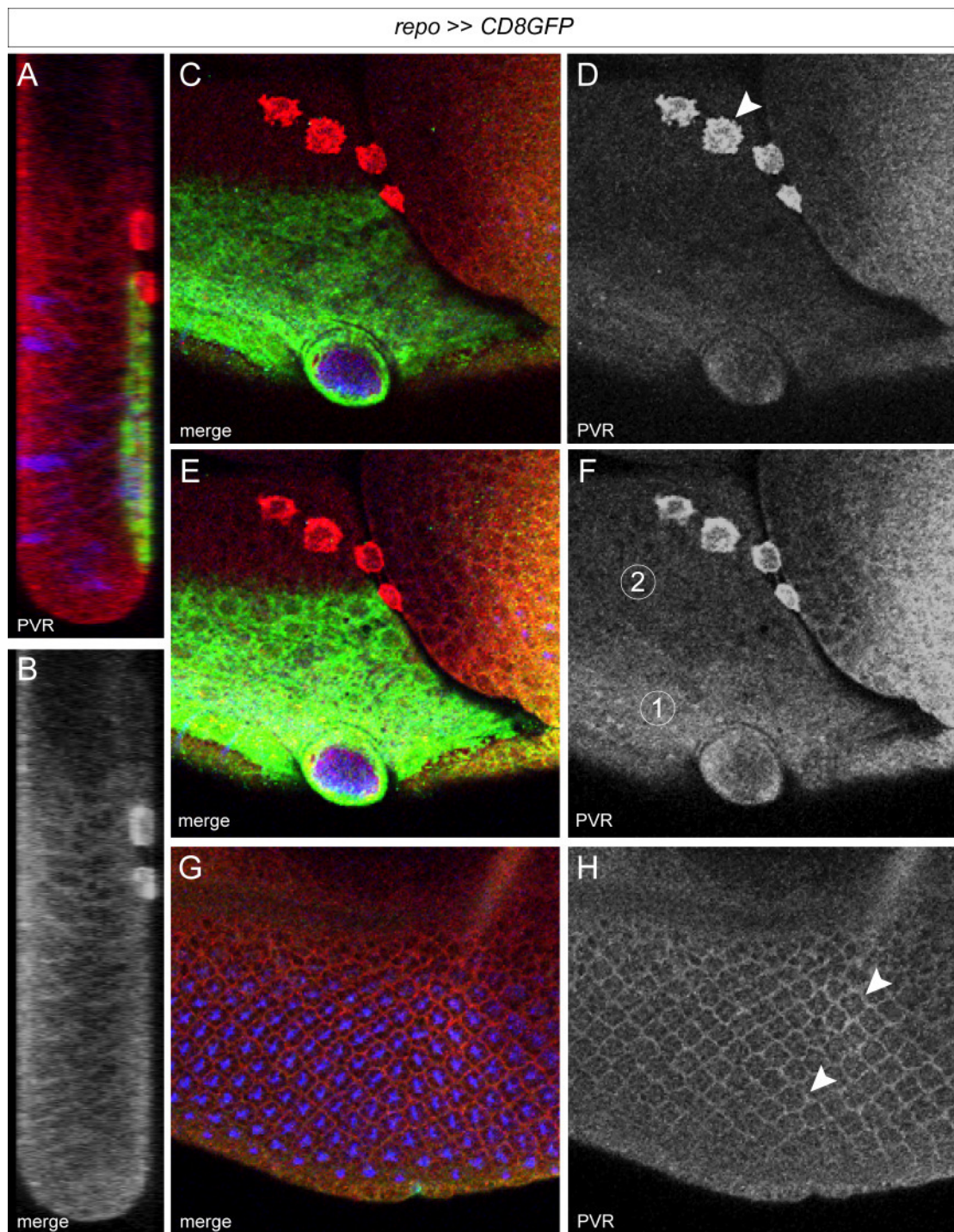


Abb. 3.31: PVR wird im Epithel der Augenimaginalscheibe und in Hämocyten exprimiert.

A - H Konfokale Analyse von Augenimaginalscheiben aus Larven des dritten Larvalstadiums. In rot bzw. weiss ist das Signal des α -PVR-Antikörpers dargestellt, während das Zytoplasma der Gliazellen in grün (α -GFP) und die Neurone in blau (α -HRP) markiert sind. **A, B** Orthogonale Rekonstruktion eines konfokalen Bildstapels. Anterior ist oben, apikal links. **C - H** Einzelne konfokale Schnittebenen aus diesem Stapel. **C, D** An der basalen Seite der Scheibe haftende Hämocyten zeigten ein deutliches α -PVR-Signal (Pfeilkopf). **E, F** Im Bereich der Gliazellen schien das α -PVR-Signal etwas stärker (①) als weiter anterior (②). Das Signal ließ sich aber keinen zellulären Strukturen zuordnen. **G, H** Im apikalen Epithel waren insbesondere die Membranen mit α -PVR markiert (Pfeilköpfe).

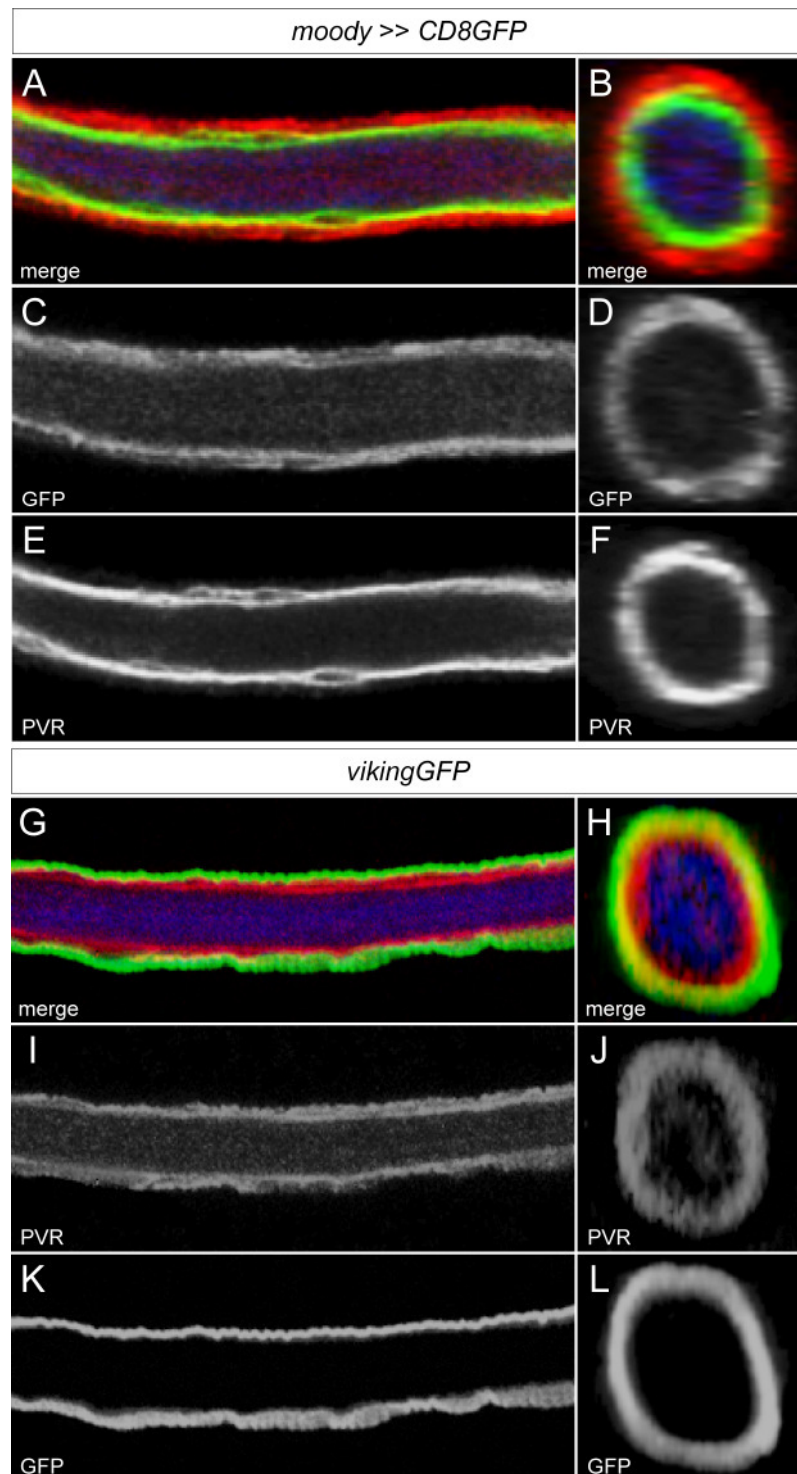


Abb. 3.32: PVR wird in den Perineuralgia der peripheren Nerven exprimiert.

A - L Immunhistochemische Färbung von peripheren Nerven aus L3-Larven mit α -PVR (rot bzw. weiss), α -GFP (grün bzw. weiss) und α -HRP (blau). In der **linken Spalte** sind einzelne konfokale Schnittebenen dargestellt, und in der **rechten Spalte** orthogonale Rekonstruktionen der konfokalen Bildstapel. **A - F** Anhand von ektopisch mit dem Gal4-Treiber *moody* exprimiertem GFP wurden die Subperineuralgia der peripheren Nerven des Wildtyps markiert. Das von α -PVR erkannte Epitop befand sich in einer Struktur um die Subperineuralgia der peripheren Nerven herum. **G - L** Hier wurde mit GFP, das unter der Kontrolle des *viking*-Promotors exprimiert wurde, die neurale Lamelle gekennzeichnet. α -PVR markierte eine Struktur innerhalb der neuralen Lamelle.

3.2.3 Identifikation von Genen mit regulatorischem Einfluss auf PVR

Die humanen Homologe von PVR, PDGFR und VEGFR, zeigen in Tumoren häufig eine gesteigerte Aktivität. Insbesondere die Aktivierung von PDGFR scheint eine stimulierende Wirkung auf die Migration von Gliazellen zu haben (Westermarck *et al.*, 1995). In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass die Expression einer konstitutiv aktiven Form von PVR ektopische Migration von Gliazellen in der Augenimaginalscheibe verursacht und die Morphologie und Vitalität der Gliazellen der Augenimaginalscheibe und der peripheren Nerven beeinflusst. Darüber hinaus wird PVR auch natürlicherweise in Gliazellen exprimiert. Die Identifikation von Genprodukten, die mit PVR interagieren, könnte dabei helfen, die Entwicklung von Gliazellen sowie die Mechanismen, welche die Migration von Gliazellen fördern, besser zu verstehen. Solche Erkenntnisse ließen sich eventuell auch für die humane Tumorforschung nutzen.

Als Basis für einen Screen nach Proteinen mit regulatorischem Einfluss auf PVR wurde UAS λpvr in Gliazellen mit dem Gal4-Treiber *repo* aktiviert. Die Versuchstiere starben in Abhängigkeit von der Temperatur während der späten Embryonalentwicklung (bei 18 °C) bzw. während des ersten Larvenstadiums (bei 25 °C) (Tab. 3.3 und Abb. 3.33).

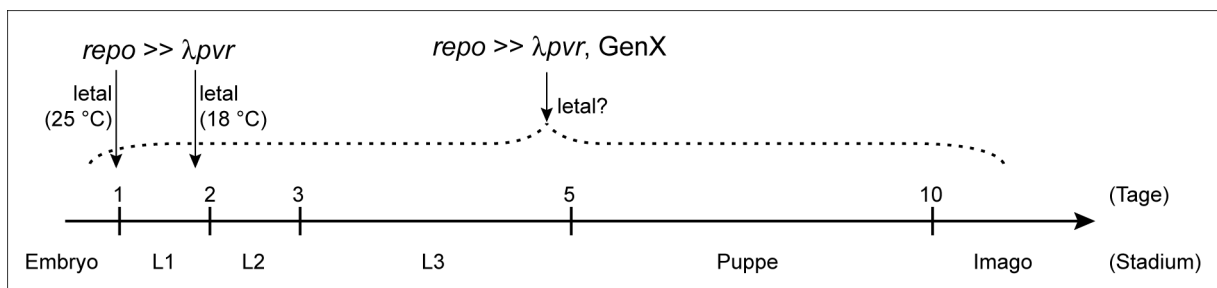


Abb. 3.33: Die Deregulation weiterer Gene soll die λpvr -induzierte Letalität in andere Entwicklungsstadien verschieben.

Bei 25 °C nimmt die Entwicklung vom Embryo bis zur adulten Fliege etwa 10 Tage in Anspruch. In der Grafik ist dargestellt, welche Stadien nach wie vielen Tagen der Entwicklung erreicht sind. Wurde UAS λpvr mit dem Gal4-Treiber *repo* mit Insertion auf dem dritten Chromosom exprimiert, so starben die Tiere in Abhängigkeit von der Temperatur am Ende der Embryonalentwicklung oder während des ersten Larvenstadiums. Die ektopische Funktionsreduktion eines weiteren Gens („Gen X“) könnte die Letalität in andere Entwicklungsstadien verschieben.

Als Treiberlinie wurde der *repoGal4*-Stamm verwendet, bei dem das Transgen auf dem dritten Chromosom inseriert ist. Vor diesem genetischen Hintergrund wurden nun weitere Gene ektopisch reguliert. Dabei wurde angenommen, dass durch die zusätzliche Veränderung der Genexpression eine Verschiebung der λpvr -induzierten Letalität in andere Entwicklungsstadien erfolgt, d.h. dass die entsprechenden Tiere entweder früher oder später sterben als die Larven, die nur λpvr alleine ektopisch exprimieren. Von besonderem Interesse waren solche Gene, deren ektopische Regulation die Letalität verzögerte, da eine Verringerung der Mortalität als Indikator für eine genetische Interaktion aussagekräftiger ist als die Steigerung der Mortalität. Letztere kann leicht durch die Fehlregulation mehrerer Gene in einer Zelle erreicht werden, auch wenn die entsprechenden Genprodukte an verschiedenen Prozessen beteiligt sind.

Das eben beschriebene Modell erfordert die Kombination verschiedener genetischer Elemente in einer Linie. Deshalb wurde zunächst ein Stamm generiert, der im Genom *UAS λpvr* , *repoGal4* sowie den Gal4-Inhibitor Gal80 trägt (Abb. 3.34).

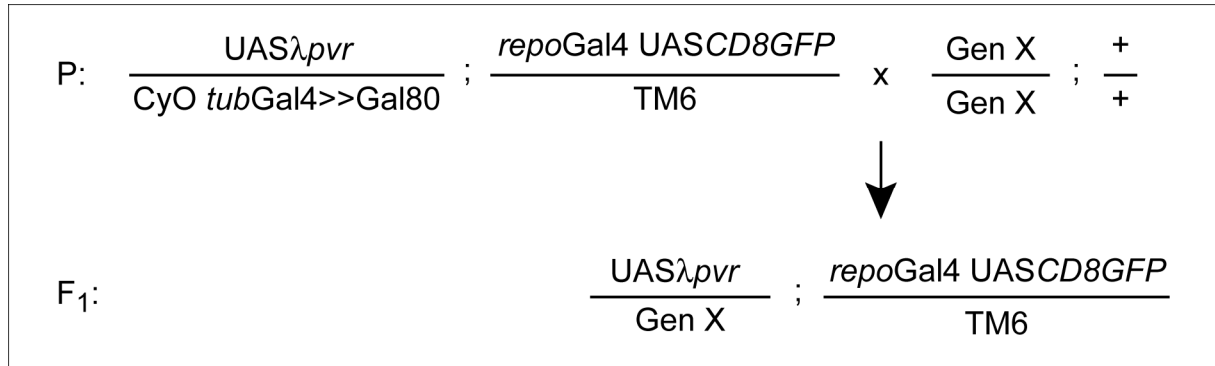


Abb. 3.34: Kreuzungsschema für den Screen nach Genen mit regulatorischem Einfluss auf PVR.

Der Ausgangsstamm trug *repoGal4*, *UAS λpvr* , *UAS CD8GFP* sowie den Gal4-Inhibitor Gal80 im Genom. Da die Allele mit der *UAS λpvr* - bzw. der *repoGal4 UAS CD8GFP*-Insertion in Homozygose zu Letalität führen, waren zusätzlich Balancerchromosomen notwendig (CyO und TM6), um einen stabilen Stamm zu etablieren. Die Bezeichnung „Gen X“ repräsentiert die transgenen Linien, die mit dem Ausgangsstamm verkreuzt wurden. In der F₁-Generation waren Tiere mit der Allelkombination *repoGal4 UAS CD8GFP*, *UAS λpvr* sowie dem Kandidatengen von Interesse.

Da die Expression von *UAS λpvr* mit *repoGal4* in frühen Entwicklungsstadien letal ist, wurde die Aktivität von Gal4 durch Gal80 inhibiert, so dass ein stabiler Stamm etabliert werden konnte. Zusätzlich wurde *UAS CD8GFP* ins Genom dieser

Fliegenlinie eingebracht, so dass Tiere mit dem passenden Genotyp anhand des endogenen GFP-Signals identifiziert werden konnten.

Die potentiellen Kandidatenstämme wurden dann mit diesem Ausgangsstamm verkreuzt (Abb. 3.34) und die Vitalität der Nachkommen beurteilt.

Bei den zu testenden Kandidaten handelte es sich um 270 Stämme mit genomischen Defizienzen („Defizienzenkit“, Bloomington Stock Center). Außerdem wurden transgene Linien untersucht, in deren Genom DNA-Sequenzen unter Kontrolle von UAS eingebracht wurden, deren Transkription zur Bildung von doppelsträngiger RNA und Aktivierung des RNA Interferenz-Mechanismus führt. Als Resultat wird die entsprechende Genfunktion reduziert oder vollständig gehemmt. Derartige Stämme können bei verschiedenen Institutionen käuflich erworben werden, wobei mittlerweile für nahezu alle Gene von *Drosophila* entsprechende Linien erhältlich sind. Für diese Arbeit standen etwa 1500 transgene Linien zur Verfügung, die bereits im Institut für Neurobiologie der Universität Münster vorhanden waren. Diese Stämme waren ursprünglich für andere in diesem Institut stattfindende Arbeiten von Bedeutung. Eine Liste der untersuchten Linien findet sich im Anhang.

In einem ersten Ansatz wurde der Ausgangsstamm gegen etwa 400 RNA Interferenz-Linien gekreuzt. Die Inkubation der Kreuzungen erfolgte bei 25 °C und es wurde der Genotyp der adulten F₁-Fliegen untersucht. Anhand dieser Methode wurden jedoch keine potentiellen Kandidaten identifiziert.

Deshalb wurden in einem veränderten Versuchsansatz die Kreuzungen bei 18 °C gehalten und der Einfluss der Kandidaten auf die λpvr -induzierte Mortalität anhand des endogenen GFP-Signals der F₁-Individuen beurteilt. Darüber hinaus wurden außerdem nicht die adulten Tiere, sondern bereits die Larven untersucht. Zunächst wurden dafür die einzelnen Linien des Defizienzenkits gegen den Ausgangsstamm gekreuzt. Es konnten jedoch keine möglichen Kandidaten identifiziert werden. Daraufhin wurden als Nächstes weitere RNA Interferenz-Linien getestet. Dabei wurden schließlich mehrere potentielle Kandidaten identifiziert und in einem zweiten Ansatz verifiziert (Tab. 3.4).

Die Identifikation der potentiellen Kandidaten erfolgte also durch den positiven Einfluss ihrer Funktionsreduktion auf die λpvr -induzierte Mortalität. Die längste Verzögerung der Mortalität reichte bis zur pupalen Phase, während sich die transgenen Larven bei anderen Genkombinationen lediglich bis zum zweiten oder

dritten Larvenstadium entwickelten (Tab. 3.4). Generell waren allerdings immer vergleichsweise wenige Tiere mit dem gesuchten Genotyp vorhanden.

Tab. 3.4: Gene, deren Funktionsreduktion bei 18 °C die durch Expression von λ pvr in Gliazellen verursachte Letalität in spätere Entwicklungsstadien verschiebt.

Larven mit dem Genotyp *repo* (III) >> λ pvr starben bei 18 °C während des ersten Larvenstadiums (vgl. Tab. 3.3). Wurde zusätzlich die Funktion von einem der hier aufgelisteten Gene reduziert, verschob sich die Letalität in spätere Entwicklungsstadien (L2 / L3 = Letalität im 2. / 3. Larvenstadium, P = letal während der pupalen Phase). Die Bezeichnung „GenX^{dsRNA}“ steht stellvertretend für die entsprechenden Kandidatengene. Zusätzlich ist angegeben, ob die alleinige Expression des Kandidatengens zu Letalität vor Erreichen des adulten Stadiums führt (v, Versuchstiere erreichen das adulte Stadium; †, Versuchstiere erreichen nicht das adulte Stadium).

CG	Gen	<i>repoGal4</i> (III) >> λ pvr, GenX ^{dsRNA}	<i>repoGal4</i> (II+III) >> GenX ^{dsRNA}
CG16876	<i>x</i>	L2	v
CG9494	<i>Tetraspanin 29Fa</i>	L2 / L3	v
CG5825	<i>Histone H3.3A</i>	P	v
CG11335	<i>lysyl oxidase-like</i>	P	v
CG8595	<i>Toll-7</i>	L3	†
CG18380	<i>longitudinals lacking</i>	L2	v
CG6435	<i>x</i>	L2	v
CG6518	<i>inactivation no afterpotential C</i>	L2	v
CG6657	<i>vegetable</i>	L2	†

Tab. 3.5: Humane Homologe der im Screen identifizierten Kandidaten.

In der Tabelle sind die Gene aufgelistet, deren Funktionsreduktion zur Verzögerung der λ pvr-induzierten Mortalität führte. Außerdem sind potentielle humane Homologe dieser Gene angegeben, die aufgrund von Homologien auf Ebene der Aminosäuresequenz ermittelt wurden. Als Indikator für Homologien wurde die Identität der Sequenzen herangezogen, die sich aus der Anzahl gleicher Aminosäuren an der selben Position im Protein im Verhältnis zur Gesamtzahl der Aminosäuren ergibt.

CG (<i>D. melanogaster</i>)	Gen (<i>Homo sapiens</i>)	Identität [Anzahl ident. AS / Gesamtzahl AS (%)]
CG16876	<i>type A-domain of von Willebrand (vW)-factor</i>	55 / 216 (25 %)
CG9494	<i>Tetraspanin 30</i>	76 / 239 (31 %)
CG5825	<i>Histon H3</i>	136 / 136 (100 %)
CG11335	<i>lysyl oxidase-like 4</i>	138 / 327 (42 %)
CG8595	<i>Toll-like receptor 3</i>	120 / 351 (34 %)
CG18380	<i>zinc finger and BTB domain containing 20</i>	38 / 104 (36 %)
CG6435	<i>x</i>	-
CG6518	<i>protein kinase C β</i>	350 / 660 (53 %)
CG6657	<i>mannosyltransferase</i>	138 / 429 (32 %)

Wurden die Kandidatengene alleine mit dem *repoGal4*-Treiber exprimiert, war bei Verwendung eines *repoGal4*-Stammes mit zwei Insertionen des Transgens auf dem zweiten und dritten Chromosom und bei 25 °C nur die Funktionsreduktion von CG8595 und CG6657 letal (I. Schmidt, unveröffentlichte Daten).

Durch Datenbankrecherche und Literatursuche wurden potentielle humane Homologe der in Tabelle 3.4 aufgelisteten Gene identifiziert (Tab. 3.5). Als Quellen dienten die Datenbanken von SMART (<http://smart.embl-heidelberg.de>) sowie NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/Blast.cgi>).

3.3 Gene mit potentielltem Einfluss auf die Tumorgenese im Menschen

Das Genexpressionsprofil von Gliomzellen unterscheidet sich deutlich von dem nichtpathogener Zellen. So wurden 2004 und 2005 vom Institut für Neuropathologie zwei Artikel veröffentlicht, die sich mit Veränderungen im Genexpressionsprofil von Gliomzellen auseinandersetzten. Dabei wurden verschiedene Gene mit potentieller Relevanz für das Migrationsverhalten dieser Zellen beschreiben. Die Expression der entsprechenden Gene war in schnell bzw. langsam migrierenden Gliomzellen deutlich herauf- bzw. herunterreguliert (Tatenhorst *et al.*, 2004 und 2005). Diese Daten dienten als Grundlage für die nachfolgenden Versuche.

3.3.1 *Loco*

Eines der in schnell migrierenden Gliomzellen heraufregulierten Gene war *RGS3* (*regulator of G protein signalling 3*). Es zeigte gesteigerte Expression in U373*fast*- und TB288*fast*-Zellen. Außerdem wurde *RGS4* (*regulator of G protein signalling 4*) identifiziert, das in U373*fast*-Zellen heraufreguliert war. Das *Drosophila*-Homolog dieser beiden Gene ist *loco* (*locomotion defects*), ein Gen, dass für die Entwicklung von Gliazellen benötigt wird (Granderath *et al.*, 1999 und 2000; Schwabe *et al.*, 2005; Yu *et al.*, 2005; Kaplow *et al.*, 2008).

Bisher sind vier verschiedene Isoformen von *loco* bekannt, von denen *loco-c1* in lateralen Gliazellen, *loco-c2* in Vorläuferzellen des PNS sowie Follikelzellen und

loco-c3 in Nährzellen exprimiert wird. Für die Isoform *loco*-c4 wurde noch kein funktionelles Protein beschrieben (Granderath *et al.*, 1999 und 2000; Pathirana *et al.*, 2001; Yu *et al.*, 2005; <http://flybase.bio.indiana.edu>).

Durch RNA *in situ* Hybridisierung ließ sich die Expression von *loco* in Vorläuferzellen des PNS und in lateralen Gliazellen nachweisen (Abb. 3.35).

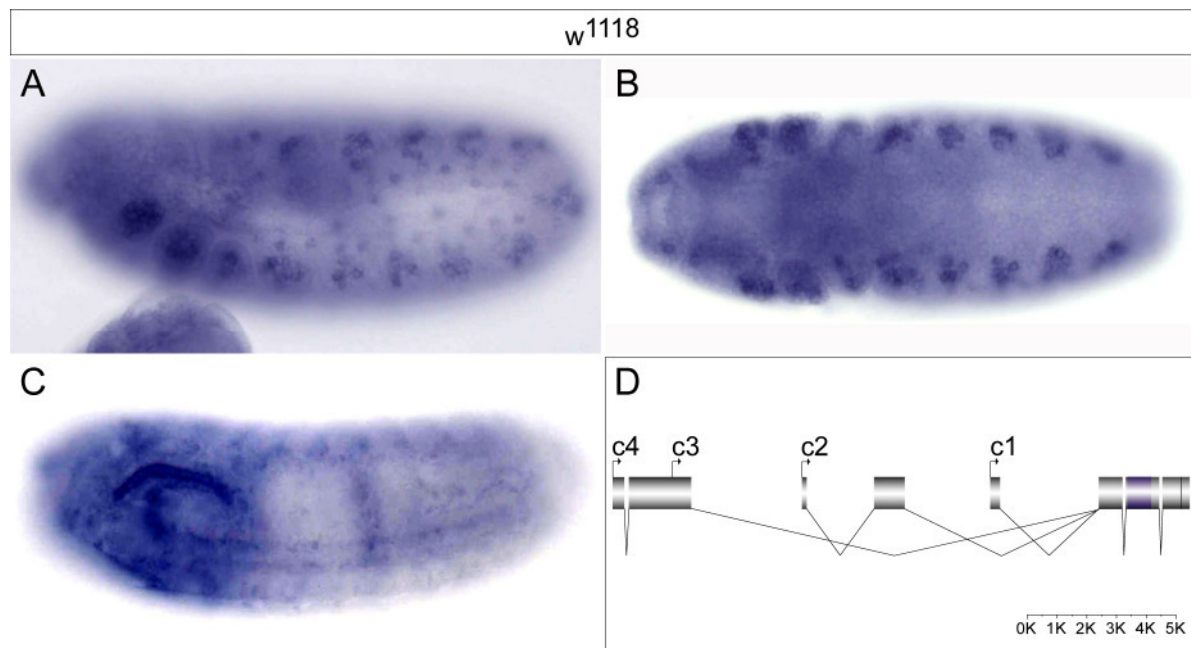


Abb. 3.35: *Loco*-RNA ist in Gliazellen des Embryos zu finden.

A - C Lichtmikroskopische Aufnahmen von Embryonen. Das mRNA-Transkriptionsmuster wurde durch Hybridisierung mit einer *antisense*-Sonde an *whole-mount* Embryonen bestimmt. Anterior ist links. **A - C** *Loco* wird in Vorläuferzellen des PNS (**A**, **B**) und im ventralen Nervenstrang exprimiert (**C**). **D** Genlocus von *loco* mit den Spleißvarianten der vier verschiedenen Isoformen. In blau dargestellt ist der Bereich, an den die RNA-Sonde bindet.

Für die weitere Analyse der Funktion von *loco* wurde auf einen RNA Interferenzvermittelten *knock down* des Genprodukts zurückgegriffen (Abb. 3.36).

Dafür wurden zwei verschiedene transgene Linien getestet, von denen die eine in dieser Arbeit etabliert (*loco*^{dsRNA#125}) und die andere käuflich erworben wurde (*loco*^{dsRNA#9248}, RNAi Stock Center Wien). Die Aktivierung dieser beiden Transgene mit dem Gal4-Treiber *repo* beeinträchtigte bei 25 °C die Vitalität von Larven mit dem Genotyp *repo* >> *loco*^{dsRNA#125} nicht, während Tiere mit dem Genotyp *repo* >> *loco*^{dsRNA#9248} während der pupalen Entwicklung starben. Larven beider Genotypen zeigten lediglich marginale Defekte der Augenimaginalscheibe, die sich in einer unregelmäßigen Verteilung der Gliazellen äußerten. Der Genotyp

repo >> *loco*^{dsRNA(#9248)} wies darüber hinaus auch leichte Veränderungen der migratorischen Front der Gliazellen auf (Abb. 3.36).

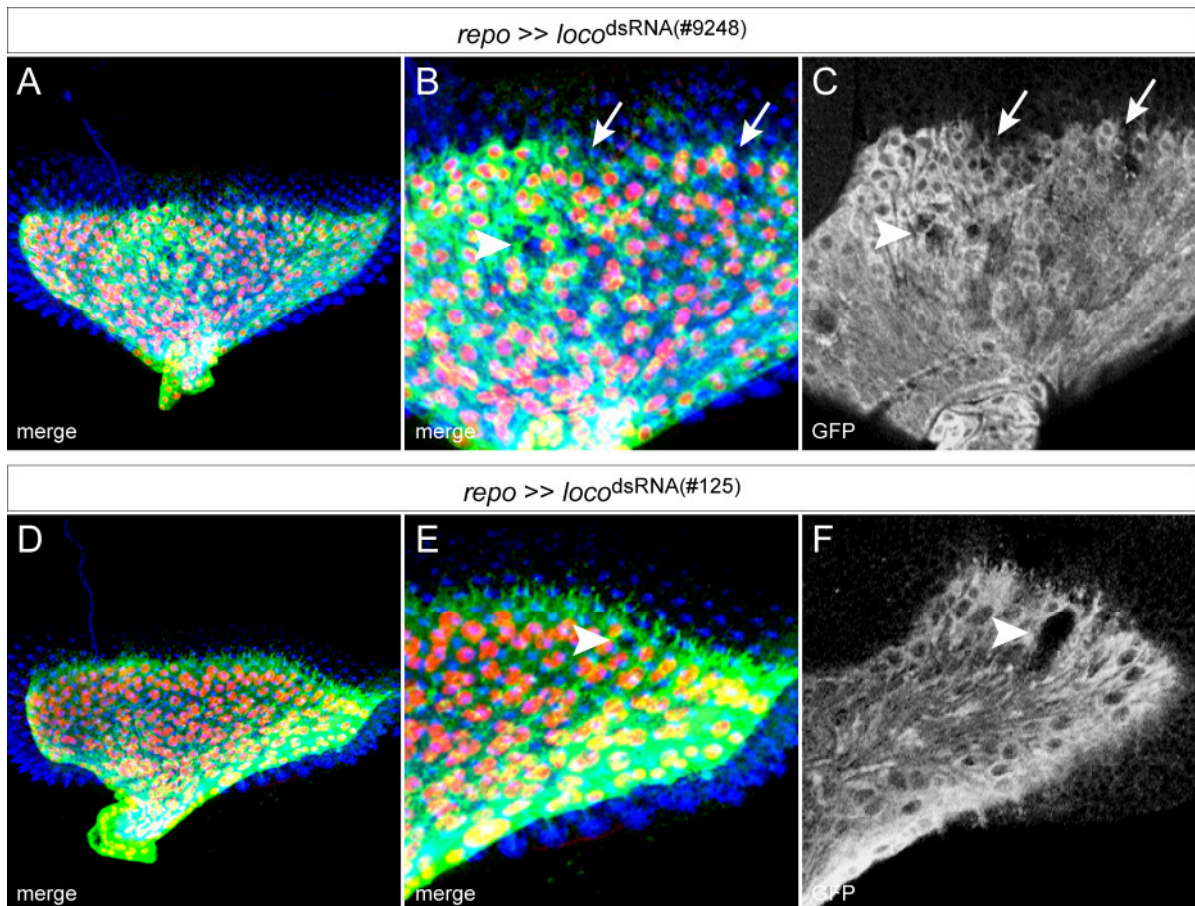


Abb. 3.36: Verringerung der Expression von *loco* in Gliazellen durch RNA Interferenzvermittelten *knock down*.

A - F Augenimaginalscheiben aus Larven des dritten Larvalstadiums wurden mit verschiedenen Antikörpern markiert. Die glialen Zellkerne sind rot (α -Repo), das Zytoplasma der Gliazellen grün bzw. weiss (α -GFP) und die Nervenzellen blau (α -HRP) dargestellt. Die Abbildungen in der **linken** und in der **mittleren Spalte** sind Projektionen konfokaler Bildstapel auf eine Ebene, während in der **rechten Spalte** einzelne konfokale Aufnahmen dargestellt sind. Anterior ist oben. **A - C** Die Gliazellen der Augenimaginalscheiben von Larven mit dem Genotyp *repo* >> *loco*^{dsRNA (#9248)} bildeten eine unregelmäßige migratorische Front (**B** und **C**, Pfeile). Außerdem waren Lücken zwischen den einzelnen Gliazellen vorhanden, die sowohl in einzelnen konfokalen Bildebenen (**C**, Pfeilkopf) als auch in einer Projektion des Bildstapels auf eine Ebene sichtbar waren (**C**, Pfeilkopf). **D - F** Larven mit dem Genotyp *repo* >> *loco*^{dsRNA (#125)} zeigten zwischen den einzelnen Gliazellen ebenfalls Lücken, die zwar bei Betrachtung der Projektion eines konfokalen Bildstapels sichtbar waren (**E**, Pfeilkopf), in einer einzelnen Ebene des Präparates jedoch deutlich größer wirkten (**F**, Pfeilkopf).

Die Expression von *loco*^{dsRNA} in Gliazellen resultierte also in leichten morphologischen Defekten. Da jedoch der Ausgangspunkt für die Untersuchungen an *loco* eine gesteigerte Expression in Gliomzellen war, könnte die Betrachtung des Phänotyps in einer *gain of function*-Situation weitere Erkenntnisse liefern.

3.3.2 *Pvf1*

Ein Gen, das im Expressionsprofil von schnell migrierenden Gliomzellen durch eine Funktionsreduktion aufgefallen war, ist PDGF-A. Das *Drosophila*-Homolog dieses Gens ist CG7103, das für Pvf1 codiert, einen Liganden von PVR.

Die RNA Interferenz-vermittelte Funktionsreduktion bei Larven mit dem Genotyp *repo >> CG7103^{dsRNA}* zeigte keine Beeinträchtigung der Vitalität. Dazu wurde der *repoGal4*-Treiber mit Insertion des Gal4-Transgens auf dem dritten Chromosom verwendet, und die Kreuzung bei 25 °C gehalten.

Trotzdem wurde im Folgenden die Morphologie der Augenimaginalscheiben dieser Larven untersucht. Es zeigten sich große Lücken zwischen den Gliazellen. Die einzelnen Zellen waren mitunter stark abgerundet und bildeten keine zusammenhängende Schicht (Abb. 3.37).

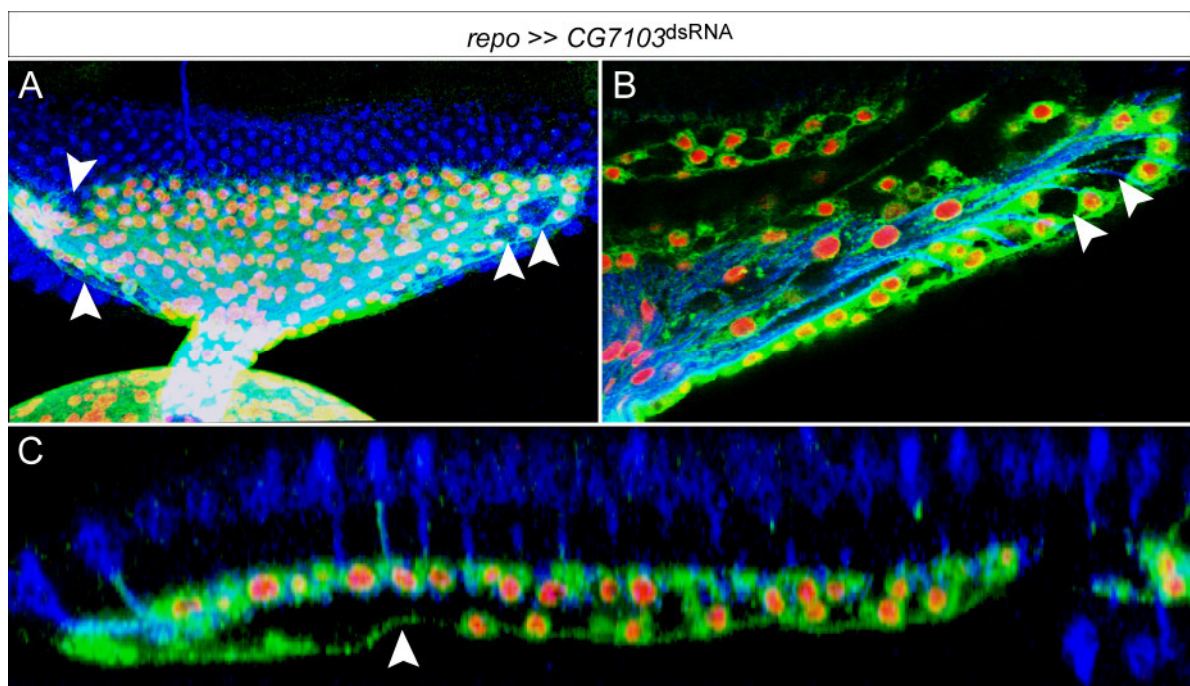


Abb. 3.37: Verringerung der Expression von CG7103 in Gliazellen durch RNA Interferenz-vermittelten *knock down*.

A - C Augenimaginalscheiben aus Larven des dritten Larvalstadiums wurden mit verschiedenen Antikörpern markiert. Die glialen Zellkerne sind rot (α -Repo), das Zytoplasma der Gliazellen grün bzw. weiss (α -GFP) und die Nervenzellen blau (α -HRP) dargestellt. **A** Projektion eines konfokalen Bildstapels auf eine Ebene. Die Augenimaginalscheibe aus einer Larve des Genotyps *repo >> CG7103^{dsRNA}* zeigte große Lücken zwischen den einzelnen Gliazellen (Pfeilköpfe). **B** Eine einzelne konfokale Schnittebene aus dem in **A** dargestellten Stapel. Hier zeigte sich, dass die Gliazellen abgerundet waren und nahezu keinen Kontakt zu den neben ihnen liegenden Zellen hatten (Pfeilköpfe). **C** Anhand der orthogonalen Rekonstruktion war zu erkennen, dass an manchen Stellen des Präparats fast keine migrierenden Glia vorhanden waren (Pfeilköpfe).

Pvf1 aktiviert den in Gliazellen aktiven PVR. Da die Inaktivierung von Pvf1 im Expressionsmuster von *repoGal4* zu Defekten der Gliazellen führte, kann davon ausgegangen werden, dass Pvf1 hier eine autokrine Funktion hat.

3.3.3 Untersuchung weiterer *Drosophila*-Homologe von in schnell migrierenden Gliomzellen herunterregulierten Genen

Im Folgenden wurden aus der Liste von Genen, die in schnell migrierenden Gliomzellen fehlreguliert sind, weitere Kandidatengene herausgesucht. Auswahlkriterien waren die Expression des betreffenden Gens im Nervensystem, nachgewiesen anhand von RNA *in situ* Hybridisierung, sowie eine potentielle Funktion des Genprodukts in Neuronen oder Gliazellen. Als Quellen wurden dazu die Datenbanken des Berkeley *Drosophila* Genomprojekts (<http://www.fruitfly.org>) und von Flybase (<http://flybase.bio.indiana.edu>) genutzt.

Tab. 3.6: Kandidatengene für weitere Untersuchung in *Drosophila* und Einfluss des *knock downs* in Gliazellen auf die Vitalität.

Die aufgelisteten humanen Gene waren in schnell migrierenden Gliomzellen herunterreguliert. Die Transkription der Transgene mit zwei Kopien des Treibers *repoGal4* sollte zeigen, ob die RNA Interferenz-vermittelte Verringerung der Expression der entsprechenden Genprodukte die Vitalität der Fliegen beeinflusste.

v = etwa 50 % aller geschlüpften Fliegen exprimierten die UAS-Transgene im Muster des Gal4-Treibers; † = keine Fliege, deren Genom die Kombination aus Gal4- und UAS-Transgen enthielt, erreichte das adulte Stadium.

Gen (<i>H. sapiens</i>)	CG / Gen (<i>D. melanogaster</i>)	Expression	<i>repoGal4</i> (II + III) >> UAS dsRNA	
			25 °C	29 °C
<i>proprotein convertase subtilisin / kexin type 3</i>	CG10772 / <i>furin</i>	ZNS (<i>in situ</i> -Hybridisierung, A. Jeibmann)	v	v
<i>integrin, alpha 6</i>	CG1771 / <i>multiple edematous wings</i>	ZNS (Wehrli <i>et al.</i> , 1993)	v	v
<i>msh homeo box homolog 2</i>	CG1897 / <i>drop</i>	ZNS (D'Alessio und Frasch, 1996)	v	v
<i>lipaseA</i>	CG31871	ZNS (<i>in situ</i> -Hybridisierung, A. Jeibmann)	v	†
<i>protein kinase C beta</i>	CG6622 / <i>pkc^{53E}</i>	ZNS (Schaeffer <i>et al.</i> , 1989)	v	v

Die Kandidatengene wurden durch RNA Interferenz mit dem gliaspezifischen Treiber *repoGal4* in Gliazellen ausgeschaltet und der Effekt auf die Vitalität untersucht (Tab. 3.6). Da bei einer Temperatur von 25 °C keines der Transgene zu Letalität führte, wurden die entsprechenden Kreuzungen bei 29 °C gehalten. Bei dieser Temperatur war die Expression eines Transgens letal für die Versuchstiere. Es handelte sich dabei um *CG31871^{dsRNA}* (Tab. 3.6).

CG31871 war aufgrund von RNA *in situ*-Hybridisierungen von Interesse, die ein Signal im ZNS von Embryonen zeigten (A. Jeibmann, unveröffentlichte Daten). Der *knock down* von *CG31871* in Gliazellen resultierte in Defekten insbesondere der migrierenden Glia. Diese waren unregelmäßig in den Augenimaginalscheiben der untersuchten Larven verteilt, erschienen zum Teil abgerundet und hatten praktisch keine Kontakte zu den umliegenden Zellen (Abb. 3.38).

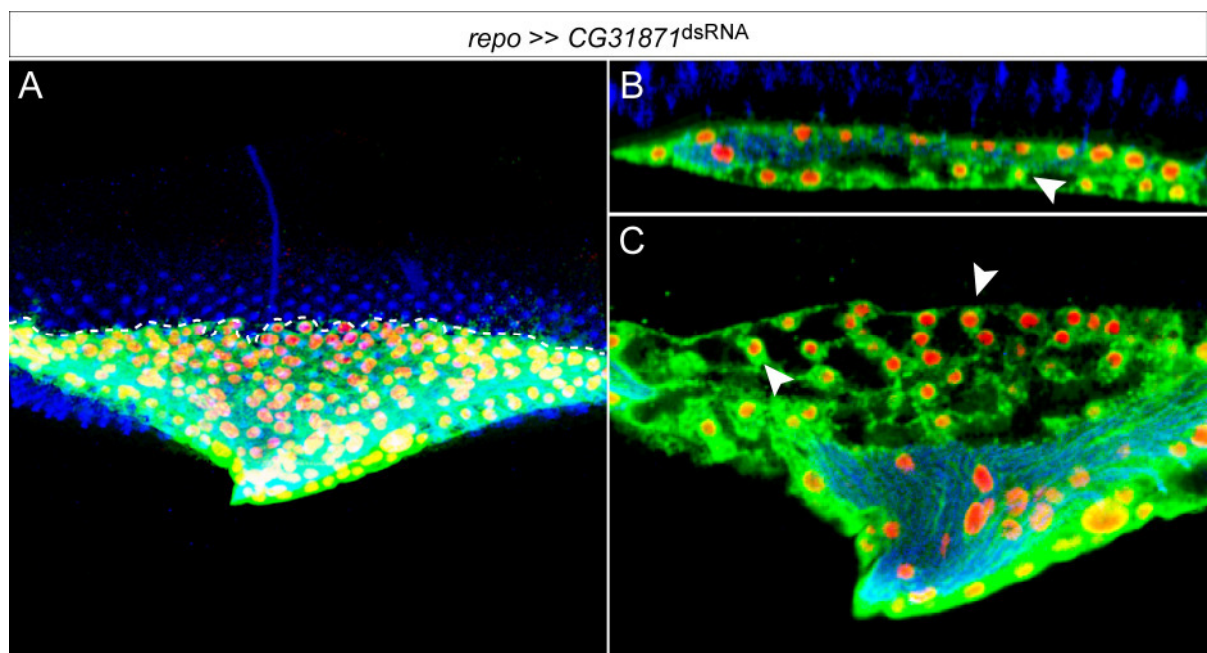


Abb. 3.38: Verringerung der Expression von *CG31871* in Gliazellen durch RNA Interferenz-vermittelten *knock down*.

A - C Immunhistochemische Färbung von Augenimaginalscheiben aus L3-Larven. In den Präparaten sind die Zellkerne der Gliazellen mit α -Repo (in rot dargestellt), das Zytoplasma der Gliazellen mit α -GFP (grün) und die Nervenzellen mit α -HRP (blau) markiert. Bei Abbildung **A** handelt es sich um eine Projektion eines konfokalen Bildstapels auf eine Ebene, bei **B** um eine orthogonale Rekonstruktion desselben, und bei **C** um ein konfokales Einzelbild. In **A** und **C** ist anterior oben, und in **B** ist apikal oben. **A** Bei Larven mit dem Genotyp *repo >> CG31871^{dsRNA}* war die migratorische Front der Gliazellen in der Augenimaginalscheibe unregelmäßig (**A**, gestrichelte Linie). **B, C** Insbesondere die migrierenden Gliazellen erschienen stark abgerundet (Pfeilköpfe).

Da der RNA Interferenz-vermittelte Funktionsverlust zu offensichtlichen Defekten der Augenimaginalscheiben führte, wurden im Folgenden die Auswirkungen des

Verlustes der natürlichen Genfunktion von CG31871 betrachtet. Der ubiquitäre Funktionsverlust von CG31871 resultierte in Letalität während des zweiten Larvenstadiums. Allerdings waren im Nervensystem von Embryonen lediglich marginale Defekte zu sehen. Die Struktur des Bauchmarks und der Neurone des PNS war normal, und auch die Verteilung und Anzahl der Glia zeigte keine nennenswerten Abweichungen von ihren normalen Positionen (Abb. 3.39).

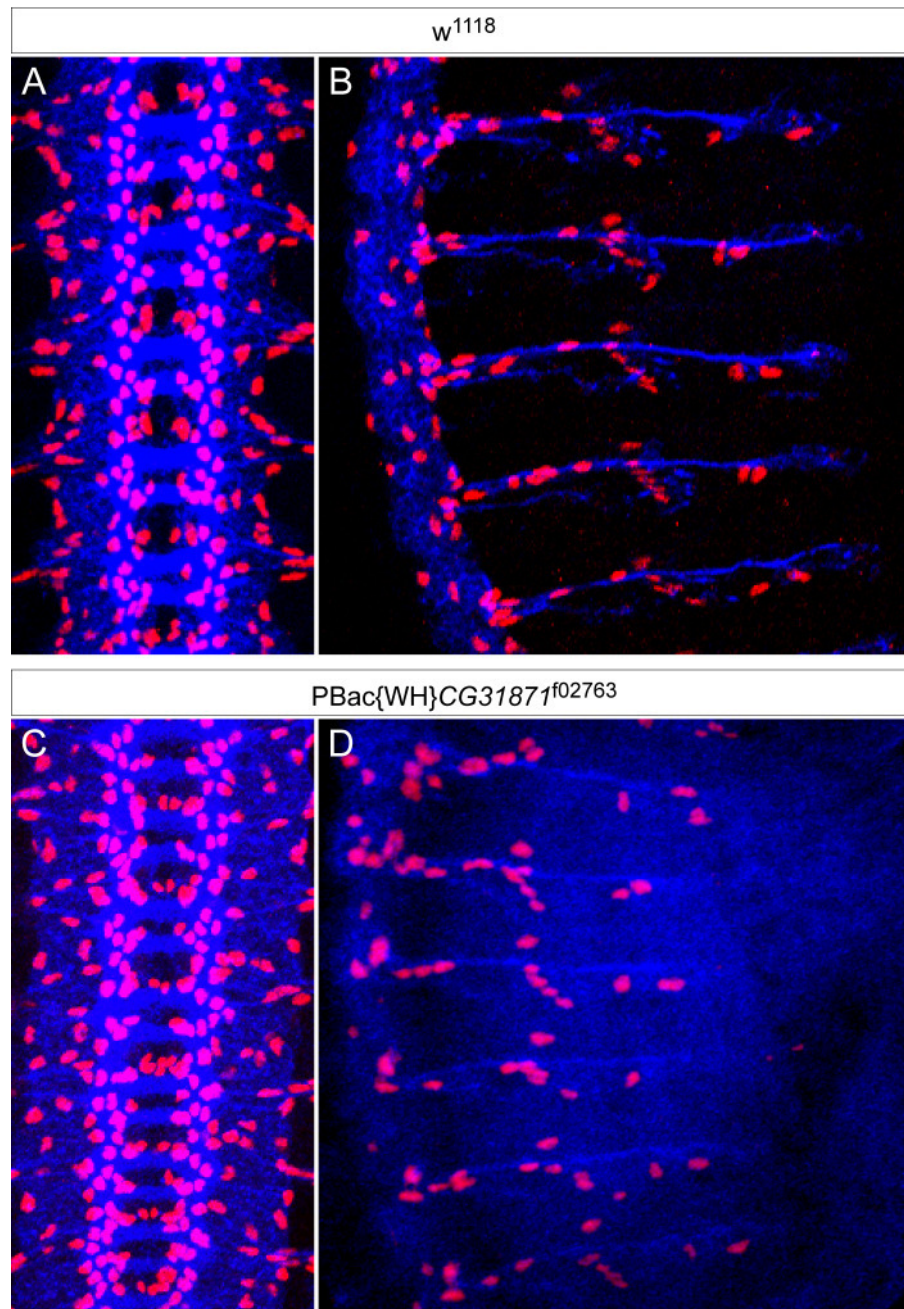


Abb. 3.39: Phänotyp des Nervensystems von CG31871-mutanten Embryonen.

A - D Immunhistochemische Färbung von Embryonen aus Stadium 14. Die Zellkerne der Gliazellen sind rot dargestellt (α -Repo) und die Neurone blau (α -HRP). Die Abbildungen sind Projektionen konfokaler Bildstapel. Anterior ist oben. **A, B** Wildtyp. **C, D** Embryonen der Linie PBac{WH}CG31871^{f02763} wiesen marginale Defekte des Nervensystems auf.

Aufgrund seiner potentiellen Domänenstruktur codiert CG31871 wahrscheinlich für eine Triacylglycerollipase und wäre damit am Lipidmetabolismus beteiligt. Die hier gezeigten morphologischen Defekte könnten also auf Störungen im Energiehaushalt der betroffenen Zellen zurückzuführen sein, so dass CG31871 als Kandidat für weitere Untersuchungen wenig attraktiv erscheint.

4 Diskussion

In dieser Arbeit sollte zunächst die Eignung von *Drosophila* als Modell zur Erforschung humaner Gliome analysiert werden. Dafür wurden die morphologischen Veränderungen, die aus der genetischen Manipulation der Versuchstiere entstanden, auf Kennzeichen humaner Tumore hin untersucht. Darüber hinaus wurde analysiert, inwieweit die aus der Fehlregulation der untersuchten Signalkaskaden entstandenen Defekte mit den Eigenschaften übereinstimmen, die für diese Signalwege in der Literatur beschrieben sind.

4.1 Mechanismen der Tumorgenese beim Menschen und bei *Drosophila*

Die typischen Kennzeichen von malignen Tumoren des Menschen sind die Autonomie von Wachstumsfaktoren, Gleichgültigkeit gegenüber wachstumshemmenden Signalen, Resistenz gegen apoptotische Signale, unbegrenztes replikatives Potential, Angiogenese, Migration und Invasion (Hanahan und Weinberg, 2000). Jede dieser Eigenschaften steht für einen außer Kraft gesetzten Kontrollmechanismus der Zelle gegen maligne Entartung. Aberrationen in nur einem einzigen Gen sind meist nicht ausreichend zur Induktion eines Tumors (Baak *et al.*, 2003; Beckman und Loeb, 2005), da der Verlust eines regulatorischen Elements durch andere Mechanismen kompensiert werden kann (Dash und El-Deiry, 2004). So weisen die meisten soliden Tumore des Menschen drei oder mehr genetische Defekte auf (Vogelstein und Kinzler 1993; Cahill *et al.*, 1999). Auch gliale Tumore des ZNS zeigen stets mehrere zelluläre Veränderungen (Sehgal, 1998). Die Entwicklung eines malignen Tumors ist meistens ein gradueller Prozess, der sich über verschiedene Zwischenschritte entwickelt (Bernards und Weinberg, 2002). Beispielsweise ist oftmals verstärkte Proliferation und abnorme Differenzierung von Zellen zu beobachten, noch bevor tatsächlich ein maligner Tumor entsteht (Duesberg und Li, 2003, Delaval und Birnbaum, 2007). Die Fähigkeit zu invasivem Wachstum hingegen entsteht meist erst später und kann als Zeichen für die Progression eines Tumors gesehen werden (McGregor *et al.*, 2002).

In *D. melanogaster* können die wesentlichen Kennzeichen von humanen Tumorzellen kopiert werden. Dazu gehören die Unabhängigkeit der Tumorzellen von Wachstumsfaktoren, Resistenz gegenüber Antiproliferationssignalen und Apoptose sowie Invasion und Bildung von Metastasen (Brumby und Richardson, 2005).

Wie auch bei humanen Tumoren führt eine Akkumulation von genetischen Aberrationen in *Drosophila* zu einer Verstärkung der zellulären Defekte. So konnte beispielsweise durch eine Kombination aus gesteigerter Aktivität von Ras und einem Funktionsverlust von Scrib in einzelnen Zellen unter Kontrolle des *eyeless*-Promotors die Bildung von Metastasen induziert werden. Die entsprechenden Zellen konnten Basalmembranen degradieren und in andere Gewebe metastasieren (Pagliarini und Xu, 2003). Auch in dieser Arbeit waren die morphologischen Defekte stärker, wenn simultan zwei Gene fehlreguliert wurden. Ein Beispiel ist die Struktur der optischen Loben, die bei der ektopischen Regulation eines einzelnen Gens praktisch keine Defekte zeigte, während die Fehlregulation von zwei Genen zu mitunter deutlich ausgeprägten Gewebewucherungen führte. Ebenso konnte ektopische Migration von Gliazellen durch die simultane Fehlregulation von *ltop* mit *PI3K^{92E}* oder *Akt1* induziert werden. Die Zellen bewegten sich dabei in anderen Bereichen des Gewebes als im Wildtyp und migrierten darüber hinaus über weitere Strecken.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass zwei typische Eigenschaften von malignen Tumoren, hyperplastisches Gewebewachstum infolge gesteigerte Proliferation und Migration von Zellen, in *Drosophila* kopiert werden konnten. Es wurde jedoch nicht untersucht, ob auch weitere Eigenschaften maligner Neoplasien auftraten.

4.2 Signalkaskaden mit Einfluss auf die Tumorgenese

Die Entstehung von Neoplasien ist mit verschiedenen genetischen Defekten assoziiert. In vielen Tumoren wird beispielsweise eine verstärkte Aktivität des EGFR, des PDGFR oder von Effektoren dieser Rezeptoren gefunden. Dazu gehören Ras, PI3K und STAT, sowie Src und PLC γ (Yarden und Sliwkowski, 2001; Hynes und Lane, 2005).

4.2.1 Auswirkungen der gliaspezifischen ektopischen Expression von EGFR und PVR

Eine Gemeinsamkeit der ektopischen Expression von λ_{top} und λ_{pvr} ist der migratorische Phänotyp, der sich in der Augenimaginalscheibe zeigt. Abgesehen davon wirkt sich die Expression von λ_{top} und λ_{pvr} jedoch unterschiedlich auf die betroffenen Zellen aus. Während bei Larven mit dem Genotyp $repo \gg \lambda_{top}$ ein deutlicher Anstieg der Gliazellzahl zu verzeichnen war, führte die ektopische Expression von λ_{pvr} in Gliazellen zu einer Verringerung dieser Zellen.

Sowohl der EGFR als auch der PVR nehmen während der normalen Entwicklung Einfluss auf die Zellmotilität, beispielsweise während der Migration der Border Cells (Duchek *et al.*, 2001). Darüber hinaus ist der EGFR während der Entwicklung an der Kontrolle der Zellproliferation beteiligt, so etwa in der Augenimaginalscheibe (Garoi *et al.*, 2005; Umetsu *et al.*, 2006). Analog dazu führt gesteigerte Aktivität von EGFR zu neoplastischem Gewebewachstum (Politi *et al.*, 2006).

Eine entscheidende Funktion von PVR ist seine Beteiligung an der apikobasalen Polarisation von Epithelzellen durch die Stimulation der F-Aktin-Akkumulation (Rosin *et al.*, 2004). So führte ektopische Expression von λ_{pvr} in Flügelimaginalscheiben zu Phänotypen, die mit den aus dem Funktionsverlust von Scrib oder Dlg entstehenden Defekten vergleichbar sind. Die Zellen zeigten einen Verlust der Polarität und die Scheiben waren infolge gesteigerter Proliferation um ein vielfaches größer als im Wildtyp. Dabei scheint die vermehrte Zellteilung ein sekundärer Effekt zu sein, der sich aus dem Verlust der Zellpolarität ergibt (Bilder *et al.*, 2000). Beispielsweise kann eingeschränkte Aktivität von Scrib oder Dlg zu einem Verlust der Zellpolarität führen, ohne dass gesteigerte Proliferation erfolgt (Grzeschik *et al.*, 2007). Analog dazu könnte also die ektopische Expression von λ_{pvr} mit dem Gal4-Treiber $repo$ zu Störungen der Zellpolarität führen, ohne dass eine gesteigerte Proliferation erfolgt.

4.2.1.1 Signalspezifität von Rezeptortyrosinkinasen

Die Gruppe der Rezeptortyrosinkinasen, zu der auch EGFR und PVR gehören, umfasst bei *Drosophila* 17 verschiedene Vertreter (Amit *et al.*, 2007), die prinzipiell alle die gleichen zellulären Signalwege aktivieren können. *In vivo* ist die Aktivierung

von RTKs jedoch immer an bestimmte intrazelluläre Effektoren gekoppelt. Die Signaltransduktion durch RTKs wird somit zeit- und gewebespezifisch genau kontrolliert und scheint auch bei ektopischer Aktivierung der Rezeptoren bestimmten regulatorischen Mechanismen zu unterliegen.

Unter physiologischen Bedingungen ist ein zentraler Mechanismus der Signalspezifität durch RTKs die kontrollierte Aktivierung der Rezeptoren durch ihre Liganden (Schnepp *et al.*, 1996; Urban *et al.*, 2002; Donaldson *et al.*, 2004; Shilo, 2005). In dem in dieser Arbeit gewählten Modell erfolgte jedoch eine Liganden-unabhängige Aktivierung der Rezeptoren. Trotzdem führte beispielsweise die ektopische Expression von *λhtl* stets zu einer drastisch erhöhten Proliferation der entsprechenden Zellen, während eine derartige Steigerung der Zellteilungen mit *λtop* nie erreicht wurde. Trotz der ektopischen Liganden-unabhängigen Rezeptoraktivierung scheint also eine Präferenz zur Förderung bestimmter intrazellulärer Signalwege zu existieren.

Es gibt jedoch verschiedene Mechanismen, die unabhängig von Liganden zur Signalspezifität beitragen. Dazu gehört die Induktion verschiedener zellulärer Antworten durch die Veränderung der Signaldauer oder Signalstärke. So resultiert beispielsweise in PC12-Zellen die transienten Anregung der MAPK in verstärkter zellulärer Proliferation, während eine anhaltende Aktivierung zur Translokation der MAPK in den Nukleus und neuronaler Differenzierung führt. Durch die Dauer der MAPK-Aktivität werden also differenzierte zelluläre Reaktionen ausgelöst (Silar *et al.*, 1997; Qiu *et al.*, 2004; Karkoulias und Flordellis, 2007).

Mitunter werden Komponenten von Signalkaskaden auch nur in bestimmten Zellen exprimiert. Ein solches Beispiel bietet die Aktivierung intrazellulärer Effektoren durch LET-23, eine Rezeptortyrosinkinase aus *Caenorhabditis elegans*. Während LET-23 in verschiedenen Geweben die Ras/MAPK-Kaskade stimuliert (Chamberlin und Sternberg, 1994; Moghal und Sternberg, 2003), erfolgt in der Keimbahn die Aktivierung von Lfe-1 und Lfe-2 (Let-23 fertility effector 1 und 2), die restriktiv nur dort exprimiert werden (Clandinin *et al.*, 1998).

Darüber hinaus sind sich entwickelnde Gewebe *in vivo* oft vielen unterschiedlichen extrazellulären Signalen ausgesetzt, welche die Aktivierung verschiedener Rezeptoren bewirken. Synergistische oder antagonistische Effekte zwischen Signalwegen führen dabei zur Induktion spezifischer zellulärer Reaktionen (Riese *et al.*, 1997; Rohrbaugh *et al.*, 2002). Ein Beispiel für eine antagonistische

Wechselwirkung zwischen Signalwegen ist die Interaktion zwischen EGFR und Notch. Während der Entwicklung der Photorezeptorneurone stimuliert Notch die Expression des transkriptionellen Repressors Yan, wohingegen EGFR über Pointed die Expression von Yan inhibiert (Rohrbaugh *et al.*, 2002).

Die aus der ektopischen Rezeptoraktivierung in Gliazellen resultierenden Phänotypen ergeben sich also wahrscheinlich durch die Interaktion mit den bereits natürlicherweise in diesen Zellen agierenden Signalwegen sowie durch eine unterschiedliche Signalstärke und -dauer.

4.2.2 Die simultane Aktivierung der Ras- und PI3K/Akt-Signalkaskaden stimuliert die Proliferation

Die Signaltransduktion durch Ras wird in der Literatur vor allem mit der Regulation der Proliferation von Zellen in Zusammenhang gebracht (Hill und Treisman, 1995), während die PI3K/Akt-Signalkaskade das Wachstum von Zellen, Resistenz gegenüber Apoptose, Invasion und Migration vermittelt (Vivanco und Sawyers, 2002; Shaw und Cantley, 2006; Stambolic und Woodgett, 2006). In dieser Arbeit resultierte die simultane Deregulation von *ras*^{64B} mit *λtop*, *PI3K*^{92E} oder *Akt1* in allen untersuchten Augenimaginalscheiben in einer Zunahme der glialen Proliferation. Im Gegensatz dazu führte die Expression von *ras*^{64B} alleine nicht nur zur Stimulation der glialen Proliferation, sondern auch zu ektopischer Migration.

Ras aktiviert verschiedene Effektoren, darunter Raf- und PI3-Kinasen (Ulkü und Der, 2003; Shaw und Cantley, 2006). Dabei stabilisiert Ras die Lokalisation von PI3K nahe der Plasmamembran und aktiviert die katalytische Untereinheit von PI3K, p110 (Rodriguez-Viciano *et al.*, 1994; Orme *et al.*, 2006). Die aus der alleinigen ektopischen Expression von *ras*^{64B} resultierenden Phänotypen könnten sich also einerseits aus der Raf-vermittelten Aktivierung der MAPK-Signalkaskade ergeben, und andererseits aus der Stimulation des PI3K/Akt-Signalwegs durch Ras.

Bei der Aktivierung der PI3K/Akt-Signalkaskade durch Expression von *λtop*, *PI3K*^{92E} oder *Akt1* in Kombination mit der ektopischen Expression von *ras*^{64B} wurde in keinem Fall ektopische Migration von Gliazellen beobachtet. Es scheint also Mechanismen zu geben, die wahrscheinlich aufgrund einer Dosisabhängigkeit bei der direkten Aktivierung der Ras- und PI3K/Akt-Signalkaskaden einen anderen Phänotyp

verursachen als bei der alleinigen Stimulation von Ras und der daraus resultierenden Ras-vermittelten Aktivierung der PI3K/Akt-Signalkaskade. Beispielsweise konnte in einem transgenen Mausmodell gezeigt werden, dass die simultane Aktivierung von Akt1 und ErbB2, einem Aktivator von Ras, zu deutlich weniger Metastasen führte als die Expression von ErbB2 alleine (Hutchinson *et al.*, 2004).

4.2.3 Die Aktivierung der PI3K/Akt-Signalkaskade stimuliert die Migration

Die simultane Aktivierung von *λtop* zusammen mit *PI3K^{92E}* oder *Akt1* führte im Vergleich zu den Phänotypen, die aus der Expression der einzelnen Transgene resultierten, zu einem deutlichen Anstieg der ektopischen Migration von Gliazellen in den untersuchten Augenimaginalscheiben.

Bei Säugetieren gibt es Hinweise auf eine positive Beteiligung von Akt an der Migration von Zellen. So aktiviert Akt die Expression der Matrix-Metalloproteinase MMP-9, deren Funktion die Degradation der extrazellulären Matrix ist (Kim *et al.*, 2001). Ein weiteres Ziel der Regulation von Akt ist ACAP1 (ADP-Ribosylation Factor Directed GTPase-Activating Protein 1), das durch Akt phosphoryliert wird und an dem vesikulären Transport von Integrin β1 zur Plasmamembran beteiligt ist (Li *et al.*, 2005). Darüber hinaus bindet APE (Akt Phosphorylation Enhancer) nach Phosphorylierung durch Akt an das Aktinzytoskelett und stimuliert die Bildung von Lamellipodien (Enomoto *et al.*, 2005).

Im Gegensatz zu diesen Forschungsergebnissen gibt es jedoch auch Publikationen, die eine inhibitorische Funktion von Akt bei der Zellmigration beschreiben. So blockiert die ektopische Expression von aktiviertem Akt in Brustkrebszelllinien und Epithelzellen die Migration der Zellen in Matrigel (Irie *et al.*, 2005; Yoeli-Lerner *et al.*, 2005). Als möglicher Mediator der durch Akt inhibierten Migration wurde NFAT (Nuclear Factor of Activated T cells) vermutet (Jauliac *et al.*, 2002). Ein weiterer Mechanismus zur Inhibition der Migration durch Akt könnte über ERK (Extracellular Signal Regulated Kinase) vermittelt werden, das durch Akt blockiert wird (Irie *et al.*, 2005).

Diese gegensätzlich erscheinenden Ergebnisse sind wahrscheinlich auf Isoform-spezifische Funktionen von Akt zurückzuführen. Bei Säugetieren gibt es drei

Akt-Gene, die als Akt1, Akt2 und Akt3 bezeichnet werden (Staal, 1987; Murthy *et al.*, 2000). Dabei scheinen Akt1 und Akt2 konträre Einflüsse auf das Migrationsverhalten von Zellen auszuüben, wobei Akt1 eher inhibitorisch und Akt2 vor allem stimulierend auf die Motilität wirkt (Toker und Yoeli-Lerner, 2006).

In *Drosophila* wurde bisher nur ein Akt codierendes Gen identifiziert, das zu dem humanen Akt1 die größte Homologie hat. In der Literatur wird *Drosophila*-Akt1 vor allem mit einer regulatorischen Funktion bei der Zell- und Organgröße in Zusammenhang gebracht (Verdu *et al.*, 1999). Da aber die ektopische Expression von *Akt1* in Kombination mit λtop oder $PI3K^{92E}$ die Migration deutlich stärker stimulierte als die ektopische Expression von λtop oder $PI3K^{92E}$ alleine, ist eine Beteiligung von *Akt1* an der Zellmotilität nahe liegend.

4.2.4 Die Funktion von PTEN

Die RNA Interferenz-induzierte Verringerung der Expression von PTEN unter Kontrolle des Gal4-Treibers *repo* ergab eine Abnahme der Gliazellzahl in der Augenimaginalscheibe und den peripheren Nerven.

Der Funktionsverlust von PTEN in humanen Tumoren wird vor allem mit einer Verringerung der Apoptose und einer Stimulation der zellulären Proliferation assoziiert, zwei Eigenschaften, die aus dem Verlust des regulatorischen Einflusses von PTEN auf den Zellzyklus resultieren (Sulis und Parsons, 2003). Beispielsweise hemmt die gesteigerte Expression von PTEN in Gliomzellen den Zellzyklus. Die Suppression der Proliferation scheint sich dabei aus der Inhibition der G₁/S-Phasentransition zu ergeben (Furnari *et al.*, 1998; Cheney *et al.*, 1998). Analog dazu führt bei immortalisierten Fibroblastenzellen der Funktionsverlust von PTEN zu erhöhter Resistenz gegenüber Apoptose (Stambolic *et al.*, 1998). Auch im Mausmodell wird durch den Funktionsverlust von PTEN eine erhöhte Zellproliferation induziert (Suzuki *et al.*, 1998).

PTEN ist eine Phosphatase mit dualer Spezifität, die zwischen dem Menschen und *Drosophila* konserviert ist (Gao *et al.*, 2000). Eine Funktion der PTEN-Phosphatase sowohl in *Drosophila* als auch im Menschen ist die Dephosphorylierung des *second messenger* PIP3 (Maehama and Dixon, 1998). PTEN steht also der Funktion der PI3K antagonistisch gegenüber und spielt somit eine wichtige Rolle bei der

Regulation der PI3K-vermittelten Signaltransduktion. In *Drosophila* ist ein wichtiger Aktivator von PI3K der Insulinrezeptor (InR).

Während die Insulinkaskade in Säugetieren vor allem den Blutzuckerspiegel reguliert (Saltiel und Kahn, 2001), besteht die Funktion dieses Signalwegs in *Drosophila* in der Stimulation von zellautonomen Größenwachstum (Butler und Le Roith, 2001). Mutationen im InR, p110 oder Akt verringern das Größenwachstum (Böhni *et al.*, 1999; Brogiolo *et al.*, 2001; Rintelen *et al.*, 2001), während hypomorphe PTEN-Mutationen eine Größenzunahme der gesamten Fliege verursachen, die vor allem durch vergrößerte Zellen verursacht wird (Brogiolo *et al.*, 2001; Oldham *et al.*, 2002). Bei der RNA Interferenz-induzierten Deregulation von *PTEN* in dieser Arbeit schien die Schicht aus Gliazellen um die Axone der peripheren Nerven und die Photorezeptoraxone herum dicker zu sein als im Wildtyp. Da aber gleichzeitig eine Reduktion der Zellzahl beobachtet wurde, ist es wahrscheinlich, dass dieses Phänomen durch eine Vergrößerung der einzelnen Zellen entsteht.

Darüber hinaus hat PTEN in *Drosophila*, ebenso wie im Menschen, Einfluss auf die Proliferation. PTEN-defiziente Klone im Komplexauge der adulten Fliege enthalten etwa doppelt so viele Ommatidien wie die benachbarten Twinspots (Goberdhan *et al.*, 1999). Allerdings bleibt dabei unklar, weshalb in dieser Arbeit die Verringerung der Expression von *PTEN* in einer verringerten Anzahl glialer Zellen resultiert. Eine mögliche Erklärung wäre, dass die Deregulation von PTEN zur Induktion von Apoptose in den betroffenen Zellen führt, um eine Störung der Gewebeintegrität zu verhindern.

4.3 Interaktionen zwischen ektopisch migrierenden Gliazellen und Neuronen

Durch die Deregulation des PI3K/Akt-Signalwegs konnten die Gliazellen der Augenimaginalscheibe zu ektopischer Migration apikal der Scheibe stimuliert werden. Dabei kolokalisierten die ektopisch migrierenden Zellen stets mit HRP-positiven Strukturen.

Während der Entwicklung von *Drosophila* gibt es eine enge Interaktion zwischen Neuronen und Gliazellen, wobei in vielen Fällen Neurone den migrierenden Gliazellen als Substrat dienen. So nutzen beispielsweise während der

Embryonalentwicklung von *Drosophila* die peripheren Gliazellen die Motoaxone, um von der Übergangszone zwischen ZNS und PNS weiter in die Peripherie zu migrieren (Sepp und Auld, 2003; Edenfeld *et al.*, 2007). Auch während der Entwicklung der optischen Loben im dritten Larvenstadium sind die Gliazellen zur Migration auf direkte Interaktion mit Neuronen angewiesen (Dearborn und Kunes, 2004). Infolge der ektopischen Regulation des PI3K/Akt-Signalwegs könnten also die Gliazellen den Bolwig-Nerv als Substrat zur Migration nutzen.

Gliazellen haben auch eine wichtige Funktion bei der korrekten axonalen Wegfindung. Bei der Musterbildung des ventralen Nervenstrangs im *Drosophila*-Embryo sezernieren die Mittellinienglia Netrine, die ein attraktives Signal für die zur Mittellinie hinwachsenden kommissuralen Axone darstellen. Der Funktionsverlust von Netrin führt zu Defekten in der Kommissurbildung (Harris *et al.*, 1996). Auch in der Augenimaginalscheibe bestimmt die Position der Gliazellen die Richtung, in welche die Photorezeptoraxone projizieren. In *gilgamesh*-mutanten Larven migrieren beispielsweise Gliazellen weiter als im Wildtyp nach anterior, wobei im Folgenden die Axone der Photorezeptorneurone ebenfalls nach anterior in Richtung der ektopisch migrierenden Glia projizieren (Hummel *et al.*, 2002). Ein sekundärer Effekt der Deregulation des PI3K/Akt-Signalwegs könnte also eine falsche Projektion der Photorezeptoraxone sein, die sich an den ektopisch migrierenden Gliazellen orientieren.

4.3.1 Die Funktion der Carpet Glia bei der Migration anderer Gliazellen

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Ausprägung des migratorischen Phänotyps bei ektopischer Genexpression von der Lage und der Morphologie der Carpet Glia abhängig ist. Die Carpet Glia regulieren die Migration der Gliazellen, die sich aus dem optischen Stiel in die Augenimaginalscheibe bewegen. Diese Gliazellen beenden ihre Fortbewegung entlang einer Grenze, die sich etwa drei bis vier Reihen von Photorezeptorneuronen posterior der morphogenetischen Furche befindet und die mit dem anterioren Rand der Carpet Glia übereinstimmt (Silies *et al.*, 2007).

Die Deletion der Carpet Glia resultiert in verspäteter Termination der glialen Migration. Dabei migrieren die Gliazellen zwar normal auf der basalen Seite der Augenscheibe, jedoch beenden sie ihre Migration nicht in dem differenzierten Teil der Scheibe, sondern anterior der morphogenetischen Furche (Silies *et al.* 2007). In dieser Arbeit wurde jedoch die Carpet Glia nicht deletiert, vielmehr bildete diese nur einige dünne Ausläufer basal in der Scheibe. Trotzdem zeigten die migrierenden Gliazellen keine Migrationsdefekte, sondern beendeten ihre Fortbewegung entlang der gleichen Grenze, die auch von den Gliazellen in wildtypischen Augenimaginalscheiben respektiert wird. Die Anwesenheit der Carpet Glia scheint also ausreichend zu sein, um die Migration der übrigen Glia an der richtigen Stelle zu terminieren. In einigen Präparaten befand sich die Carpet Glia apikal in der Augenimaginalscheibe. In diesen Fällen war die ektopische Migration von Gliazellen in diesen Bereich besonders ausgeprägt. Die Carpet Glia könnte also den übrigen Gliazellen auch die Richtung der Migration vorgeben.

4.4 Medikamenten-induzierte Inhibition ektopisch exprimierter Gene

Durch die ektopische Regulation verschiedener Gene und Genkombinationen konnten zwei typische Kennzeichen von Tumoren induziert werden, gesteigerte Proliferation und verstärkte Migration. Im Folgenden wurde getestet, ob diese morphologischen Veränderungen durch die Applikation von Medikamenten, die zur Behandlung von humanen Tumorpatienten entwickelt wurden, inhibiert werden können.

4.4.1 *Drosophila* als Modell für Medikamententests

Bei der Verwendung von *Drosophila* als Modell für Medikamententests stellt sich die Frage, ob *Drosophila* auf chemische Substanzen, die zur Behandlung humaner Krankheiten entwickelt wurden, ebenfalls mit einer Reduktion der morphologischen Defekte reagiert. Ein solcher Ansatz wurde beispielsweise für *bubblegum*-mutante Fliegen beschrieben, bei denen eine altersabhängige Zunahme des axonalen

Durchmessers in der Lamina und eine Degeneration der Zellkörper in der Retina zu beobachten ist. Das *bubblegum*-Gen stellt das einzige *Drosophila*-Homolog der humanen VLCFA-CoA-Synthetase (Very Long Chain Fatty Acids) dar, deren Funktionsverlust im Menschen Adrenoleukodystrophie auslöst. Bei dieser Krankheit erfolgt eine Akkumulation von VLCFA (Hein *et al.*, 2008). Die Behandlung von Patienten mit „Lorenzo’s Öl“ (eine Mischung aus Glycerol-Trioleat und Glycerol-Trioleat) normalisiert die Menge an VLCFA (Deon *et al.*, 2006). Bei *Drosophila* führt eine Behandlung mit „Lorenzo’s Öl“ zu einer Reduktion des neurodegenerativen Phänotyps (Min und Benzer, 1999). Ein weiteres Beispiel ist die Behandlung von Fliegen, die mutantes Huntingtin exprimieren und infolge dessen Neurodegeneration und gesteigerte Letalität zeigen, mit Histondeacetylase-Inhibitoren (HDAC). Dieser Ansatz wurde gewählt, da die Expression von mutantem Huntingtin mit einer verringerten Acetylierung der Histone H3 und H4 einhergeht. Die Applikation der HDAC-Inhibitoren Butyrat und SAHA (Suberoylanilide Hydroxamic Acid, auch als Vorinostat bezeichnet) resultiert in einer Normalisierung der Histonacetylierung sowie in einer deutlichen Reduktion der Neurodegeneration und einer Verlängerung der Vitalität (Steffan *et al.*, 2001).

Die Identifikation von SAHA als potentielles Therapeutikum für Huntington hat gezeigt, dass die Ergebnisse der *Drosophila*-Versuche auf Säugetiere übertragbar sein können. SAHA inhibiert effizient die durch die Expression eines humanen Huntingtin-Transgens ausgelösten Defekte in der Fliege und wurde deshalb an transgenen Mäusen getestet, wo ebenfalls eine Reduktion des neurodegenerativen Phänotyps beobachtet wurde (Steffan *et al.*, 2001; Ferrante *et al.*, 2003). Auch der Tyrosinkinase-Inhibitor ZD6474, welcher die enzymatische Aktivität der Rezeptortyrosinkinase RET inhibiert, konnte die Effekte der ektopischen Expression von RET sowohl in *Drosophila* als auch in transgenen Mäusen effektiv verringern (Carlomagno *et al.*, 2002; Vidal *et al.*, 2005).

Es gibt also Beispiele, in denen Medikamente in etablierten Fliegenmodellen den pathologischen Phänotyp inhibieren. In dieser Arbeit wurden Chemikalien, deren positiver Effekt bei der Behandlung humaner Krankheiten belegt ist, an *Drosophila*-Larven verfüttert. Das Resultat war eine deutliche Verbesserung der morphologischen Defekte der Augenimaginalscheiben, welche durch die ektopische Expression von *λtop* und *PI3K^{92E}* ausgelöst wurden.

4.4.2 Hemmung von EGFR und PI3K durch Gefitinib, Wortmannin und Triciribine

Gefitinib, das unter dem Namen Iressa vertrieben wird, wurde zur Inhibition von EGFR entwickelt. Gefitinib zeigt eine hohe Affinität für EGFR und wurde ursprünglich aufgrund seiner strukturellen Ähnlichkeit zu ATP selektiert. Es inhibiert kompetitiv die Bindung von ATP an die intrazelluläre Domäne von EGFR, da es eine wesentlich höhere Affinität für die ATP-Bindungsstelle hat als ATP selbst (Ward *et al.*, 1994; Barker *et al.*, 2001). In *Drosophila* führte die Verfütterung von Gefitinib an Larven mit dem Genotyp *repo >> λtop, PI3K^{92E}* zu einer Reduktion der morphologischen Defekte. Die Aminosäuresequenz der intrazellulären EGFR-Domäne von *Drosophila* und dem Menschen ist zu 62 % identisch (www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/Blast.cgi). Diese Übereinstimmung scheint also ausreichend für einen inhibitorischen Effekt von Gefitinib auf den *Drosophila*-EGFR zu sein.

Trotzdem konnten die Aberrationen der Augenimaginalscheiben nicht vollständig revertiert werden, was aber wahrscheinlich auf die zusätzliche Aktivität von *PI3K^{92E}* zurückzuführen ist. Zur Inhibition von PI3K wurde Wortmannin an Larven verfüttert, die wiederum *λtop* und *PI3K^{92E}* in Gliazellen ektopisch exprimierten. Wortmannin inhibiert alle Mitglieder der PI3K-Familie irreversibel durch kovalente Alkylierung von Lysin-802, das am Phosphattransfer an der ATP-Bindestelle von p110 beteiligt ist. Wortmannin wird in der ATP-Bindetasche von p110 durch eine Kombination aus Wasserstoffbrückenbindungen und hydrophober Interaktion gebunden (Wymann *et al.*, 1996; Walker *et al.*, 2000). Die Verfütterung von Wortmannin resultiert in einer vollständigen Inhibition des mutanten Phänotyps.

Durch die Applikation von Medikamenten, die für den Menschen entwickelt wurden, konnte in *Drosophila* also eine Hemmung der durch die ektopische Expression von EGFR und PI3K induzierten Phänotypen erreicht werden. Daraus lässt sich schließen, dass die Homologie des EGFR und der PI3K aus *Drosophila* bzw. dem Menschen ausreichend groß ist, um eine derartige Wirkung der entsprechenden Chemikalien zu ermöglichen.

Im nächsten Schritt sollte getestet werden, ob die Hemmung des PI3K-Effektors Akt ausreichend ist für eine Verringerung der ektopischen Migration und gesteigerten Proliferation von Gliazellen bei Larven mit dem Genotyp *repo >> λtop, PI3K^{92E}*. Dazu

wurde der Akt-Inhibitor Triciribine verwendet, der sehr selektiv die Phosphorylierung von Akt2, aber auch von Akt1 und Akt3 hemmt (Yang *et al.*, 2004). Der genaue Mechanismus der Wirkungsweise von Triciribine ist allerdings noch nicht erforscht. Die Verfütterung von Triciribine an Larven mit dem Genotyp *repo >> λtop, PI3K^{92E}* hatte eine inhibierende Wirkung auf die ektopische Migration und gesteigerte Proliferation von Gliazellen der Augenimaginalscheibe. Darüber hinaus kann aus diesem Ergebnis aber auch gefolgert werden, dass Akt trotz der verschiedenen möglichen Ziele von EGFR und PI3K ein primäres Ziel der Aktivität von EGFR und PI3K zu sein scheint.

4.5 Identifikation von Genen mit regulatorischem Einfluss auf PVR

Bei der Suche nach Genen mit regulatorischem Einfluss auf PVR wurden verschiedene Kandidaten identifiziert, von denen CG9494, CG11335, CG8595 und CG5825 von besonderem Interesse sind, da deren RNA Interferenz-vermittelte Verringerung der Expression zu einer deutlichen Verlagerung der *λpvr*-induzierten Letalität in spätere Entwicklungsstadien führt.

CG9494 codiert für Tetraspanin 29Fa, einem von 37 verschiedene Tetraspaninen in *Drosophila* (Todres *et al.*, 2000). Tetraspanine können untereinander oder mit anderen Molekülen Komplexe an der Zelloberfläche ausbilden, die als Tetraspaninnetze bezeichnet werden (Claas *et al.*, 2001; Lazo, 2007). Diese Strukturen tragen zur Organisation verschiedener Membranproteine bei. Beispielsweise interagiert CD9, ein Vertreter der humanen Tetraspanin-Familie, mit EGFR. Tetraspanin beeinflusst die Lokalisation von EGFR in der Plasmamembran und fördert so die Interaktion zwischen EGF und EGFR (Murayama *et al.*, 2008). CD9 vermittelt außerdem die TGF- α -induzierte autokrine Aktivierung des EGFR, indem es die Proteolyse der extrazellulären Domäne von TGF- α einschränkt, die in der Freisetzung des löslichen Wachstumsfaktors resultiert (Shi *et al.*, 2000).

Darüber hinaus ist eine zentrale Funktion von Tetraspaninen die Interaktion mit Integrinen. Beispielsweise fördern Wechselwirkungen zwischen dem humane Tetraspanin CD151 und verschiedenen Integrinen die Adhäsion von Zellen an die extrazelluläre Matrix und dadurch die Zellmotilität (Nishiuchi *et al.*, 2005). Außerdem

stimuliert die Aktivierung von CD151 über verschiedene intrazelluläre Signalwege, an denen wahrscheinlich FAK (Focal Adhesion Kinase) und die MAPK beteiligt sind, die Expression der Matrix-Metalloproteinase-9 (Hong *et al.*, 2006; Liu *et al.*, 2007). Ebenso stimuliert auch CD9 die Adhäsion und Migration von Zellen (Anton *et al.*, 1995; Cook *et al.*, 1999; Mazzocca *et al.*, 2002), und ist darüber hinaus an der Metastasenbildung von Tumorzellen beteiligt (Miyake *et al.*, 1996; Hashida *et al.*, 2003). Es wird vermutet, dass CD9 zu gesteigerter Aktivität der PI3K führt, die wiederum verstärkte Expression von Integrin $\alpha 5\beta 1$ auslöst (Somanath *et al.*, 2007; Kotha *et al.*, 2008).

Tetraspanine tragen also nicht nur zur Organisation von Membranproteinen bei, sondern beeinflussen auch die Signaltransduktion durch Rezeptortyrosinkinasen und stimulieren die Aktivität von RTK-Effektoren.

Ein weiterer Kandidat, der im Screen nach Genen identifiziert wurde, welche die λpvr -induzierte Letalität in spätere Entwicklungsstadien retten können, ist CG11335, das für eine Lysyloxidase (LOX) codiert. Die Lysyloxidase von Säugetieren ist ein Enzym der extrazellulären Matrix, das an der kovalenten Quervernetzung von fibrillärem Kollagen und Elastin beteiligt ist (Kagan und Li, 2003). Gesteigerte Aktivität von LOX ist mit verschiedenen Krankheiten assoziiert, wie etwa Arteriosklerose oder seniler Plaquebildung bei Alzheimer (Gilad *et al.*, 2005; Rodríguez *et al.*, 2008). Eine aberrante Expression von LOX ist auch für verschiedene Tumore beschrieben. In diesem Kontext wurde allerdings sowohl eine Beteiligung von LOX an der Stimulation als auch an der Inhibition der Zellmotilität beobachtet. Beispielsweise inhibiert die ektopische Expression von LOX die Ras-induzierte onkogene Transformation von Zellen. Die Aktivität von Ras führt zur Stimulation von NF κ B, die durch den PI3K/Akt- und den MEK-Signalweg vermittelt wird (Rodríguez-Viciano *et al.*, 1997). Die Funktion von LOX besteht in der Inhibition von PI3K (Jeay *et al.*, 2002).

Konträr dazu wird LOX verstärkt in anaplastischen Astrozytomzellen exprimiert (Hayashi *et al.*, 2004; Laczko *et al.*, 2007) und trägt in Brustkrebszellen zur Invasion und Metastasierung der Zellen bei (Kirschmann *et al.*, 2002). Dieser Effekt scheint durch die LOX-vermittelte Stimulation des FAK/Src-Signalwegs zu erfolgen (Nellaiappan *et al.*, 2000; Payne *et al.*, 2005). Im Kontext dieser Arbeit verschiebt LOX die PVR-induzierte Letalität in spätere Entwicklungsstadien. Da die Expression von λpvr auch mit einer Stimulation der Migration einhergeht, könnte der positive

Effekt der Funktionsreduktion von LOX auf die Vitalität auf eine Hemmung der Zellmotilität zurückzuführen sein.

CG8595 repräsentiert Toll-7, einen Vertreter der Toll-Familie, die bei *Drosophila* insgesamt acht membranständige Rezeptoren umfasst. Beim Menschen gibt es eine Gruppe strukturell verwandter Proteine, die TLRs (Toll-Like Receptors). TLRs haben eine wichtige Funktion bei der angeborenen Immunantwort (Alexopoulou *et al.*, 2001). Die Aktivierung von TLRs stimuliert NFκB, der wiederum die Expression verschiedener an der Immunantwort beteiligter Gene auslöst, wie beispielsweise von Interleukinen (IL) (Li und Qin, 2005). An der Regulation der IL-Expression sind auch mTor und GSK3 beteiligt, die durch PI3K reguliert werden. Die Hemmung von mTor resultiert in einer erhöhten Expression von IL-12, während GSK3 die Produktion von IL-12 fördert (Kuo *et al.*, 2006; Ohtani *et al.*, 2008). TLRs können PI3K direkt aktivieren. Beispielsweise bindet TLR2 an PI3K, ebenso wie TLR3 (Sarkar *et al.*, 2004), während TLR5 durch den Adaptor MyD88 zur Aktivierung von PI3K führt (Rhee *et al.*, 2006). Es wäre also möglich, dass die RNA Interferenz-vermittelte Verringerung der Expression von *CG8595* eine reduzierte Aktivität von PI3K zur Folge hat und so einer PVR-induzierten gesteigerten Migration entgegenwirkt. So resultiert beispielsweise die Aktivierung der PI3K durch TLR2 nicht nur in der Regulation der Interleukin-Expression, sondern scheint auch zu verstärkter Expression der Integrine CD11b und CD18 zu führen (Harokopakis und Hajishengallis, 2005). CD11b und CD18 sind unter anderem an der Adhäsion von Leukozyten und der transendothelialen Migration dieser Zellen beteiligt (Montecucco *et al.*, 2008).

CG5825, ein weiterer der identifizierten Kandidaten, codiert für das Histon H3.3A. Das Histon H3 ist als Teil des Nukleosoms essentiell für die Organisation der eukaryotischen DNA (Groth *et al.*, 2007). Es gibt verschiedene Varianten des Histons H3. Im Menschen werden H3.1 und H3.2 während der S-Phase und H3.3 während des restlichen Zellzyklus exprimiert (Hake *et al.*, 2006). H3.3 ist vor allem in Bereichen aktiver Transkription zu finden (Chow *et al.*, 2005; Mito *et al.*, 2005). Die N-terminalen Histonenden können das Ziel kovalenter Modifikationen sein, die zur Regulation der Genexpression beitragen (Li *et al.*, 2007). Beispielsweise wird die Phosphorylierung von H3 mit der Chromosomenkondensation während der Mitose assoziiert (Wei *et al.*, 1999) und spielt darüber hinaus auch bei der transkriptionellen Aktivierung von Genen eine Rolle (Van Hooser *et al.*, 1998). Die MAPK-vermittelte

Phosphorylierung von H3.3 Teil scheint Teil der Aktivierung von unmittelbar frühen Genen zu sein (Immediate Early Genes, IE) (Cheung *et al.*, 2000; Clayton *et al.*, 2000), einer Gruppe von Genen, deren Transkription bereits wenige Minuten nach der Stimulation einer Zelle erfolgt (Sheng und Greenberg, 1990). Eine verringerte Konzentration von H3.3 könnte also die Transkription verschiedener Gene erschweren.

4.6 Untersuchung von Genen mit Deregulation in Gliomzellen in *Drosophila*

Die humanen Gene *RGS3* und *RGS4*, die im Genexpressionsprofil von in Kultur gehaltenen Gliomzellen heraufreguliert waren (Tatenhorst *et al.*, 2004 und 2005), sind an der Signaltransduktion von heterotrimeren G-Proteinen beteiligt (Willars, 2006) und haben damit funktionelle Homologien zu dem *Drosophila*-Protein Loco. Die Untersuchung der Funktion von Loco hat jedoch keine Hinweise auf eine Beteiligung an der Zellmigration erbracht.

Das Genexpressionsprofil von Rattengliomzellen, das sowohl *in vitro* als auch *in vivo* analysiert wurde, hat eine verringerte Expression der LipaseA gezeigt. Die LipaseA agiert im Lysosom, wo sie die Hydrolyse von Cholesterinestern und Triglyceriden katalysiert (Zhao *et al.*, 2005). Das *Drosophila*-Homolog der LipaseA ist CG31871, eine bislang nicht weiter charakterisierte Sequenz. Die aus der Verringerung der Expression von *CG31871* resultierenden Defekte könnten auf Störungen in der Lipidsynthese zurückzuführen sein. Im Menschen wird die Fehlregulation der humanen LipaseA mit der Wolman-Krankheit in Zusammenhang gebracht, die unter anderem mit Triglycerid- und Cholesterinester-Ablagerung in den Eingeweiden und im Nervensystem einhergeht (Assmann und Seedorf, 2001).

Auch die Expression von PDGF-A war im Genexpressionsprofil von Rattengliomzellen *in vitro* und *in vivo* herunterreguliert. Das *Drosophila*-Homolog von PDGF-A ist CG7103, das für den PVR-Liganden Pvf1 codiert.

Bei Säugetieren scheint während der natürlichen Entwicklung die parakrine Aktivierung von PDGFR durch seine Liganden der geläufigste Weg zu sein. So wird in Mausembryonen PDGF-A primär in Epithelzellen, Muskelgewebe und Neuronen exprimiert, während der PDGFR- α vor allem in mesenchymalen Geweben zu finden

ist (Orr-Urtreger und Lonai, 1992; Takakura *et al.*, 1997). In Tumoren erfolgt jedoch oft eine autokrine Aktivierung von PDGFR, die beispielsweise zur EMT (Epithelial-Mesenchymal Transition) beizutragen scheint (Jechlinger *et al.*, 2006). Die autokrine Aktivierung von PDGFR scheint aber auch für die Proliferation und frühe Differenzierung neuraler Stammzellen wichtig zu sein. So exprimieren neurale Stammzellen *in vitro* PDGF-B und PDGFR. Die Inhibition von PDGF-B führt zu einer verringerten Anzahl an Zellen, und die Blockierung von PDGFR resultiert in früherer Differenzierung (Erlandsson *et al.*, 2006). Dem entsprechend wäre es durchaus möglich, dass die Gliazellen der Augenimaginalscheibe von *Drosophila* auf eine autokrine Aktivierung von PVR angewiesen sind.

Trotzdem bleibt fragwürdig, weshalb die Expression von PDGF-A in schnell migrierenden Gliomzellen reduziert war, da in Gliomen eigentlich eher mit einer Steigerung der Aktivität von PDGFR und seinen Liganden zu rechnen ist (Varela *et al.*, 2004). Die Möglichkeit einer autokrinen Aktivierung von PVR in den Gliazellen von *Drosophila* ist auf jeden Fall ein interessantes Ergebnis, wobei aber zu hinterfragen ist, welche Aussagekraft die Identifikation von PDGF-A im Zellkulturversuch hat.

Bei der Verwendung der Genexpressionsdaten von Zellkulturzellen ergeben sich verschiedene Schwierigkeiten, die eine kritische Interpretation der Daten erfordern. Beispielsweise neigen Gliomzellen in Kultur zu einem mesenchymalen Drift, d.h. sie verlieren gliale Eigenschaften und werden stattdessen mesenchymalen Zellen ähnlicher (Paulus *et al.*, 1994). Dies macht sich insbesondere bei der Expression von Genen bemerkbar, die für Komponenten der ECM, Adhäsionsmoleküle, Zytokine und Metalloendopeptidasen codieren (Creighton *et al.*, 2003). Das Expressionsprofil von Zellen in Kultur ist also nicht unbedingt identisch mit dem *in vivo*. Es wäre somit denkbar, dass es sich bei der veränderten Expression von *RGS3* und *RGS4* im Expressionsprofil der Gliomzellen um ein Artefakt der artifiziellen Umweltbedingungen handelt, denen die Zellen in Kultur ausgesetzt sind.

Darüber hinaus ist der Phänotyp von Gliomzellen das Resultat multipler genetischer Aberrationen (Sehgal, 1998; Baak *et al.*, 2003; Beckman und Loeb, 2005), die zu weitreichenden Störungen der Signaltransduktionsprozesse in den betroffenen Zellen führen. Die Deregulation eines einzelnen Gens muss also nicht unbedingt der unmittelbare Auslöser von gesteigerter Migration, vermehrter Proliferation oder von anderen Eigenschaften sein, die für Tumorzellen kennzeichnend sind.

5 Zusammenfassung

In dieser Arbeit sollte zunächst die Eignung von *Drosophila* als Modellsystem für die Erforschung von humanen Gliomen untersucht werden. Dabei konnte gezeigt werden, dass durch die Deregulation des PI3K/Akt-Signalwegs in *Drosophila* eine gesteigerte Proliferation und ektopische Migration von Zellen induziert werden konnte. Beide Eigenschaften sind typische Kennzeichen von Tumoren und treten auch bei der Fehlregulation der humanen Homologe von EGFR, PI3K, Akt und PTEN auf. Darüber hinaus ließ sich der aus der ektopische Genexpression resultierende Phänotyp durch Medikamente revertieren, die zur Behandlung von Tumorpatienten entwickelt wurden. Somit konnte erfolgreich dargelegt werden, dass *Drosophila* als Modellsystem für die Erforschung von Gliomen geeignet ist.

Der zweite Teil der Arbeit beschäftigte sich mit Genen, die potentiell bei der Tumorgenese von Bedeutung sein könnten. Die Untersuchung der *Drosophila*-Homologe von Genen, die in Gliomzellen fehlreguliert waren, hat jedoch keine verwertbaren Resultate erbracht. In einem zweiten Ansatz wurden in *Drosophila* verschiedene Genen identifiziert, die für die Migration von Zellen des Menschen von Bedeutung sein könnten. Für die Effizienz dieses zweiten Ansatzes spricht, dass ein Teil der identifizierten Kandidaten im Zusammenhang mit der Motilität von Tumorzellen beschrieben ist. Folglich ist auch die Wahrscheinlichkeit groß, dass die bisher nicht oder nur wenig charakterisierten Gene für die Zellmotilität von Bedeutung sein könnten.

6 Literaturverzeichnis

- Alexopoulou L, Holt AC, Medzhitov R, Flavell RA** (2001). Recognition of double-stranded RNA and activation of NF-kappaB by Toll-like receptor 3. *Nature* **413**:732-738.
- Amit I, Wides R, Yarden Y** (2007). Evolvable signaling networks of receptor tyrosine kinases: relevance of robustness to malignancy and to cancer therapy. *Mol Syst Biol* **3**:151.
- Anton ES, Hadjiargyrou M, Patterson PH, Matthew WD** (1995). CD9 plays a role in Schwann cell migration *in vitro*. *J Neurosci* **15**:584-595.
- Arber W** (1974). DNA modification and restriction. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* **14**:1-37.
- Arber W** (1978). Restriction endonucleases. *Angew Chem Int Ed Engl* **17**:73-79.
- Assmann G, Seedorf U** (2001). Acid lipase deficiency: Wolman disease and cholesteryl ester storage disease. In: Scriver CR, Beaudet AL, Valle D, Sly WS, eds. Metabolic and molecular bases of inherited diseases. *McGraw-Hill, New York*, 3551-3572.
- Baak JP, Path FR, Hermsen MA, Meijer G, Schmidt J, Janssen EA** (2003). Genomics and proteomics in cancer. *Eur J Cancer* **39**:1199-1215.
- Bainton RJ, Tsai LT, Schwabe T, DeSalvo M, Gaul U, Heberlein U** (2005). *moody* encodes two GPCRs that regulate cocaine behaviors and blood-brain barrier permeability in *Drosophila*. *Cell* **123**:145-156.
- Barker AJ, Gibson KH, Grundy W, Godfrey AA, Barlow JJ, Healy MP, Woodburn JR, Ashton SE, Curry BJ, Scarlett L, et al.** (2001). Studies leading to the identification of ZD1839 (IRESSA). an orally active, selective epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitor targeted to the treatment of cancer. *Bioorg Med Chem Lett* **11**:1911-1914.
- Beckman RA, Loeb LA** (2005). Genetic instability in cancer: theory and experiment. *Semin Cancer Biol* **15**:423-35.
- Bellen HJ, Lu Y, Beckstead R, Bhat MA** (1998). Neurexin IV, caspr and paranodin - novel members of the neurexin family:encounters of axons and glia. *Trends Neurosci* **21**:444-449.
- Berger P, Niemann A, Suter U** (2006). Schwann cells and the pathogenesis of inherited motor and sensory neuropathies (Charcot-Marie-Tooth disease). *Glia* **54**:243-257.
- Bernards R, Weinberg RA** (2002). A progression puzzle. *Nature* **418**:823.
- Bhalla US, Ram PT, Iyengar R** (2002). MAP kinase phosphatase as a locus of flexibility in a mitogen activated protein kinase signaling network. *Science* **297**:1018-1023.
- Bier E** (2005). *Drosophila*, the golden bug, emerges as a tool for human genetics. *Nat Rev Genet* **6**:9-23.
- Bigner SH, Humphrey PA, Wong AJ, Vogelstein B, Mark J, Friedman HS, Bigner DD** (1990). Characterization of the epidermal growth factor receptor in human glioma cell lines and xenografts. *Cancer Res* **50**:8017-8022.
- Bilder D** (2004). Epithelial polarity and proliferation control: links from the *Drosophila* neoplastic tumor suppressors. *Genes Dev* **18**:1909-1925.
- Bilder D, Li M, Perrimon N** (2000) Cooperative regulation of cell polarity and growth by *Drosophila* tumor suppressors. *Science* **289**:113-116.

- Blume-Jensen P, Hunter T** (2001). Oncogenic kinase signalling. *Nature* **411**:355-365.
- Böhni R, Riesgo-Escovar J, Oldham S, Brogiolo W, Stocker H, Andruss BF, Beckingham K, Hafen E** (1999). Autonomous control of cell and organ size by CHICO, a *Drosophila* homolog of vertebrate IRS1-4. *Cell* **97**:865-875.
- Bosman FT, Stamenkovic I** (2003). Functional structure and composition of the extracellular matrix. *J Pathol* **200**:423-428.
- Boube M, Martin-Bermudo MD, Brown NH, Casanova J** (2001). Specific tracheal migration is mediated by complementary expression of cell surface proteins. *Genes Dev* **15**:1554-62
- Bradford MM** (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* **72**:248-254.
- Brand AH, Perrimon N** (1993) Targeted gene expression as a means of altering cell fates and generating dominant phenotypes. *Development* **118**:401-415.
- Britsch S** (2007). The neuregulin-I/ErbB signaling system in development and disease. *Adv Anat Embryol Cell Biol* **190**:1-65.
- Brogiolo W, Stocker H, Ikeya T, Rintelen F, Fernandez R, Hafen E** (2001). An evolutionarily conserved function of the *Drosophila* insulin receptor and insulin-like peptides in growth control. *Curr Biol* **11**:213-221.
- Brooks PC, Stromblad S, Sanders LC, von Schalscha TL, Aimes RT, Stetler-Stevenson WG, Quigley JP, Cheresch DA** (1996). Localization of matrix metalloproteinase MMP-2 to the surface of invasive cells by interaction with integrin $\alpha\beta 3$. *Cell* **85**: 683-693.
- Brumby A, Secombe J, Horsfield J, Coombe M, Amin N, Coates D, Saint R, Richardson H** (2004). A genetic screen for dominant modifiers of a cyclin E hypomorphic mutation identifies novel regulators of S-phase entry in *Drosophila*. *Genetics* **168**:227-251.
- Brumby AM, Richardson HE** (2005). Using *Drosophila melanogaster* to map human cancer pathways. *Nat Rev Cancer* **5**:626-639.
- Busygina V, Suphapeetiporn K, Marek LR, Stowers RS, Xu T, Bale AE** (2004). Hypermutability in a *Drosophila* model for multiple endocrine neoplasia type 1. *Hum Mol Genet* **13**:2399-2408.
- Butler AA, Le Roith D** (2001). Control of growth by the somatotropic axis: growth hormone and the insulin-like growth factors have related and independent roles. *Annu Rev Physiol* **63**:141-164.
- Cahill DP, Kinzler KW, Vogelstein B, Lengauer C** (1999). Genetic instability and darwinian selection in tumours. *Trends Cell Biol* **9**:57-60.
- Carlomagno F, Vitagliano D, Guida T, Ciardiello F, Tortora G, Vecchio G, Ryan AJ, Fontanini G, Fusco A, Santoro M** (2002). ZD6474, an orally available inhibitor of KDR tyrosine kinase activity, efficiently blocks oncogenic RET kinases. *Cancer Res* **62**:7284-7290.
- Carlson SD, Juang JL, Hilgers SL, Garment MB** (2000) Blood barriers of the insect. *Annu Rev Entomol* **45**:151-174.
- Caussinus E, Gonzalez C** (2005). Induction of tumor growth by altered stem-cell asymmetric division in *Drosophila melanogaster*. *Nat Genet* **37**:1125-1129.
- Chamberlin HM, Sternberg PW** (1994). The *lin-3 / let-23* pathway mediates inductive signaling during male spicule development in *Caenorhabditis elegans*. *Development* **120**:2713-2721.

- Chan AC, Kadlecck TA, Elder ME, Filipovich AH, Kuo WL, Iwashima M, Parslow TG, Weiss A** (1994). ZAP-70 deficiency in an autosomal recessive form of severe combined immunodeficiency. *Science* **264**:599-601.
- Chan EH, Nousiainen M, Chalamalasetty RB, Schafer A, Nigg EA, Sillje HH** (2005). The Ste20-like kinase Mst2 activates the human large tumor suppressor kinase Lats1. *Oncogene* **24**:2076-2086.
- Cheney IW, Johnson DE, Vaillancourt MT, Avanzini J, Morimoto A, Demers GW, Wills KN, Shabram PW et al.**, (1998). Suppression of tumorigenicity of glioblastoma cells by adenovirus-mediated MMAC1/PTEN gene transfer. *Cancer Res* **58**(11):2331-4.
- Cheung P, Tanner KG, Cheung WL, Sassone-Corsi P, Denu JM, Allis CD** (2000). Synergistic coupling of histone H3 phosphorylation and acetylation in response to epidermal growth factor stimulation. *Mol Cell* **5**:905-915.
- Cho NK, Keyes L, Johnson E, Heller J, Ryner L, Karim F** (2002). Developmental control of blood cell migration by the *Drosophila* VEGF pathway. *Cell* **108**:865-876.
- Choi KW, Benzer S** (1994). Migration of glia along photoreceptor axons in the developing *Drosophila* eye. *Neuron* **12**:423-31.
- Chow CM, Georgiou A, Szutorisz H, Maia e Silva A, Pombo A, Barahona I, Dargelos E, Canzonetta C, Dillon N** (2005). Variant histone H3.3 marks promoters of transcriptionally active genes during mammalian cell division. *EMBO Rep* **6**:354-360.
- Claas C, Stipp CS, Hemler ME** (2001). Evaluation of prototype transmembrane 4 superfamily protein complexes and their relation to lipid rafts. *J Biol Chem* **276**:7974-7984.
- Claes A, Idema AJ, Wesseling P** (2007). Diffuse glioma growth: a guerilla war. *Acta Neuropathol* **114**:443-58.
- Claesson-Welsh L** (1994). Platelet-derived growth factor receptor signals. *J Biol Chem* **269**:32023-32026.
- Clandinin TR, DeModena JA, Sternberg PW** (1998) Inositol triphosphate mediates a Ras-independent response to LET-23 receptor tyrosine kinase activation in *C. elegans*. *Cell* **92**:523-533.
- Clayton AL, Rose S, Barratt MJ, Mahadevan LC** (2000). Phosphoacetylation of histone H3 on c-fos- and c-jun-associated nucleosomes upon gene activation. *EMBO J* **19**:3714-3726.
- Cohen MH, Williams GA, Sridhara R, Chen G, McGuinn WD Jr, Morse D, Abraham S, Rahman A, Liang C, et al.** (2004). United States Food and Drug Administration Drug Approval summary: Gefitinib (ZD1839; Iressa) tablets. *Clin Cancer Res* **10**:1212-1218.
- Cook GA, Wilkinson DA, Crossno JT Jr, Raghov R, Jennings LK** (1999). The tetraspanin CD9 influences the adhesion, spreading, and pericellular fibronectin matrix assembly of Chinese hamster ovary cells on human plasma fibronectin. *Exp Cell Res* **251**:356-371.
- Corfas G, Velardez MO, Ko CP, Ratner N, Peles E** (2004). Mechanisms and roles of axon-Schwann cell interactions. *J Neurosci* **24**:9250-9260.
- Creighton C, Kuick R, Misek DE, Rickman DS, Brichory FM, Rouillard JM, Omenn GS, Hanash S** (2003). Profiling of pathway-specific changes in gene expression following growth of human cancer cell lines transplanted into mice. *Genome Biol* **4**:R46.
- Cremer HD, Tiselius A** (1950). Electrophoresis of proteins on filter paper. *Biochem Z* **320**:273-283.
- D'Alessio M, Frasch M** (1996). *msh* may play a conserved role in dorsoventral patterning of the neuroectoderm and mesoderm. *Mech Dev* **58**:217-231.

- Dash BC, El-Deiry WS** (2004). Cell cycle checkpoint control mechanisms that can be disrupted in cancer. *Methods Mol Biol* **280**:99-161.
- Datta SR, Dudek H, Tao X, Masters S, Fu H, Gotoh Y, Greenberg ME** (1997). Akt phosphorylation of BAD couples survival signals to the cell-intrinsic death machinery. *Cell* **91**:231-241.
- David M, Wong L, Flavell R, Thompson SA, Wells A, Lerner AC, Johnson GR** (1996). STAT activation by epidermal growth factor (EGF) and amphiregulin. Requirement for the EGF receptor kinase but not for tyrosine phosphorylation sites or JAK1. *J Biol Chem* **271**:9185-9188.
- Davis AA, Temple S** (1994). A self-renewing multipotential stem cell in embryonic rat cerebral cortex. *Nature* **372**:263-266.
- Dearborn R Jr, Kunes S** (2004). An axon scaffold induced by retinal axons directs glia to destinations in the *Drosophila* optic lobe. *Development* **131**:2291-2303.
- Delaval B, Birnbaum D** (2007). A cell cycle hypothesis of cooperative oncogenesis. *Int J Oncol* **30**:1051-1058.
- Deon M, Wajner M, Sirtori LR, Fitarelli D, Coelho DM, Sitta A, Barschak AG, Ferreira GC, Haeser A, Giugliani R, Vargas CR** (2006). The effect of Lorenzo's oil on oxidative stress in X-linked adrenoleukodystrophy. *J Neurol Sci* **247**:157-164.
- Dhib-Jalbut S** (2007). Pathogenesis of myelin/oligodendrocyte damage in multiple sclerosis. *Neurology* **68**:13-21.
- Di Cristofano A, Kotsi P, Peng YF, Cordon-Cardo C, Elkon KB, Pandolfi PP** (1999). Impaired *fas* response and autoimmunity in *Pten*^{+/-} mice. *Science* **285**:2122-2125.
- Donaldson T, Wang SH, Jacobsen TL, Schnepf B, Price J, Simcox A** (2004). Regulation of the *Drosophila* epidermal growth factor-ligand vein is mediated by multiple domains. *Genetics* **167**:687-98.
- d'Ortho MP, Stanton H, Butler M, Atkinson SJ, Murphy G, Hembry RM** (1998). MT1-MMP on the cell surface causes focal degradation of gelatin films. *FEBS Lett* **421**:159-164.
- Duchek P, Somogyi K, Jekely G, Beccari S, Rorth P** (2001). Guidance of cell migration by the *Drosophila* PDGF/VEGF receptor domains. *Cell* **107**:17-26.
- Duesberg P, Li R** (2003). Multistep carcinogenesis: a chain reaction of aneuploidizations. *Cell Cycle* **2**:202-210.
- Edenfeld G, Altenhein B, Zierau A, Cleppien D, Krukkert K, Technau G, Klämbt C** (2007). Notch and Numb are required for normal migration of peripheral glia in *Drosophila*. *Dev Biol* **301**:27-37.
- Enomoto A, Murakami H, Asai N, Morone N, Watanabe T, Kawai K, Murakumo Y, Usukura J, Kaibuchi K, Takahashi M** (2005). Akt/PKB regulates actin organization and cell motility via Girdin/APE. *Dev Cell* **9**:389-402.
- Erlandsson A, Brännvall K, Gustafsdottir S, Westermark B, Forsberg-Nilsson K** (2006). Autocrine/paracrine platelet-derived growth factor regulates proliferation of neural progenitor cells. *Cancer Res* **66**:8042-8048.
- Feany MB, Bender WW** (2000). A *Drosophila* model of Parkinson's disease. *Nature* **404**:394-398.
- Ferrante RJ, Kubilus JK, Lee J, Ryu H, Beesen A, Zucker B, Smith K, Kowall NW, Ratan RR, Luthi-Carter R, Hersch SM** (2003). Histone deacetylase inhibition by sodium butyrate chemotherapy ameliorates the neurodegenerative phenotype in Huntington's disease mice. *J Neurosci* **23**:9418-9427.
- Ferres-Marco D, Gutierrez-Garcia I, Vallejo DM, Bolivar J, Gutierrez-Aviño FJ, Dominguez M** (2006). Epigenetic silencers and Notch collaborate to promote malignant tumours by Rb silencing. *Nature* **439**:430-436.
- Fidler IJ, Ellis LM** (1994). The implications of angiogenesis for the biology and therapy of cancer metastasis. *Cell* **79**:185-188.

- Fortini ME, Skupski MP, Boguski MS, Hariharan IK** (2000). A survey of human disease gene counterparts in the *Drosophila* genome. *J Cell Biol* **150**:F23-30.
- Francis K, Palsson B, Donahue J, Fong S, Carrier E** (2002). Murine Sca-1⁺/Lin⁻ cells and human KG1a cells exhibit multiple pseudopod morphologies during migration. *Exp Hematol* **30**:460-463.
- Fresno Vara JA, Casado E, de Castro J, Cejas P, Belda-Iniesta C, González-Barón M** (2004). PI3K/Akt signalling pathway and cancer. *Cancer Treat Rev* **30**:193-204.
- Friedl P, Borgmann S, Brocker EB** (2001). Amoeboid leukocyte crawling through extracellular matrix: lessons from the *Dictyostelium* paradigm of cell movement. *J Leukoc Biol* **70**:491-509.
- Friedl P, Entschladen F, Conrad C, Niggemann B, Zänker KS** (1998). T lymphocytes migrating in 3-D collagen lattices lack focal adhesions and utilize β 1 integrin-independent strategies for polarization, interaction with collagen fibers, and migration. *Eur J Immunol* **28**:2331-2343.
- Friedl P, Wolf K** (2003). Tumour-cell invasion and migration: diversity and escape mechanisms. *Nat Rev Cancer* **3**:362-374.
- Fu W, Baker NE** (2003). Deciphering synergistic and redundant roles of Hedgehog, Decapentaplegic and Delta that drive the wave of differentiation in *Drosophila* eye development. *Development* **130**:5229-5239.
- Furnari FB, Huang HJS, Cavanaugh WK** (1998). The phosphoinositol phosphatase activity of PTEN mediates a serum sensitive G1 growth arrest in glioma cells. *Cancer Res* **58**:5002-5008.
- Furuta M, Weil RJ, Vortmeyer AO, Huang S, Lei J, Huang TN, Lee YS, Bhowmick DA, Lubensky IA, Oldfield EH, Zhuang Z** (2004). Protein patterns and proteins that identify subtypes of glioblastoma multiforme. *Oncogene* **23**:6806-6814.
- Gabay L, Scholz H, Golembo M, Klaes A, Shilo BZ, Klämbt C** (1996). EGF receptor signaling induces pointed P1 transcription and inactivates Yan protein in the *Drosophila* embryonic ventral ectoderm. *Development* **122**:3355-3362.
- Gao X, Neufeld TP, Pan D** (2000). *Drosophila* PTEN regulates cell growth and proliferation through PI3K-dependent and -independent pathways. *Dev Biol* **221**:404-418.
- Garbern JY** (2007). Pelizaeus-Merzbacher disease: Genetic and cellular pathogenesis. *Cell Mol Life Sci* **64**:50-65.
- Garoia F, Grifoni D, Trotta V, Guerra D, Pezzoli MC, Cavicchi S** (2005). The tumor suppressor gene fat modulates the EGFR-mediated proliferation control in the imaginal tissues of *Drosophila melanogaster*. *Mech Dev* **122**:175-187.
- Gateff E** (1994). Tumour suppressor and overgrowth suppressor genes of *Drosophila melanogaster*: developmental aspects. *Int J Dev Biol* **38**:565-590.
- Giese A, Westphal M** (1996). Glioma invasion in the central nervous system. *Neurosurgery* **39**:235-252.
- Gilad GM, Kagan HM, Gilad VH** (2005). Evidence for increased lysyl oxidase, the extracellular matrix-forming enzyme, in Alzheimer's disease brain. *Neurosci Lett* **376**:210-214.
- Goberdhan DC, Paricio N, Goodman EC, Mlodzik M, Wilson C** (1999). *Drosophila* tumor suppressor PTEN controls cell size and number by antagonizing the Chico/PI3-kinase signaling pathway. *Genes Dev* **13**:3244-3258.
- Golic, KG, Lindquist S** (1989). The FLP recombinase of yeast catalyzes site-specific recombination in the *Drosophila* genome. *Cell* **59**:499-509.

- Gottschall PE, Deb S** (1996). Regulation of matrix metalloproteinase expressions in astrocytes, microglia and neurons. *Neuroimmunomodulation* **3**:69-75.
- Granderath S, Bunse I, 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 CS, O'Kane C, Klämbt C** (1999). *loco* encodes an RGS protein required for *Drosophila* glial differentiation *Development* **126**:1781-1791.
- Greenwood S, Struhl G** (1999). Progression of the morphogenetic furrow in the *Drosophila* eye: the roles of Hedgehog, Decapentaplegic and the Raf pathway. *Development* **126**:5795-5808.
- Groth A, Rocha W, Verreault A, Almouzni G** (2007). Chromatin challenges during DNA replication and repair. *Cell* **128**:721-733.
- Grzeschik NA, Amin N, Secombe J, Brumby AM, Richardson HE** (2007). Abnormalities in cell proliferation and apico-basal cell polarity are separable in *Drosophila* lgl mutant clones in the developing eye. *Dev Biol* **311**:106-23.
- Guarino M** (2007). Epithelial-mesenchymal transition and tumour invasion. *Int J Biochem Cell Biol* **39**:2153-2160.
- Gunawardena S, Goldstein LS** (2001). Disruption of axonal transport and neuronal viability by amyloid precursor protein mutations in *Drosophila*. *Neuron* **32**:389-401.
- Haas-Kogan D, Shalev N, Wong M, Mills G, Yount G, Stokoe D** (1998). Protein kinase B (PKB/Akt) activity is elevated in glioblastoma cells due to mutation of the tumor suppressor PTEN/MMAC. *Curr Biol* **8**:1195-1198.
- Hackstein JH** (1992). The lethal prune/Killer-of-prune interaction of *Drosophila* causes a syndrome resembling human neurofibromatosis (NF1). *Eur J Cell Biol* **58**:429-444.
- Hake SB, Garcia BA, Duncan EM, Kauer M, Dellaire G, Shabanowitz J, Bazett-Jones DP, Allis CD, Hunt DF** (2006). Expression patterns and post-translational modifications associated with mammalian histone H3 variants. *J Biol Chem* **281**:559-568.
- Hanahan D, Weinberg RA** (2000). The hallmarks of cancer. *Cell* **100**:57-70.
- Hanks SK, Quinn AM** (1991). Protein kinase catalytic domain sequence database: identification of conserved features of primary structure and classification of family members. *Methods Enzymol* **200**:38-62.
- Harokopakis E, Hajishengallis G** (2005). Integrin activation by bacterial fimbriae through a pathway involving CD14, Toll-like receptor 2, and phosphatidylinositol-3-kinase. *Eur J Immunol* **35**:1201-1210.
- Harris R, Sabatelli LM, Seeger MA** (1996). Guidance cues at the *Drosophila* CNS midline: identification and characterization of two *Drosophila* Netrin/UNC-6 homologs. *Neuron* **17**:217-228.
- Hashida H, Takabayashi A, Tokuhara T, Hattori N, Taki T, Hasegawa H, Satoh S, Kobayashi N, Yamaoka Y, Miyake M** (2003). Clinical significance of transmembrane 4 superfamily in colon cancer. *Br J Cancer* **89**:158-167.
- Hay N** (2005). The Akt-mTOR tango and its relevance to cancer. *Cancer Cell* **8**:179-183.
- Hay N, Sonenberg N** (2004). Upstream and downstream of mTOR. *Genes Dev* **18**:1926-1945.
- Hayashi K, Fong KS, Mercier F, Boyd CD, Csiszar K, Hayashi M** (2004). Comparative immunocytochemical localization of lysyl oxidase (LOX) and the lysyl oxidase-like (LOXL) proteins: changes in the expression of LOXL during development and growth of mouse tissues. *J Mol Histol* **35**:845-55.
- Hegerfeldt Y, Tusch M, Brocker EB, Friedl P** (2002). Collective cell movement in primary melanoma explants: plasticity of cell-cell interaction, β 1-integrin function, and migration strategies. *Cancer Res* **62**:2125-2130.

- Hein S, Schönfeld P, Kahlert S, Reiser G** (2008). Toxic effects of X-linked adrenoleukodystrophy-associated, very long chain fatty acids on glial cells and neurons from rat hippocampus in culture. *Hum Mol Genet* **17**:1750-1761.
- Heino TI., Karpanen T, Wahlstrom G, Pulkkinen M, Eriksson U, Alitalo K, Roos C** (2001). The *Drosophila* VEGF receptor homolog is expressed in hemocytes. *Mech Dev* **109**:69-77.
- Heldin CH, Westermark B** (1991). Platelet-derived growth factor and autocrine mechanisms of oncogenic processes. *Crit Rev Oncog* **2**:109-124.
- Hill CS, Treisman R** (1995). Transcriptional regulation by extracellular signals: mechanisms and specificity. *Cell* **80**:199-211.
- Hong IK, Jin YJ, Byun HJ, Jeoung DI, Kim YM, Lee H** (2006). Homophilic interactions of Tetraspanin CD151 up-regulate motility and matrix metalloproteinase-9 expression of human melanoma cells through adhesion-dependent c-Jun activation signaling pathways. *J Biol Chem* **281**:24279-92.
- Hooper JE, Scott MP** (2005). Communicating with Hedgehogs. *Nat Rev Mol Cell Biol* **6**:306-317.
- Huang P, Allam A, Taghian A, Freeman J, Duffy M, Suit HD** (1995). Growth and metastatic behavior of five human glioblastomas compared with nine other histological types of human tumor xenografts in SCID mice. *J Neurosurg* **83**:308-315.
- Hummel T, Attix S, Gunning D, Lawrence Zipursky S** (2002). Temporal control of glial cell migration in the *Drosophila* eye requires *gilgamesh*, *hedgehog*, and eye specification genes. *Neuron* **33**:193-203.
- Hunter T** (2000). Signaling - 2000 and beyond. *Cell* **100**:113-127.
- Hutchinson JN, Jin J, Cardiff RD, Woodgett JR, Muller WJ** (2004). Activation of Akt-1 (PKB α) can accelerate ErbB-2-mediated mammary tumorigenesis but suppresses tumor invasion. *Cancer Res* **64**:3171-3178.
- Hynes NE, Lane HA** (2005). ERBB receptors and cancer: the complexity of targeted inhibitors. *Nat Rev Cancer* **5**:341-354.
- Irie HY, Pearline RV, Grueneberg D, Hsia M, Ravichandran P, Kothari N, Natesan S, Brugge JS** (2005). Distinct roles of Akt1 and Akt2 in regulating cell migration and epithelial-mesenchymal transition. *J Cell Biol* **171**:1023-1034.
- Itakura K, Rossi JJ, Wallace RB** (1984). Synthesis and use of synthetic oligonucleotides. *Annu Rev Biochem* **53**:323-56.
- Ito K, Urban J, Technau GM** (1995). Distribution, classification and development of *Drosophila* glial cells during late embryogenesis. *Roux Arch Dev Biol* **204**:284-307.
- James CD, Collins VP** (1992). Molecular genetic characterization of CNS tumor oncogenesis. *Adv Cancer Res* **58**:121-142.
- Jänisch W, Staneczek W** (1988). Epidemiology of tumors of the central nervous system - influence of the autopsy rate on the incidence rate. *Arch Geschwulstforsch* **58**:51-55.
- Jauliac S, López-Rodríguez C, Shaw LM, Brown LF, Rao A, Toker A** (2002). The role of NFAT transcription factors in integrin-mediated carcinoma invasion. *Nat Cell Biol* **4**:540-544.
- Jeay S, Pianetti S, Kagan HM, Sonenshein GE** (2003). Lysyl oxidase inhibits ras-mediated transformation by preventing activation of NF-kappa B. *Mol Cell Biol* **23**:2251-2263.

- Jechlinger M, Sommer A, Moriggl R, Seither P, Kraut N, Capodiecci P, Donovan M, Cordon-Cardo C, Beug H, Grünert S** (2006). Autocrine PDGFR signaling promotes mammary cancer metastasis. *J Clin Invest* **116**:1561-1570.
- Jemal A, Murray T, Ward E, Samuels A, Tiwari RC, Ghafoor A, Feuer EJ, Thun MJ** (2005). Cancer statistics, 2005. *CA Cancer J Clin* **55**:10-30.
- Jessen KR** (2004). Glial cells. *Int J Biochem Cell Biol* **36**:1861-1867.
- Jessen KR, Mirsky R** (2003). Schwann cell development. In: Myelin Biology and Disorders. *Lazzarini RA, ed, New York Academic Press*, 329-370.
- Jürgens G, Hartenstein V** (1993). The terminal regions of the body pattern. *Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York*, 687-746.
- Kagan HM, Li W** (2003). Lysyl oxidase: properties, specificity, and biological roles inside and outside of the cell. *J Cell Biochem* **88**:660-672.
- Kaplow ME, Korayem AH, Venkatesh TR** (2008). Regulation of glia number in *Drosophila* by Rap/Fzr, an activator of the anaphase-promoting complex, and Loco, an RGS protein. *Genetics* **178**:2003-2016.
- Karkoulis G, Flordellis C** (2007). Delayed transactivation of the receptor for nerve growth factor is required for sustained signaling and differentiation by alpha2-adrenergic receptors in transfected PC12 cells. *Cell Signal* **19**:945-957.
- Katso R, Okkenhaug K, Ahmadi K, White S, Timms J, Waterfield MD** (2001). Cellular function of phosphoinositide 3-kinases: implications for development, homeostasis, and cancer. *Annu Rev Cell Dev Biol* **17**:615-675.
- Kim D, Kim S, Koh H, Yoon SO, Chung AS, Cho KS, Chung J** (2001). Akt/PKB promotes cancer cell invasion via increased motility and metalloproteinase production. *FASEB J* **15**:1953-1962.
- Kirschmann DA, Seftor EA, Fong SF, Nieva DR, Sullivan CM, Edwards EM, Sommer P, Csiszar K, Hendrix MJ** (2002). A molecular role for lysyl oxidase in breast cancer invasion. *Cancer Res* **62**:4478-4483.
- Klämbt C, Jacobs JR, Goodman CS** (1991). The midline of the *Drosophila* central nervous system: a model for the genetic analysis of cell fate, cell migration, and growth cone guidance. *Cell* **64**:801-815.
- Kleihues P, Burger PC, Collins VP, Newcomb EW, Ohgaki H, Cavenee WK** (2000). Pathology and genetics of tumours of the central nervous system. *World Health Organization Classification of Tumours, IARC Press, Lyon* 6-69.
- Klinghoffer RA, Duckworth B, Valius M, Cantley L, Kazlauskas A** (1996). Platelet-derived growth factor-dependent activation of phosphatidylinositol 3-kinase is regulated by receptor binding of SH2-domain-containing proteins which influence Ras activity. *Mol Cell Biol* **16**:5905-5914.
- Kotha J, Longhurst C, Appling W, Jennings LK** (2008). Tetraspanin CD9 regulates beta 1 integrin activation and enhances cell motility to fibronectin via a PI-3 kinase-dependent pathway. *Exp Cell Res* **314**:1811-1822.
- Kouhara H, Hadari YR, Spivak-Kroizman T, Schilling J, Bar-Sagi D, Lax I, Schlessinger J** (1997). A lipid-anchored Grb2-binding protein that links FGF-receptor activation to the Ras/MAPK signaling pathway. *Cell* **89**:693-702.
- Kreutzberg GW** (1996). Microglia: a sensor for pathological events in the CNS. *Trends Neurosci* **19**:312-318.

- Kunwar S, Mohapatra G, Bollen A, Lamborn KR, Prados M, Feuerstein BG** (2001). Genetic subgroups of anaplastic astrocytomas correlate with patient age and survival. *Cancer Res* **61**:7683-7688.
- Kuo CC, Lin WT, Liang CM, Liang SM** (2006). Class I and III phosphatidylinositol 3'-kinase play distinct roles in TLR signaling pathway. *J Immunol* **176**:5943-5949.
- Laczko R, Szauter KM, Jansen MK, Hollosi P, Muranyi M, Molnar J, Fong KS, Hinek A, Csiszar K** (2007). Active lysyl oxidase (LOX) correlates with focal adhesion kinase (FAK)/paxillin activation and migration in invasive astrocytes. *Neuropathol Appl Neurobiol* **33**:631-643.
- Laemmli UK** (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T. *Nature* **227**: 680-685.
- Lauffenburger DA, Horwitz AF** (1996). Cell migration: a physically integrated molecular process. *Cell* **84**:359-369.
- Lavery W, Hall V, Yager JC, Rottgers A, Wells MC, Stern M** (2007). Phosphatidylinositol 3-kinase and Akt nonautonomously promote perineurial glial growth in *Drosophila* peripheral nerves. *J Neurosci* **27**:279-288.
- Lazo PA** (2007). Functional implications of tetraspanin proteins in cancer biology. *Cancer Sci* **98**:1666-1677.
- Lee BP, Jones BW** (2005). Transcriptional regulation of the *Drosophila* glial gene repo. *Mech Dev* **122**:849-862.
- Lee YS, Carthew RW** (2003). Making a better RNAi vector for *Drosophila*: use of intron spacers. *Methods* **30**:322-329.
- Leevers SJ, Weinkove D, MacDougall LK, Hafen D, Waterfield MD** (1996). The *Drosophila* phosphoinositide 3-kinase Dp110 promotes cell growth. *EMBO J* **15**:6584-6594.
- Lehre KP, Levy LM, Ottersen OP, Storm-Mathisen J, Danbolt NC** (1995). Differential expression of two glial glutamate transporters in the rat brain: quantitative and immunocytochemical observations. *J Neurosci* **15**:1835-1853.
- Li B, Carey M, Workman JL** (2007). The role of chromatin during transcription. *Cell* **128**:707-719.
- Li J, Ballif BA, Powelka AM, Dai J, Gygi SP, Hsu VW** (2005). Phosphorylation of ACAP1 by Akt regulates the stimulation - dependent recycling of integrin beta1 to control cell migration. *Dev Cell* **9**:663-673.
- Li J, Yen C, Liaw D, Podsypanina K, Bose S, Wang SI, Puc J, Miliarensis C, Rodgers L, McCombie R, Bigner SH, et al.** (1997). PTEN, a putative protein tyrosine phosphatase gene mutated in human brain, breast, and prostate cancer. *Science* **275**:1943-1947.
- Li X, Qin J** (2005). Modulation of Toll-interleukin 1 receptor mediated signaling. *J Mol Med* **83**:258-266.
- Lindsley DL, Zimm GG** (1992). The genome of *Drosophila melanogaster*. Academic Press, San Diego, CA.
- Liu L, He B, Liu WM, Zhou D, Cox JV, Zhang XA** (2007). Tetraspanin CD151 promotes cell migration by regulating integrin trafficking. *J Biol Chem* **282**:31631-31642.
- Liu Y, Lehmann M** (2006). FOXO-independent suppression of programmed cell death by the PI3K/Akt signaling pathway in *Drosophila*. *Dev Genes Evol* **216**:531-535.
- Liu Y, Rao MS** (2004). Glial progenitors in the CNS and possible lineage relationships among them. *Biol Cell* **96**:279-290.
- Lo EH, Wang X, Cuzner ML** (2002). Extracellular proteolysis in brain injury and inflammation: role for plasminogen activators and matrix metalloproteinases. *J Neurosci Res* **69**:1-9.

- Logan CY, Nusse R** (2004). The Wnt signaling pathway in development and disease. *Annu Rev Cell Dev Biol* **20**:781-810.
- Lokker NA, Sullivan CM, Hollenbach SJ, Israel MA, Giese NA** (2002). Platelet-derived growth factor (PDGF) autocrine signaling regulates survival and mitogenic pathways in glioblastoma cells: evidence that the novel PDGF-C and PDGF-D ligands may play a role in the development of brain tumors. *Cancer Res* **62**:3729-3735.
- Louis DN, Ohgaki H, Wiestler OD, Cavenee WK, Burger PC, Jouvet A, Scheithauer BW, Kleihues P** (2007). The 2007 WHO classification of tumours of the central nervous system. *Acta Neuropathol* **114**:97-109.
- Lumsden A, Krumlauf R** (1996). Patterning the vertebrate neuraxis. *Science* **274**:1109-1115.
- Maehama T, Dixon JE** (1998). The tumor suppressor, PTEN/MMAC1, dephosphorylates the lipid second messenger, phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate. *J Biol Chem* **273**:13375-13378.
- Mandel M, Higa A** (1970). Calcium-dependent bacteriophage DNA infection. *J Mol Biol* **53**:159-162.
- Mandeville JT, Lawson MA, Maxfield FR** (1997). Dynamic imaging of neutrophil migration in three dimensions: mechanical interactions between cells and matrix. *J Leukoc Biol* **61**:188-200.
- Manning BD, Cantley LC** (2007). AKT/PKB signaling:navigating downstream. *Cell* **129**:1261-1274.
- Marshall CJ** (1995). Specificity of receptor tyrosine kinase signaling:transient versus sustained extracellular signal-regulated kinase activation. *Cell* **80**:179-185.
- Mazzocca A, Carloni V, Sciammetta S, Cordella C, Pantaleo P, Caldini A, Gentilini P, Pinzani M** (2002). Expression of transmembrane 4 superfamily (TM4SF) proteins and their role in hepatic stellate cell motility and wound healing migration. *J Hepatol* **37**:322-330.
- McConnell SK** (1995). Constructing the cerebral cortex:neurogenesis and fate determination. *Neuron* **15**:761-768.
- McGregor F, Muntoni A, Fleming J, Brown J, Felix DH, MacDonald DG, Parkinson EK, Harrison PR** (2002). Molecular changes associated with oral dysplasia progression and acquisition of immortality: potential for its reversal by 5-azacytidine. *Cancer Res* **62**:4757-4766.
- Meyer S, LaBudda K, McGlade J, Hayman MJ** (1994). Analysis of the role of the Shc and Grb2 proteins in signal transduction by the v-ErbB protein. *Mol Cell Biol* **14**:3253-3262.
- Michelson AM, Gisselbrecht S, Buff E, Skeath JB** (1998). Heartbroken is a specific downstream mediator of FGF receptor signalling in *Drosophila*. *Development* **125**:4379-4389.
- Min KT, Benzer S** (1999). Preventing neurodegeneration in the *Drosophila* mutant *bubblegum*. *Science* **284**:1985-1988.
- Mito Y, Henikoff JG, Henikoff S** (2005). Genome-scale profiling of histone H3.3 replacement patterns. *Nat Genet* **37**:1090-1097.
- Miyake M, Nakano K, Itoi SI, Koh T, Taki T** (1996). Motility-related protein-1 (MRP-1/CD9) reduction as a factor of poor prognosis in breast cancer. *Cancer Res* **56**:1244-1249.
- Moghal N, Sternberg PW** (1999). Multiple positive and negative regulators of signaling by the EGF-receptor. *Curr Opin Cell Biol* **11**:190-196.
- Montecucco F, Steffens S, Burger F, Da Costa A, Bianchi G, Bertolotto M, Mach F, Dallegri F, Ottonello L** (2008). Tumor necrosis factor-alpha (TNF-alpha) induces integrin CD11b/CD18 (Mac-1) up-regulation and

migration to the CC chemokine CCL3 (MIP-1 α) on human neutrophils through defined signalling pathways. *Cell Signal* **20**:557-568.

Montell DJ (2006). The social lives of migrating cells in *Drosophila*. *Curr Opin Genet Dev* **16**:374-383.

Morest DK, Silver J (2003). Precursors of neurons, neuroglia, and ependymal cells in the CNS: what are they? Where are they from? How do they get where they are going? *Glia* **43**:6-18.

Morrison RS, Yamaguchi F, Saya H, Bruner JM, Yahanda AM, Donehower LA, Berger M (1994). Basic fibroblast growth factor and fibroblast growth factor receptor I are implicated in the growth of human astrocytomas. *J Neurooncol* **18**:207-216.

Mrass P, Weninger W (2006). Immune cell migration as a means to control immune privilege: lessons from the CNS and tumors. *Immunol Rev* **213**:195-212.

Mullis KB (1990). Target amplification for DNA analysis by the polymerase chain reaction. *Ann Biol Clin* **48**:579-582.

Muqit MMK, Feany MB (2002). Modelling neurodegenerative diseases in *Drosophila*: a fruitful approach? *Nat Rev Neurosci* **3**:237-243.

Murakami S, Umetsu D, Maeyama Y, Sato M, Yoshida S, Tabata T (2007). Focal adhesion kinase controls morphogenesis of the *Drosophila* optic stalk. *Development* **34**:1539-1548.

Murayama Y, Shinomura Y, Oritani K, Miyagawa J, Yoshida H, Nishida M, Katsube F, Shiraga M, Miyazaki T, et al. (2008). The tetraspanin CD9 modulates epidermal growth factor receptor signaling in cancer cells. *J Cell Physiol* **216**:135-143.

Murphy LO, Smith S, Chen RH, Fingar DC, Blenis J (2002). Molecular interpretation of ERK signal duration by immediate early gene products. *Nat Cell Biol* **4**:556-564.

Murthy SS, Tosolini A, Taguchi T, Testa JR (2000). Mapping of AKT3, encoding a member of the Akt/protein kinase B family, to human and rodent chromosomes by fluorescence in situ hybridization. *Cytogenet Cell Genet* **88**:38-40.

Nave KA, Salzer JL (2006). Axonal regulation of myelination by neuregulin1. *Curr Opin Neurobiol* **16**:492-500.

Nellaiappan K, Risitano A, Liu G, Nicklas G, Kagan HM (2000). Fully processed lysyl oxidase catalyst translocates from the extracellular space into nuclei of aortic smooth muscle cells. *J Cell Biochem* **79**:576-582.

Neuhoff V, Stamm R, Eibl H (1985). Clear background and highly sensitive protein staining with Coomassie Blue dyes in polyacrylamide gels: A systematic analysis. *Electrophoresis* **6**:427-448.

Nicholson KM, Anderson NG (2002). The protein kinase B/Akt signaling pathway in human malignancy. *Cell Signal* **14**:381-395.

Nishiuchi R, Sanzen N, Nada S, Sumida Y, Wada Y, Okada M, Takagi J, Hasegawa H, Sekiguchi K (2005). Potentiation of the ligand-binding activity of integrin $\alpha 3\beta 1$ via association with tetraspanin CD151. *Proc Natl Acad Sci USA* **102**:1939-1944.

Nishizaki T, Ozaki S, Harada K, Ito H, Arai H, Beppu T, Sasaki K (1998). Investigation of genetic alterations associated with the grade of astrocytic tumor by comparative genomic hybridization. *Genes Chromosom Cancer* **21**:340-346.

Novak U, Kaye AH (2000). Extracellular matrix and the brain: components and function. *J Clin Neurosci* **7**:280-290.

- Ohgaki H, Kleihues P** (2005a). Epidemiology and etiology of gliomas. *Acta Neuropathol* **109**:93-108.
- Ohgaki H, Kleihues P** (2005b). Population-based studies on incidence, survival rates, and genetic alterations in astrocytic and oligodendroglial gliomas. *J Neuropathol Exp Neurol* **64**:479-489.
- Ohgoda O, Sakai A, Koga H, Kanai K, Miyazaki T, Niwano Y** (1998). Fibroblast-migration in a wound model of ascorbic acid-supplemented three-dimensional culture system: the effects of cytokines and malotilate, a new wound healing stimulant, on cell migration. *J Dermatol Sci* **17**:123-131.
- Ohtani M, Nagai S, Kondo S, Mizuno S, Nakamura K, Tanabe M, Takeuchi T, Matsuda S, Koyasu S** (2008). mTOR and GSK3 differentially regulate LPS-induced IL-12 production in dendritic cells. *Blood* May 20 [Epub ahead of print].
- Old RW, Primose SB** (1981). *Gentechnologie. 1. Aufl., Thieme Verlag Stuttgart, New York.*
- Oldham S, Stocker H, Laffargue M, Wittwer F, Wymann M, Hafen E** (2002). The *Drosophila* insulin/IGF receptor controls growth and size by modulating PtdInsP(3) levels. *Development* **129**:4103-4109.
- Olofsson B, Page DT** (2005) Condensation of the central nervous system in embryonic *Drosophila* is inhibited by blocking hemocyte migration or neural activity. *Dev Biol* **279**:233-243.
- Orme MH, Alrubaie S, Bradley GL, Walker CD, Leever SJ** (2006). Input from Ras is required for maximal PI(3)K signalling in *Drosophila*. *Nat Cell Biol* **8**:1298-1302.
- Orr-Urtreger A, Lonai P** (1992). Platelet-derived growth factor-A and its receptor are expressed in separate but adjacent cell layers of the mouse embryo. *Development* **115**:1045-105.
- Padgett RW, Wozney JM, Gelbart WM** (1993). Human BMP sequences can confer normal dorsal-ventral patterning in the *Drosophila* embryo. *Proc Natl Acad Sci USA* **90**:2905-2909.
- Pagliarini RA, Xu T** (2003). A genetic screen in *Drosophila* for metastatic behavior. *Science* **302**:1227-1231.
- Pathirana S, Zhao D, Bownes M** (2001). The *Drosophila* RGS protein Loco is required for dorsal/ventral axis formation of the egg and embryo, and nurse cell dumping. *Mech Dev* **109**:137-150.
- Paulus W, Huettnner C, Tonn JC** (1994). Collagens, integrins and the mesenchymal drift in glioblastomas:a comparison of biopsy specimens, spheroid and early monolayer cultures. *Int J Cancer* **58**:841-846.
- Payne SL, Fogelgren B, Hess AR, Seftor EA, Wiley EL, Fong SF, Csiszar K, Hendrix MJ, Kirschmann DA** (2005). Lysyl oxidase regulates breast cancer cell migration and adhesion through a hydrogen peroxide-mediated mechanism. *Cancer Res* **65**:11429-11436.
- Pellegrino RG, Spencer PS, Ritchie JM** (1984). Sodium channels in the axolemma of unmyelinated axons:a new estimate. *Brain Res* **305**:357-360.
- Pilkington GJ** (1994). Tumour cell migration in the central nervous system. *Brain Pathol* **4**:157-166.
- Plowman GD, Sudarsanam S, Bingham J, Whyte D, Hunter T** (1999). The protein kinases of *Caenorhabditis elegans*: a model for signal transduction in multicellular organisms. *Proc Natl Acad Sci USA* **96**:13603-13610.
- Politi K, Zakowski MF, Fan PD, Schonfeld EA, Pao W, Varmus HE** (2006). Lung adenocarcinomas induced in mice by mutant EGF receptors found in human lung cancers respond to a tyrosine kinase inhibitor or to down-regulation of the receptors. *Genes Dev* **20**:1496-1510.
- Potter CJ, Turenchalk GS, Xu T** (2000). *Drosophila* in cancer research. An expanding role. *Trends Genet* **16**:33-39.
- Prados MD, Levin V** (2000). Biology and treatment of malignant glioma. *Semin Oncol* **27**:1-10.

- Qiu D, Mao L, Kikuchi S, Tomita M** (2004). Sustained MAPK activation is dependent on continual NGF receptor regeneration. *Dev Growth Differ* **46**:393-403.
- Queenan AM, Ghabrial A, Schüpbach T** (1997). Ectopic activation of torpedo/Egfr, a *Drosophila* receptor tyrosine kinase, dorsalizes both the eggshell and the embryo. *Development* **124**:3871-3880.
- Rangarajan R, Gong Q, Gaul U** (1999). Migration and function of glia in the developing *Drosophila* eye. *Development* **126**:3285-3292.
- Reiter LT, Potocki L, Chien S, Gribskov M, Bier E** (2001). A systematic analysis of human disease-associated gene sequences in *Drosophila melanogaster*. *Genome Res* **11**:1114-1125.
- Reya T, Morrison SJ, Clarke MF, Weissman IL** (2001). Stem cells, cancer, and cancer stem cells. *Nature* **414**:105-111.
- Rhee SH, Kim H, Moyer MP, Pothoulakis C** (2006). Role of MyD88 in phosphatidylinositol 3-kinase activation by flagellin/toll-like receptor 5 engagement in colonic epithelial cells. *J Biol Chem* **281**:18560-18568.
- Ribeiro C, Petit V, Affolter M** (2003). Signaling systems, guided cell migration, and organogenesis: insights from genetic studies in *Drosophila*. *Dev Biol* **260**:1-8.
- Riese, J, Tremml G, Bienz M** (1997). D-Fos, a target gene for Decapentaplegic signalling with a critical role during *Drosophila* endoderm induction. *Development* **124**:3353-3361.
- Rikke BA, Murakami S, Johnson TE** (2000). Paralogy and orthology of tyrosine kinases that can extend the life span of *Caenorhabditis elegans*. *Mol Biol Evol* **17**:671-683.
- Rintelen F, Stocker H, Thomas G, Hafen E** (2001). PDK1 regulates growth through Akt and S6K in *Drosophila*. *Proc Natl Acad Sci USA* **98**:15020-15025.
- Roberts RJ** (1983). Restriction and modification enzymes and their recognition sequences. *Nucleic Acids Res* **11**:135-167.
- Robinson DR, Wu YM, Lin SF** (2000). The protein tyrosine kinase family of the human genome. *Oncogene* **19**:5548-5557.
- Rodríguez C, Martínez-González J, Raposo B, Alcudia JF, Guadall A, Badimon L** (2008). Regulation of lysyl oxidase in vascular cells: lysyl oxidase as a new player in cardiovascular diseases. *Cardiovasc Res* May 9 [Epub ahead of print].
- Rodriguez-Viciana P, Warne PH, Dhand R, Vanhaesebroeck B, Gout I, Fry MJ, Waterfield MD, Downward J** (1994). Phosphatidylinositol-3-OH kinase as a direct target of Ras. *Nature* **370**:527-532.
- Rodriguez-Viciana P, Warne PH, Khwaja A, Marte BM, Pappin D, Das P, Waterfield MD, Ridley A, Downward J** (1997). Role of phosphoinositide 3-OH kinase in cell transformation and control of the actin cytoskeleton by Ras. *Cell* **89**:457-467.
- Rohrbaugh M, Ramos E, Nguyen D, Price M, Wen Y, Lai ZC** (2002). Notch activation of yan expression is antagonized by RTK/Pointed signaling in the *Drosophila* eye. *Curr Biol* **12**:576-581.
- Rosin D, Schejter E, Volk T, Shilo B** (2004). Apical accumulation of the *Drosophila* PDGF/VEGF receptor ligands provides a mechanism for triggering localized actin polymerization. *Development* **131**:1939-1948.
- Rothstein JD, Martin L, Levey AI, Dykes-Hoberg M, Jin L, Wu D, Nash N, Kuncel RW** (1994). Localization of neuronal and glial glutamate transporters. *Neuron* **13**:713-725.

- Rubin GM, Yandell MD, Wortman JR, Gabor Miklos GL, Nelson CR, Hariharan IK, Fortini ME, Li PW et al.** (2000). Comparative genomics of the eukaryotes. *Science* **287**:2204-15.
- Ruden DM, Rasouli P, Lu X** (2007). Potential long-term consequences of fad diets on health, cancer, and longevity: lessons learned from model organism studies. *Technol Cancer Res Treat* **6**:247-254.
- Saltiel AR, Kahn CR** (2001). Insulin signalling and the regulation of glucose and lipid metabolism. *Nature* **414**:799-806.
- Sambrook J, MacCallum P, Russell D** (2001). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (3rd Edition). Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- Samuels Y, Ericson K** (2006). Oncogenic PI3K and its role in cancer. *Curr Opin Oncol* **18**:77-82.
- Sanger F, Air GM, Barrell BG, Brown NL, Coulson AR, Fiddes CA, Hutchison CA, Slocombe PM, Smith M** (1977). Nucleotide sequence of bacteriophage phi X174 DNA. *Nature* **265**:687-695.
- Sansal I, Sellers WR** (2004). The biology and clinical relevance of the PTEN tumour suppressor pathway. *J Clin Oncol* **22**:2954-2963.
- Santos AC, Lehmann R** (2004). Germ cell specification and migration in *Drosophila* and beyond. *Curr Biol* **14**:578-589.
- Sarkar SN, Peters KL, Elco CP, Sakamoto S, Pal S, Sen GC** (2004). Novel roles of TLR3 tyrosine phosphorylation and PI3 kinase in double-stranded RNA signaling. *Nat Struct Mol Biol* **11**:1060-1067.
- Schaeffer E, Smith D, Mardon G, Quinn W, Zuker CS** (1989). Isolation and characterization of two new *Drosophila* protein kinase C genes, including one specifically expressed in photoreceptor cells. *Cell* **57**: 403-412.
- Schlessinger J** (2004). Common and distinct elements in cellular signaling via EGF and FGF receptors. *Science* **306**:1506-1507.
- Schlessinger J.** (2000). Cell signaling by receptor tyrosine kinases. *Cell* **103**:211-225.
- Schnepf B, Grumblin G, Donaldson T, Simcox A** (1996). Vein is a novel component in the *Drosophila* epidermal growth factor receptor pathway with similarity to the neuregulins. *Genes Dev* **10**:2302-2313.
- Schwabe T, Bainton RJ, Fetter RD, Heberlein U, Gaul U** (2005). GPCR signaling is required for blood-brain barrier formation in *Drosophila*. *Cell* **123**:133-144.
- Sehgal A** (1998). Molecular changes during the genesis of human gliomas. *Semin Surg Oncol* **14**:3-12.
- Sepp KJ, Auld VJ** (2003). RhoA and Rac1 GTPases mediate the dynamic rearrangement of actin in peripheral glia. *Development* **130**:1825-1835.
- Sepp KJ, Schulte J, Auld VJ** (2001). Peripheral glia direct axon guidance across the CNS/PNS transition zone. *Dev Biol* **238**:47-63.
- Shaw RJ, Cantley LC** (2006). Ras, PI(3)K, and mTOR signalling controls tumour cell growth. *Nature* **441**:424-430.
- Sheng M, Greenberg ME** (1990). The regulation and function of c-fos and other immediate early genes in the nervous system. *Neuron* **4**:477-485.
- Shi W, Fan H, Shum L, Derynck R** (2000). The tetraspanin CD9 associates with transmembrane TGF- α and regulates TGF- α -induced EGF receptor activation and cell proliferation. *J Cell Biol* **148**:591-602.

- Shilo BZ** (2005). Regulating the dynamics of EGF receptor signaling in space and time. *Development* **132**:4017-4027.
- Sibilia M, Kroismayr R, Lichtenberger BM, Natarajan A, Hecking M, Holcman M** (2007). The epidermal growth factor receptor: from development to tumorigenesis. *Differentiation* **75**:770-787.
- Silar P, Koll F, Rossignol M** (1997) Cytosolic ribosomal mutations that abolish accumulation of circular intron in the mitochondria without preventing senescence of *Podospora anserina*. *Genetics* **145**:697-705.
- Silies M, Yuva Y, Engelen D, Aho A, Stork T, Klämbt C** (2007). Glial cell migration in the eye disc. *J Neurosci* **27**:13130-13139.
- Somanath PR, Kandel ES, Hay N, Byzova TV** (2007). Akt1 signaling regulates integrin activation, matrix recognition, and fibronectin assembly. *J Biol Chem* **282**:22964-22976.
- Staal SP** (1987). Molecular cloning of the akt oncogene and its human homologues AKT1 and AKT2: amplification of AKT1 in a primary human gastric adenocarcinoma. *Proc Natl Acad Sci USA* **84**:5034-5037.
- Stambolic V, Suzuki A, de la Pompa JL, Brothers GM, Mirtsos C, Sasaki T, Ruland J, Penninger JM, Siderovski DP, Mak TW** (1998). Negative regulation of PKB/Akt-dependent cell survival by the tumor suppressor PTEN. *Cell* **95**:29-39.
- Stambolic V, Woodgett JR** (2006). Functional distinctions of protein kinase B/Akt isoforms defined by their influence on cell migration. *Trends Cell Biol* **16**:461-466.
- Starz-Gaiano M, Montell D** (2004). Genes that drive invasion and migration in *Drosophila*. *Curr Opin Genet Dev* **14**: 86-91.
- Steffan JS, Bodai L, Pallos J, Poelman M, McCampbell A, Apostol BL, Kazantsev A, Schmidt E, Zhu YZ, et al.** (2001). Histone deacetylase inhibitors arrest polyglutamine-dependent neurodegeneration in *Drosophila*. *Nature* **413**:739-743.
- Stemple DL, Anderson DJ** (1992) Isolation of a stem cell for neurons and glia from the mammalian neural crest. *Cell* **71**:973-985.
- Stork T, Engelen D, Krudewig A, Silies M, Bainton RJ, Klämbt C** (2008). Organization and Function of the Blood-Brain Barrier in *Drosophila*. *J Neuroscience* **28**:587-597.
- Streit WJ** (2002). Microglia as neuroprotective, immunocompetent cells of the CNS. *Glia* **40**:133-139.
- Subramanian A, Mokbel K** (2008). The role of Herceptin in early breast cancer. *Int Semin Surg Oncol* **28**:5:9.
- Suga H, Kuma K, Iwabe N, Nikoh N, Ono K, Koyanagi M, Hoshiyama D, Miyata T** (1997). Intermittent divergence of the protein tyrosine kinase family during animal evolution. *FEBS Lett* **412**:540-546.
- Sulis ML, Parsons R** (2003). PTEN: from pathology to biology. *Trends Cell Biol* **13**:478-483.
- Sutherland D, Samakovlis C, Krasnow MA** (1996). Branchless encodes a *Drosophila* FGF homolog that controls tracheal cell migration and the pattern of branching. *Cell* **87**:1091-1101.
- Suzuki A, de la Pompa JL, Stambolic V, Elia AJ, Sasaki T, del Barco Barrantes I, Ho A, Wakeham A, Itie A, Khoo W, Fukumoto M, Mak TW** (1998). High cancer susceptibility and embryonic lethality associated with mutation of the PTEN tumor suppressor gene in mice. *Curr Biol* **8**:1169-1178.
- Takakura N, Yoshida H, Ogura Y, Kataoka H, Nishikawa S, Nishikawa S** (1997). PDGFR alpha expression during mouse embryogenesis: immunolocalization analyzed by whole-mount immunohistostaining using the monoclonal anti-mouse PDGFR alpha antibody APA5. *J Histochem Cytochem* **45**:883-893.

- Tapon N, Ito N, Dickson BJ, Treisman JE, Hariharan IK** (2001). The *Drosophila* tuberous sclerosis complex gene homologs restrict cell growth and cell proliferation. *Cell* **105**:345-355.
- Tatenhorst L, Püttmann S, Senner V, Paulus W** (2005). Genes associated with fast glioma cell migration *in vitro* and *in vivo*. *Brain Pathol* **15**:46-54.
- Tatenhorst L, Senner V, Püttmann S, Paulus W** (2004). Regulators of G-Protein Signaling 3 and 4 (RGS3, RGS4) Are Associated with Glioma Cell Motility. *J Neuropathol Exp Neurol* **63**:210-222.
- Tautz D, Pfeifle C** (1989). A non-radioactive *in situ* hybridization method for the localization of specific RNAs in *Drosophila* embryos reveals translational control of the segmentation gene hunchback. *Chromosoma* **98**:81-85.
- Tepass U, Fessler LI, Aziz A, Hartenstein V** (1994). Embryonic origin of hemocytes and their relationship to cell death in *Drosophila*. *Development* **120**:1829-1837.
- Tepass U, Tanentzapf G, Ward R, Fehon R** (2001). Epithelial cell polarity and cell junctions in *Drosophila*. *Annu Rev Genet* **35**:747-784.
- Testa JR, Bellacosa A** (2001). AKT plays a central role in tumorigenesis. *Proc Natl Acad Sci USA* **98**:10983-10985.
- Todres E, Nardi JB, Robertson HM** (2000). The tetraspanin superfamily in insects. *Insect Mol Biol* **9**:581-590.
- Toker A, Yoeli-Lerner M** (2006). Akt signaling and cancer: surviving but not moving on. *Cancer Res* **66**:3963-3966.
- Tso CL, Freije WA, Day A, Chen Z, Merriman B, Perlina A, Lee Y, Dia EQ, Yoshimoto K, Mischel PS, Liao LM, et al.** (2006). Distinct transcription profiles of primary and secondary glioblastoma subgroups. *Cancer Res* **66**:159-167.
- Uhlirva M, Jasper H, Bohmann D** (2005). Non-cell-autonomous induction of tissue overgrowth by JNK/Ras cooperation in a *Drosophila* tumor model. *Proc Natl Acad Sci USA* **102**:13123-13128.
- Uhm JH, Gladson CL, Rao JS** (1999). The role of integrins in the malignant phenotype of gliomas. *Front Biosci* **4**:188-199.
- Ulkü AS, Der CJ** (2003). Ras signaling, deregulation of gene expression and oncogenesis. *Cancer Treat Res* **115**:189-208.
- Ullrich A, Schlessinger J** (1990). Signal transduction by receptors with tyrosine kinase activity. *Cell* **61**:203-212.
- Umetsu D, Murakami S, Sato M, Tabata T** (2006). The highly ordered assembly of retinal axons and their synaptic partners is regulated by Hedgehog/Single-minded in the *Drosophila* visual system. *Development* **133**:791-800.
- Urban S, Lee JR, Freeman M** (2002). A family of Rhomboid intramembrane proteases activates all *Drosophila* membrane-tethered EGF ligands. *EMBO J* **21**:4277-4286.
- Valentinis B, Baserga R** (2001). IGF-I receptor signalling in transformation and differentiation. *Mol Pathol* **54**:133-137.
- Van Hooser A, Goodrich DW, Allis CD, Brinkley BR, Mancini MA** (1998). Histone H3 phosphorylation is required for the initiation, but not maintenance, of mammalian chromosome condensation. *J Cell Sci* **111**:3497-3506.

- Vanhaesebroeck B, Jones GE, Allen WE, Zicha D, Hooshmand-Rad R, Sawyer C, Wells C, Waterfield MD, Ridley AJ** (1999). Distinct PI(3)Ks mediate mitogenic signalling and cell migration in macrophages. *Nat Cell Biol* **1**:69-71.
- Vanhaesebroeck B, Leervers SJ, Ahmadi K, Timms J, Katso R, Driscoll PC, Woscholski R, Parker PJ, Waterfield MD** (2001). Synthesis and function of 3-phosphorylated inositol lipids. *Annu Rev Biochem* **70**:535-602.
- Varela M, Ranuncolo SM, Morand A, Lastiri J, De Kier Joffé EB, Puricelli LI, Pallotta MG** (2004). EGF-R and PDGF-R, but not bcl-2, overexpression predict overall survival in patients with low-grade astrocytomas. *J Surg Oncol* **86**:34-40.
- Verdu J, Buratovich MA, Wilder EL, Birnbaum MJ** (1999). Cell-autonomous regulation of cell and organ growth in *Drosophila* by Akt/PKB. *Nat Cell Biol* **1**:500-506.
- Vidal M, Cagan RL** (2006). *Drosophila* models for cancer research. *Curr Opin Genet Dev* **16**:10-16.
- Vidal M, Wells S, Ryan A, Cagan R** (2005). ZD6474 suppresses oncogenic RET isoforms in a *Drosophila* model for type 2 multiple endocrine neoplasia syndromes and papillary thyroid carcinoma. *Cancer Res* **65**:3538-3541.
- Virchow R** (1858). Die Cellularpathologie in ihrer Begründung auf physiologische und pathologische Gewebelehre. *Berlin, Hrsg. August Hirschwald*.
- Vivanco I, Sawyers CL** (2002). The phosphatidylinositol 3-kinase/AKT pathway in human cancer. *Nat Rev Cancer* **2**:489-501.
- Vogelstein B, Kinzler KW** (1993). The multistep nature of cancer. *Trends Genet* **9**:138-141.
- Walker EH, Pacold ME, Perisic O, Stephens L, Hawkins PT, Wymann MP, Williams RL** (2000). Structural determinants of Phosphoinositide3-Kinase inhibition by Wortmannin, LY294002, quercetin, myricetin, and staurosporine. *Mol Cell* **6**:909-919.
- Ward WH, Cook PN, Slater AM, Davies DH, Holdgate GA, Green LR** (1994). Epidermal growth factor receptor tyrosine kinase. Investigation of catalytic mechanism, structure-based searching and discovery of a potent inhibitor. *Biochem Pharmacol* **48**:659-666.
- Watanabe K, Sato K, Biernat W, Tachibana O, von Ammon K, Ogata N, Yonekawa Y, Kleihues P, Ohgaki H** (1997). Incidence and timing of p53 mutations during astrocytoma progression in patients with multiple biopsies. *Clin Cancer Res* **3**:523-530.
- Wehrli M, DiAntonio A, Fearnley IM, Smith RJ, Wilcox M** (1993). Cloning and characterization of $PS1$, a novel *Drosophila melanogaster* integrin. *Mech Dev* **43**:21-36.
- Wei Y, Yu L, Bowen J, Gorovsky MA, Allis CD** (1999). Phosphorylation of histone H3 is required for proper chromosome condensation and segregation. *Cell* **97**:99-109.
- Wen PY, Loeffler JS** (2000). Brain metastases. *Curr Treat Options Oncol* **1**:4474-4458.
- Westermark B, Heldin CH, Nistér M** (1995). Platelet-derived growth factor in human glioma. *Glia* **15**:257-263.
- Whitehurst A, Cobb MH, White MA** (2004). Stimulus-coupled spatial restriction of extracellular signal regulated kinase 1/2 activity contributes to the specificity of signal-response pathways. *Mol Cell Biol* **24**:10145-10150.
- Willars GB** (2006). Mammalian RGS proteins: multifunctional regulators of cellular signalling. *Semin Cell Dev Biol* **17**:363-376.
- Winnacker EL** (1990). Gene und Klone. Eine Einführung in die Gentechnologie. 3. veränderter Nachdruck, Verlag Chemie Weinheim, Deerfield Beach, Florida, Basel.

- Wittmann CW, Wszolek MF, Shulman JM, Salvaterra PM, Lewis J, Hutton M, Feany MB** (2001). Tauopathy in *Drosophila*: neurodegeneration without neurofibrillary tangles. *Science* **293**:711-714.
- Wodarz A, Hinz U, Engelbert M, Knust E** (1995). Expression of *crumbs* confers apical character on plasma membrane domains of ectodermal epithelia of *Drosophila*. *Cell* **82**:67-76.
- Wood W, Faria C, Jacinto A** (2006). Distinct mechanisms regulate hemocyte chemotaxis during development and wound healing in *Drosophila melanogaster*. *J Cell Biol* **173**:405-416.
- Woodhouse E, Hersperger E, Shearn A** (1998). Growth, metastasis, and invasiveness of *Drosophila* tumours caused by mutations in specific tumour suppressor genes. *Dev Genes Evol* **207**:542-550.
- Wymann MP, Bulgarelli-Leva G, Zvelebil MJ, Pirola L, Vanhaesebroeck B, Waterfield MD, Panayotou G** (1996). Wortmannin inactivates phosphoinositide 3-kinase by covalent modification of Lys-802, a residue involved in the phosphate transfer reaction. *Mol Cell Biol* **16**:1722-1733.
- Xu T, Rubin GM** (1993). Analysis of genetic mosaics in developing and adult *Drosophila* tissues. *Development* **117**:1223-1237.
- Yamazaki D, Kurisu S, Takenawa T** (2005). Regulation of cancer cell motility through actin reorganization. *Cancer Sci* **96**:379-386.
- Yang L, Dan HC, Sun M, Liu Q, Sun XM, Feldman RI, Hamilton AD, Polokoff M, Nicosia SV, Herlyn M, Sefti SM, Cheng JQ** (2004). Akt/protein kinase B signaling inhibitor-2, a selective small molecule inhibitor of Akt signaling with antitumor activity in cancer cells overexpressing Akt. *Cancer Res* **64**:4394-4399.
- Yarden Y, Sliwkowski M** (2001). Untangling the ErbB signalling network. *Nat Rev Mol Cell Biol* **2**:127-137.
- Yoeli-Lerner M, Yiu GK, Rabinovitz I, Erhardt P, Jauliac S, Toker A** (2005). Akt blocks breast cancer cell motility and invasion through the transcription factor NFAT. *Mol Cell* **20**:539-550.
- Yu F, Wang H, Qian H, Kaushik R, Bownes M, Yang X, Chia W** (2005). Locomotion defects, together with Pins, regulates heterotrimeric G-protein signaling during *Drosophila* neuroblast asymmetric divisions. *Genes Dev* **19**:1341-1353.
- Zhao B, Fisher BJ, St Clair RW, Rudel LL, Ghosh S** (2005). Redistribution of macrophage cholesteryl ester hydrolase from cytoplasm to lipid droplets upon lipid loading. *J Lipid Res* **46**:2114-21.

7 Abbildungsverzeichnis

Abb. 1.1:	Schematische Darstellung einer Larve des dritten Larvenstadiums mit Gehirn und Imaginalscheiben.	9
Abb. 1.2:	Schematischer Querschnitt durch die Augenimaginalscheibe einer Larve des dritten Larvalstadiums.	11
Abb. 1.3:	Schematische Darstellung eines Querschnitts durch einen peripheren Nerv einer L3-Larve.	12
Abb. 1.4:	Domänenstruktur von EGFR und PDGFR des Menschen und der <i>Drosophila</i> -Homologe.	16
Abb. 1.5:	Vereinfachtes Schema der Interaktion zwischen Rezeptortyrosinkinasen und ihren Effektoren PI3K und Ras.	17
Abb. 2.1:	Einfluss von DMSO auf die Vitalität von <i>Drosophila</i> .	38
Abb. 3.1:	Das ZNS von L3-Larven, die einzelne Transgene in Gliazellen exprimieren.	68
Abb. 3.2:	Das ZNS von L3-Larven mit simultaner Deregulation von zwei Genen.	69
Abb. 3.3:	Augenimaginalscheiben aus Larven mit Deregulation einzelner Gene in Gliazellen.	73
Abb. 3.4:	Statistische Verteilung der Phänotypen von Augenimaginalscheiben aus Larven mit Deregulation der Zielgene.	74
Abb. 3.5:	Anzahl der Gliazellen verschiedener Genotypen in Augenimaginalscheiben unterschiedlichen Alters.	75
Abb. 3.6:	Querschnitt durch den optischen Stiel von L3-Larven, die einzelne Transgene mit dem Gal4-Treiber <i>repo</i> exprimieren.	76
Abb. 3.7:	Augenscheiben aus Larven mit simultaner Deregulation von zwei Genen.	80
Abb. 3.8:	In der Augenimaginalscheibe gibt es zwei gliale Zellkerne, die sich von den übrigen aufgrund ihrer Größe unterscheiden.	82
Abb. 3.9:	Visualisierung der Morphologie und Position der Carpet Glia durch ektopisch exprimiertes GFP.	82

Abb. 3.10:	Morphologie und Position der Carpet Glia sind in Augenscheiben mit Migrationsphänotyp anders als im Wildtyp.	85
Abb. 3.11:	Akt1 beeinflusst die Gliazellzahl in der Augenimaginalscheibe.	86
Abb. 3.12:	RNA Interferenz-vermittelte Verringerung der Expression von <i>PTEN</i> in Gliazellen resultiert in morphologischen Aberrationen der peripheren Nerven.	87
Abb. 3.13:	Das Nervensystem einer Larve von <i>Drosophila</i> des dritten Larvenstadiums als schematische Darstellung und in einer mikroskopischen Aufnahme.	88
Abb. 3.14:	Statistische Bestimmung der Gliazellzahl in den peripheren Nerven des Wildtyps mit verschiedenen Methoden.	89
Abb. 3.15:	Quantifikation der Gliazellkerne in den peripheren Nerven von Wildtyp und Larven mit einem RNA Interferenz-induzierten <i>knock down</i> von PTEN.	90
Abb. 3.16:	Augenimaginalscheiben aus Larven mit ektopische Expression von <i>ras</i> ^{64B} alleine und in Kombination mit <i>λtop</i> , <i>PI3K</i> ^{92E} und <i>Akt1</i> .	92
Abb. 3.17:	Simultane Expression von <i>λtop</i> und <i>PI3K</i> ^{92E} in Gliazellen resultiert in morphologischen Defekten des Nervensystems.	94
Abb. 3.18:	Der EGFR-Inhibitor Gefitinib reduziert die durch die ektopische Expression von <i>λtop</i> und <i>PI3K</i> ^{92E} in Gliazellen induzierte Proliferation, aber nicht die Migration.	96
Abb. 3.19:	Der EGFR-Inhibitor Wortmannin unterdrückt den Effekt von simultan in Gliazellen exprimiertem <i>λtop</i> und <i>PI3K</i> ^{92E} .	97
Abb. 3.20:	Die Verabreichung des Akt-Inhibitors Triciribine reduziert den Effekt von simultan in Gliazellen exprimiertem <i>λtop</i> und <i>PI3K</i> ^{92E} .	98
Abb. 3.21:	Ektopische Aktivierung verschiedener Rezeptortyrosinkinasen in Gliazellen mit dem UAS/Gal4-System.	100
Abb. 3.22:	Einfluss von ektopisch in Gliazellen exprimiertem <i>λtop</i> und <i>λpvr</i> auf die Augenimaginalscheiben von L3-Larven.	102
Abb. 3.23:	Expression von <i>λtop</i> und <i>λpvr</i> in Gliazellen führt zu Defekten des Gehirns und der peripheren Nerven.	104
Abb. 3.24:	Anzahl Repo-positiver Zellkerne in den peripheren Nerven des Wildtyps und bei Expression von <i>λtop</i> und <i>λpvr</i> .	105

Abb. 3.25:	Einfluss von λ_{top} und λ_{pvr} auf die Anzahl GFP-markierter Gliazellklone.	106
Abb. 3.26:	Die Gliazellen der Augenimaginalscheibe gehören zu verschiedenen Untergruppen.	108
Abb. 3.27:	Prozentuale Anteile der Gliazellarten in der Augenscheibe des Wildtyps und bei Expression der Transgene UAS λ_{top} und UAS λ_{pvr} mit <i>repoGal4</i> .	109
Abb. 3.28:	Morphologie von Gliazellen mit <i>repoGal4</i> -induzierter Expression von UAS λ_{pvr} .	111
Abb. 3.29:	Morphologie von Gliazellen der Augenimaginalscheibe bei <i>repoGal4</i> -induzierter Expression von UAS λ_{top} .	112
Abb. 3.30:	Augenimaginalscheiben mit Expression einer dominant negativen Form von PVR in Gliazellen.	113
Abb. 3.31:	PVR wird im Epithel der Augenimaginalscheibe und in Hämozyten exprimiert.	115
Abb. 3.32:	PVR wird in den Perineuralglia der peripheren Nerven exprimiert.	116
Abb. 3.33:	Die Deregulation weiterer Gene soll die λ_{pvr} -induzierte Letalität in andere Entwicklungsstadien verschieben.	117
Abb. 3.34:	Kreuzungsschema für den Screen nach Genen mit regulatorischem Einfluss auf PVR.	118
Abb. 3.35:	<i>Loco</i> -RNA ist in Gliazellen des Embryos zu finden.	122
Abb. 3.36:	Verringerung der Expression von <i>loco</i> in Gliazellen durch RNA Interferenz-vermittelten <i>knock down</i> .	123
Abb. 3.37:	Verringerung der Expression von <i>CG7103</i> in Gliazellen durch RNA Interferenz-vermittelten <i>knock down</i> .	124
Abb. 3.38:	Verringerung der Expression von <i>CG31871</i> in Gliazellen durch RNA Interferenz-vermittelten <i>knock down</i> .	126
Abb. 3.39:	Phänotyp des Nervensystems von <i>CG31871</i> -mutanten Embryonen.	127
Abb. 10.1:	Exonstruktur von <i>loco</i> und Sequenz des Exons 7.	172

8 Tabellenverzeichnis

Tab. 2.1:	Molekulare Ziele und Funktionsweise der zu untersuchenden Inhibitoren.	37
Tab. 2.2:	Pipettierschema für den Reaktionsansatz zur Erzeugung von RNA-Sonden.	42
Tab. 2.3:	Zusammensetzung eines 50 µl-PCR-Ansatzes.	52
Tab. 2.4:	PCR-Temperaturprofil für DNA-Fragmente < 800 bp.	53
Tab. 2.5:	PCR-Temperaturprofil für DNA-Fragmente > 800 bp.	53
Tab. 2.6:	Pipettierschema für einen Standard-Restriktionsansatz.	57
Tab. 2.7:	Pipettierschema für eine Standard-Dephosphorylierungsreaktion.	58
Tab. 2.8:	Schema für einen Standard-Ligationsansatz.	58
Tab. 2.9:	Pipettierschema für ein analytisches SDS-Gel.	60
Tab. 2.10:	Einstellungen für die Laserscanning-Mikroskopie.	62
Tab. 2.11:	Kriterien zur Bestimmung der Zahl glialer Zellkerne in einem Bildstapel mit „Volocity 4.0“ (Improvision).	63
Tab. 3.1:	Einfluss der ektopischen Regulation des PI3K/Akt-Signalwegs auf die Vitalität.	66
Tab. 3.2:	Einfluss der ektopischen Expression von λtop , pvr und λpvr auf die Vitalität.	101
Tab. 3.3:	Die durch Expression von λpvr in Gliazellen induzierte Letalität variiert in Abhängigkeit von der Außentemperatur und dem Gal4-Treiber.	101
Tab. 3.4:	Gene, deren Funktionsreduktion bei 18 °C die durch Expression von λpvr in Gliazellen verursachte Letalität in spätere Entwicklungsstadien verschiebt.	120

Tab. 3.5:	Humane Homologe der im Screen identifizierten Kandidaten.	120
Tab. 3.6:	Kandidatengene für weitere Untersuchung in <i>Drosophila</i> und Einfluss des <i>knock downs</i> in Gliazellen auf die Vitalität.	125
Tab. 10.1:	Übersicht über die Stämme, die gegen die Linie UAS λ_{pvr} / CyO ^{Gal80} ; <i>repoGal4</i> UAS <i>CD8GFP</i> gekreuzt und bei 25 °C gehalten wurden.	174
Tab 10.2:	Ergebnisse der Kreuzungen von UAS λ_{pvr} / CyO ^{Gal80} ; <i>repoGal4</i> UAS <i>CD8GFP</i> mit RNA Interferenz-Linien bei 18 °C.	176

9 Abkürzungsverzeichnis

AS	Aminosäuren
ATP	Adenosintriphosphat
BN	Bolwig - Nerv
<i>brat</i>	<i>brain tumor</i>
<i>da</i>	<i>daughterless</i>
<i>dlg</i>	<i>discs large</i>
DNA	Desoxyribonukleinsäure
<i>dpp</i>	<i>decapentaplegic</i>
ECM	extrazelluläre Matrix
EGF	Epidermal Growth Factor
EGFR	Epidermal Growth Factor Receptor
FAK	Focal Adhesion Kinase
FGF	Fibroblast Growth Factor
FLP	Flipase
FRT	Flipase Recognition Target
<i>ft</i>	<i>fat</i>
Gal4	Galactose 4
GBM	Glioblastoma multiform
GFP	Green Fluorescent Protein
Grb2	Growth Factor Receptor-bound Protein 2
GS	Goat Serum
<i>hh</i>	<i>hedgehog</i>
HRP	Horseradish Peroxidase
<i>hyd</i>	<i>hyperplastic discs</i>
<i>l(2)gl</i>	<i>lethal (2) giant larvae</i>
IL	Interleukin
InR	Insulin Receptor
<i>loco</i>	<i>locomotion defects</i>
LOX	Lysyloxidase
<i>l(2)tid</i>	<i>lethal (2) tumorous imaginal discs</i>
MAPK	Mitogen-Activated Protein Kinase
MF	morphogenetische Furche

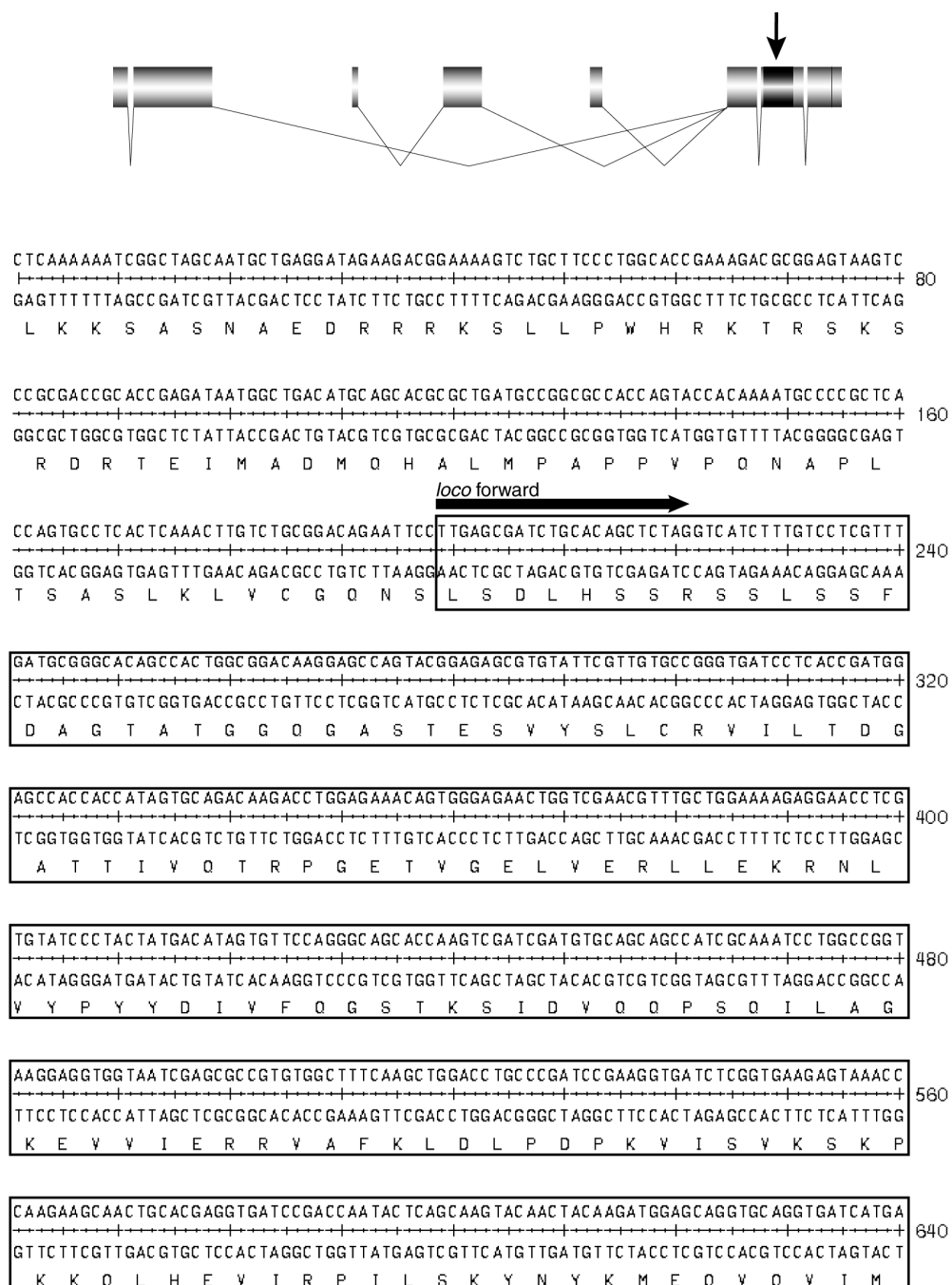
MPP	Matrix-Metalloproteinase
PDGF	Platelet Derived Growth Factor
PDGFR	Platelet Derived Growth Factor Receptor
PI3K	Phosphatidylinositol-3-Kinase
PIP2	Phosphatidylinositol-4,5-Bisphosphat
PIP3	Phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphat
PLC	Phospholipase C
PNS	peripheres Nervensystem
PTEN	Phosphatase and Tensin Homologue Deleted on Chromosome 10
Pvf	PDGF- and VEGF-related Factor
PVR	PDGF- and VEGFR Receptor Related
<i>ras</i>	<i>rat sarcoma</i>
<i>repo</i>	<i>reversed polarity</i>
RGS	Regulator of G-Protein Signaling
RNA	Ribonukleinsäure
RP	Reihen von Photorezeptorneuronen
RT	Raumtemperatur
RTK	Rezeptortyrosinkinase
<i>scrib</i>	<i>scribble</i>
STAT	Signal Transduction and Activator of Transcription
TLR	Toll-like Receptor
UAS	Upstream Activator Sequence
üN	über Nacht
v / v	volume / volume
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
VEGFR	Vascular Endothelial Growth Factor Receptor
w / v	weight / volume
WHO	World Health Organisation
<i>wts</i>	<i>warts</i>
ZNS	zentrales Nervensystem

10 Anhang

10.1 Sequenzdaten

Abb. 10.1: Exonstruktur von *loco* und Sequenz des Exons 7.

Zur Generierung einer RNA Interferenz-Linie wurde ein Bereich des Exons 7 von *loco* in pWiz kloniert (in der Abbildung in schwarz hinterlegt) und durch PCR mit genomischer DNA als Template amplifiziert. Die Sequenz der Primer ist in Abschnitt 2.1.7 angegeben. Die Bindungsstellen der Primer sind durch Pfeile markiert.



10.2 Im Screen nach PVR-Interaktionspartnern untersuchte Stämme

Die Tabellen geben eine Übersicht über die Stämme, die als Kandidaten im Screen nach Genen, welche die λ pvr-induzierte Letalität in andere Entwicklungsstadien verschieben, getestet wurden. Die Linien wurden vom RNAi Stock Center in Wien/Österreich (<http://www.vdrc.at>) und dem RNAi Stock Center in Mishima/Japan (<http://www.shigen.nig.ac.jp/fly/nigfly>) bezogen oder im Institut für Neurobiologie (Münster, Deutschland) generiert.

Tab. 10.1: Übersicht über die Stämme, die gegen die Linie UAS λ pvr / CyO^{Gal80}; repoGal4 UAS CD8GFP gekreuzt und bei 25 °C gehalten wurden.

In der Tabelle sind die CG-Nummern der Kandidatengene und die Identitätsnummern (ID) der entsprechenden Stämme angegeben. Anhand der Identitätsnummer erschließt sich die Herkunft Linien. Aus einer Zahl bestehende ID-Nummern repräsentieren Stämme, die aus Wien bezogen wurden, während Linien, deren ID-Nummer eine Zahl in Verbindung mit dem Buchstaben „R“ aus Japan stammen, und Stämme aus dem Institut für Neurobiologie die Bezeichnung „Klämbt“ bzw. „Hummel“ in Verbindung mit einer Zahl tragen.

CG	ID #
CG10066	10066R-7
CG10079	10079R-2
CG10120	10120R-3
CG10149	18021
CG10149	18022
CG10159	10159R-1
CG10287	10287R-1
CG10522	10522R-1
CG10522	10522R-2
CG10689	10689R-2
CG1084	28294
CG1084	40613
CG10954	10954R-1
CG10954	10954R-4
CG11207	11207R-1
CG1130	1130R-2
CG11415	11415R-2
CG1167	1167R-1
CG1167	1167R-3
CG1167	6225
CG11895	11895R-1
CG11910	14737
CG11910	14738
CG11949	9787
CG11949	9788
CG12072	12072R-1
CG12085	12085R-2
CG1225	1225R-1
CG1225	1225R-2
CG1225	3722R-2
CG12296	12296R-3
CG12352	12352R-3
CG12369	35524
CG12443	Klämbt 020
CG12443	Klämbt 021
CG13345	13345R-4

CG13345	1335R-1
CG13651	13651R-2
CG13772	44236
CG13772	44237
CG1403	1403R-2
CG14064	14064R-1
CG14334	14334R-2
CG14351	14351R-2
CG14351	14351R-3
CG14513	14513R-3
CG1470	1470R-1
CG14823	14823R-2
CG14900	14900R-1
CG14900	14900R-3
CG14948	14948R-1
CG15015	15015R-2
CG15015	15015R-3
CG15015	Klämbt 008
CG15064	15064R-3
CG1536	1536R-4
CG15388	15388R-4
CG1560	1560R-1
CG1560	1560R-2
CG15893	15893R-1
CG1616	1616R-1
CG1634	27201
CG1634	27202
CG1634	6688
CG1651	25945
CG1651	25946
CG16868	16868R-2
CG16980	16980R-1
CG16980	16980R-3
CG17077	7170
CG17077	7171
CG17183	17183R-4
CG17245	17245R-2

CG17245	17245R-4
CG1725	1725R-1
CG1725	1725R-2
CG1725	41134
CG1725	Hummel 001
CG17347	17347R-1
CG17348	17348R-1
CG1762	1762R-1
CG1763	1763R-2
CG17724	17724R-1
CG1782	1782R-2
CG17943	17943R-6
CG18247	18247R-3
CG1825	1825R-1
CG18290	18290R-3
CG18296	18866
CG18296	18867
CG18405	18405R-1
CG18405	18405R-3
CG18414	18414R-1
CG18657	18657R-2
CG18780	18780R-1
CG1897	7791
CG1945	2955
CG1945	2956
CG1945	30679
CG1945	30680
CG1964	1946R-3
CG1977	Klämbt 001
CG2013	23229
CG2013	23230
CG2013	46927
CG2086	2086R-1
CG2248	2248R-1
CG2248	2248R-2
CG2762	2762R-4
CG3000	25550

CG3000	25553	CG5462	27424	CG7554	7554R-2
CG30173	10939R-1	CG5462	41440	CG7558	7558-R2
CG30173	10939R-3	CG5520	5520R-1	CG7719	7719R-2
CG3048	3048R-2	CG5661	5661R-1	CG7749	7749R-1
CG30483	Klämbt 016	CG5837	22207	CG7765	7765R-1
CG31149	5449R-2	CG5837	Klämbt 014	CG7776	7776R-2
CG31298	31298R-3	CG5870	Klämbt 005	CG7823	7823R-2
CG31401	31401R-2	CG5870	Klämbt 006	CG7823	7823R-4
CG31695	31695-R	CG5870	Klämbt 007	CG7951	Klämbt 017
CG3193	Klämbt 010	CG5887	5887R-4	CG7952	7952R-1
CG32120	32120R-1	CG5893	5893R-1	CG8114	34350
CG32311	32311R-2	CG5925	5925R-1	CG8114	35349
CG32315	Klämbt 015	CG5972	5972R-1	CG8224	8224R-1
CG32747	Klämbt 009	CG5972	5972R-3	CG8376	8376R-1
CG33208	11687R-2	CG5988	5988R-1	CG8491	8491R-1
CG33208	18667R-1	CG5993	5993R-2	CG8544	8544R-2
CG33208	18668R-2	CG6211	Klämbt 011	CG8561	8561R-1
CG3373	3373R-2	CG6218	35069	CG8567	8567R-3
CG3408	36306	CG6407	6407R-2	CG8606	8606R-1
CG3629	11529	CG6418	6418R-2	CG8789	26910
CG3710	3710R-2	CG6446	6446R-4	CG8865	8865R-1
CG3722	3772R-1	CG6502	6502R-3	CG8965	23661
CG3886	30586	CG6551	6551R-3	CG8967	8967R-4
CG3886	30587	CG6575	6575R-1	CG9261	2660
CG3886	3886R-4	CG6615R-2	6615R-2	CG9346	9346R-1
CG3936	3936R-2	CG6716	6716R-1	CG9375	18129
CG4012	4012R-1	CG6827	8353	CG9495	9495R-3
CG4016	10020	CG6827	9039	CG9539	9539R-3
CG4016	10021	CG6867	37416	CG9579	9579R-2
CG4155	4155R-1	CG6867	37419	CG9623	9623R-2
CG4162	Hummel 002	CG6868	6868R-2	CG9623	T0530
CG4274	40500	CG6990	6990R-1	CG9623	T0531
CG4274	44834	CG6993	Klämbt 018	CG9623	T0532
CG4466	4466R-1	CG7050	36326	CG9695	9695R-1
CG4636	4636R-1	CG7050	36328	CG9749	9749R-3
CG4636	Klämbt 022	CG7050	4306	CG9749	Klämbt 002
CG4684	4684R-1	CG7055	7055R-1	CG9901	9901R-1
CG4684	4684R-2	CG7223	Klämbt 012	CG9901	9901R-2
CG4838	4838R-3	CG7223	Klämbt 013	CG9968	Klämbt 003
CG4931	4931R-1	CG7393	7393R-1	CG9968	Klämbt 004
CG4931	4931R-2	CG7393	7393R-3		
CG4931	Klämbt 019	CG7462	40638		
CG5055	5055R-2	CG7542	17131R-4		
CG5249	5249R-2	CG7542	7541R-1		
CG5433	5433R-2	CG7542	7542R-2		

Tab. 10.2: Ergebnisse der Kreuzungen von UAS λ pr / CyO^{Gal80}; repoGal4 UAS CD8GFP mit RNA Interferenz-Linien bei 18 °C.

In der Tabelle sind die CG-Nummern der Kandidatengene und die Identitätsnummern (ID) der entsprechenden Stämme angegeben. Anhand der Identitätsnummer erschließt sich die Herkunft Linien. Aus einer Zahl bestehende ID-Nummern repräsentieren Stämme, die aus Wien bezogen wurden, während Linien, deren ID-Nummer eine Zahl in Verbindung mit dem Buchstaben „R“ aus Japan stammen, und Stämme aus dem Institut für Neurobiologie die Bezeichnung „Klämbt“ bzw. „Hummel“ in Verbindung mit einer Zahl tragen. Außerdem ist das Entwicklungsstadium angegeben, in dem die Tiere starben, die λ pr simultan mit den verschiedenen RNA Interferenz-Konstrukten exprimierten (E = embryonal letal; L1 / L2 / L3 = letal im ersten / zweiten / dritten Larvenstadium; P = pupal letal).

CG	ID #	Ergebnis
CG10001	1326	E
CG10023	17957	E
CG10030	44480	E
CG1004	51952	E
CG10052	10052R-2	E

CG10069	6591	F
CG1007	1007R-1	E
CG10072	29434	E
CG10080	46133	E
CG10082	38326	E
CG10101	44548	E

CG10110	18009	E
CG10129	44384	E
CG10134	35715	E
CG10138	18016	E
CG10145	15194	E
CG10148	44841	F

CG10152	1410	F
CG10154	46847	E
CG10163	15295	E
CG10181	9019	E
CG10212	10711	E
CG10223	30625	E
CG10236	18873	E
CG10238	15990	E
CG10244	10244R-1	E
CG10250	51311	E
CG10255	10255R-1	E
CG10261	2907	E
CG10265	18602	E
CG10275	37283	E
CG10293	13756	E
CG10295	12553	F
CG10307	27150	E
CG10345	51536	E
CG10349	42924	E
CG10359	4128	E
CG10364	10364R-1	L1
CG10374	48109	E
CG10388	37823	E
CG10393	11796	E
CG10405	43170	E
CG10413	3882	E
CG10443	36270	E
CG10443	36269	E
CG10479	45098	E
CG10480	38389	E
CG10483	33276	E
CG10493	16057	E
CG10497	13322	E
CG10505	6593	E
CG10580	51977	E
CG10620	5236	F
CG10653	35483	E
CG10686	31319	E
CG10698	44310	E
CG10699	45231	E
CG10699	15342	F
CG10702	27052	F
CG10719	31333	F
CG10723	30304	E
CG10724	22850	E
CG10724	22851	E
CG10726	26759	L1
CG10742	10742R-3	E
CG10743	16851	E
CG10760	13996	E
CG10800	10800R-1	E
CG10804	30225	E
CG10816	42503	E
CG10824	16588	E
CG1084	40752	E
CG10897	38411	E
CG10898	13643	E
CG10901	3009	E
CG1093	1093R-1	E
CG10955	27341	E
CG10958	26763	F
CG10960	8359	E
CG10967	16133	E
CG10971	16137	E
CG10971	16138	E
CG10975	4790	E
CG10975	27090	E
CG10975	4789	E

CG10975	942	E
CG11027	12931	E
CG11034	37941	E
CG11058	31409	E
CG11059	37292	L1
CG1106	37865	E
CG11064	6878	E
CG11081	27240	E
CG11081	4740	E
CG11100	37782	E
CG1112	42942	E
CG11120	18141	F
CG11128	45588	E
CG11136	44991	E
CG11146	47796	L1
CG11170	41302	E
CG11177	45975	E
CG11183	31442	E
CG1119	10942	E
CG11199	51707	E
CG11206	42945	E
CG11212	11212R-2	E
CG11228	7823	L1
CG11237	38462	L1
CG1124	43210	E
CG11270	11270R-1	E
CG11280	5242	E
CG11282	3046	E
CG11282	27097	E
CG11295	31484	E
CG11303	8846	E
CG11308	31487	F
CG11315	46905	E
CG11319	7621	F
CG11320	18054	E
CG11324	18061	E
CG11326	7535	E
CG11335	11335R-3	P
CG1134	7481	E
CG11367	40900	E
CG11390	5622	E
CG11397	10937	E
CG11408	45394	E
CG11421	50725	E
CG11426	42599	E
CG11427	38503	E
CG11451	38511	E
CG1147	1147R-1	E
CG11489	47544	E
CG1149	31513	F
CG11502	37086	E
CG11502	37087	E
CG11534	16216	E
CG11547	31525	E
CG11567	11567R-1	F
CG11579	7767	F
CG1158	9455	E
CG11621	16239	L1 / L2
CG11621	16240	L1
CG11637	9092	E
CG11638	29889	E
CG11641	30537	E
CG11655	9131	E
CG11670	16433	E
CG11685	16267	E
CG11687	46096	F
CG11722	44114	E
CG11738	16289	E

CG11738	17244	E
CG11779	16309	E
CG11793	31551	E
CG11804	16313	E
CG11822	42740	E
CG11837	38573	F
CG11870	16334	E
CG11895	1665	E
CG11896	51379	E
CG11897	51382	E
CG11987	11987R-3	E
CG1200	50007	E
CG12007	47405	E
CG12042	31623	E
CG12042	31624	E
CG12047	46660	E
CG12048	1345	E
CG12052	12573	E
CG12058	31635	E
CG12058	31636	E
CG12061	8682	E
CG12092	35514	E
CG12108	5499	E
CG1212	1212R-2	E
CG12131	12131R-1	E
CG12132	31652	E
CG1214	4080	E
CG12147	31658	E
CG12154	51911	E
CG1216	17043	E
CG12181	38222	E
CG12199	47768	E
CG12201	42648	E
CG12205	12205R-2	F
CG12212	3788	E
CG12244	20166	E
CG12273	42919	E
CG12283	36252	E
CG12287	52272	E
CG12290	1246	E
CG12340	22878	E
CG12340	23606	E
CG12351	41241	E
CG12358	46299	E
CG12366	44045	E
CG12397	47515	E
CG12399	12399R-2	E
CG12399	12399R-1	E
CG12403	17102	E
CG1244	24534	E
CG12443	24536	E
CG1245	1245R-1	E
CG12455	3849	E
CG12497	24549	E
CG12529	3337	E
CG12559	43123	E
CG1258	1258R-1	E
CG12598	7763	E
CG12657	29844	E
CG12657	29843	E
CG12664	45167	E
CG12676	3087	E
CG1275	4103	F
CG12755	38185	E
CG12787	7854	E
CG12789	33153	E
CG12841	8716	F
CG12866	39545	E

CG12869	4875	E
CG12908	13280	E
CG12919	45252	L1
CG12926	32121	E
CG12932	38746	E
CG12943	6762	E
CG12950	10011	E
CG13020	17116	E
CG13037	13037R-2	E
CG13109	15709	E
CG13194	36524	F
CG13194	36523	E
CG13384	44245	E
CG13399	13399R-1	E
CG13475	13475R-3	E
CG13521	4329	E
CG13601	19953	E
CG13664	39800	E
CG13695	13695R-2	E
CG13756	29592	E
CG13773	43011	E
CG1378	6236	E
CG13780	7628	E
CG13801	45925	E
CG13894	13894R-1	E
CG13920	46993	E
CG1395	1395R-2	E
CG14001	45028	E
CG14026	3059	E
CG1404	24835	E
CG14103	8428	E
CG1416	41548	E
CG14226	36356	E
CG14226	36355	E
CG14226	19717	E
CG1430	17473	E
CG1435	5680	E
CG14351	36220	L1
CG14351	36221	E
CG14396	29907	E
CG1451	51468	E
CG14626	14510	E
CG14629	51648	E
CG1464	42845	E
CG14642	14047	E
CG1471	30189	L1
CG1471	40628	L1
CG14750	14750R-3	E
CG14762	31014	E
CG14767	50355	E
CG14778	44970	E
CG14781	51804	E
CG14818	40700	E
CG14869	33347	E
CG14895	14895R-2	L2
CG14902	43028	E
CG14938	7779	E
CG1494	30320	E
CG14941	5692	E
CG14941	5690	F
CG14945	13459	E
CG14957	26896	L1
CG14958	38160	E
CG14962	39855	E
CG14964	43603	E
CG14965	31847	E
CG14991	18484	F
CG1500	39575	E

CG15000	6273	E
CG15001	24944	E
CG15001	39906	E
CG15001	24943	E
CG15009	30930	E
CG15015	18492	F
CG1504	18513	E
CG15072	39866	E
CG15072	39864	E
CG15095	11117	E
CG15106	15106R-3	E
CG1511	6545	F
CG15112	43058	E
CG15112	43056	E
CG15117	47527	E
CG15154	52182	E
CG15154	51821	E
CG1520	13759	E
CG15224	32377	E
CG15257	3837	F
CG15288	3141	F
CG15305	29622	E
CG15306	43656	E
CG1532	19398	E
CG15355	32577	E
CG15406	45886	F
CG15427	3064	E
CG15520	41124	E
CG15555	30196	E
CG15609	43406	E
CG15609	43407	E
CG15610	25074	E
CG15611	8986	E
CG15614	4927	E
CG15614	4928	E
CG15624	7858	F
CG15762	29871	F
CG15780	35553	E
CG15792	7819	E
CG15831	28582	E
CG15899	31961	E
CG1594	40037	E
CG1624	41623	E
CG1632	5478	E
CG1658	19066	E
CG1662	52639	E
CG16708	43412	E
CG16708	43413	E
CG16718	37472	L1 / L2
CG16738	16738R-1	E
CG16757	19658	E
CG16764	26976	E
CG16766	51387	E
CG16827	16827R-2	E
CG16827	16827R-3	E
CG1683	5532	F
CG16833	32742	E
CG16857	36224	E
CG16876	36260	L2
CG1688	30269	F
CG16882	52426	E
CG16932	19164	E
CG16932	19165	E
CG1697	44416	E
CG16974	7993	E
CG16987	13418	E
CG17026	49199	E
CG17034	8136	E

CG1709	22924	E
CG1713	5608	E
CG17142	8677	E
CG1724	30315	E
CG17245	8383	L1 / L2
CG17245	46687	E
CG17245	27220	E
CG17245	8382	E
CG17245	27219	E
CG1725	41136	E
CG17320	49012	E
CG17336	37408	E
CG1743	32929	E
CG1747	32932	L1
CG17559	6547	F
CG17564	47271	E
CG17564	47273	E
CG17597	25276	E
CG1760	32961	F
CG1760	44374	E
CG1762	893	F
CG1765	1765R-2	E
CG1765	1765R-4	E
CG1768	20518	E
CG17697	43075	E
CG17697	43077	E
CG1771	44890	E
CG17723	7461	E
CG17724	24971	E
CG17724	24969	E
CG17735	50189	F
CG17739	36542	E
CG17743	39529	E
CG1776	44737	E
CG1776	44736	E
CG17800	3115	E
CG17800	36233	E
CG17835	49950	E
CG17835	49951	E
CG1792	20569	E
CG17941	4313	E
CG17947	19182	E
CG1801	8655	E
CG18024	41079	E
CG18095	36256	E
CG18110	1349	E
CG18146	36264	E
CG18214	40138	L1
CG18214	40137	L1
CG18241	47966	E
CG1826	33049	E
CG18287	36660	F
CG1830	33054	F
CG18319	9413	L1
CG18324	33234	E
CG18350	3131	E
CG1838	33132	E
CG18381	25335	E
CG18405	4743	E
CG18405	36148	L1
CG18406	36147	F
CG18408	19054	E
CG18414	10679	E
CG18417	43975	E
CG1848	25343	E
CG18572	33375	E
CG18578	8573	E
CG18585	19917	E

CG18599	25363	E
CG18630	25366	E
CG18667	25371	E
CG18667	25372	L1
CG18668	20672	F
CG18668	20673	F
CG18740	6969	E
CG18803	43082	E
CG18869	45926	E
CG1887	4100	E
CG1912	43711	E
CG1913	33427	E
CG1921	6948	E
CG1956	33437	E
CG1966	33446	F
CG2025	25392	E
CG2028	13664	E
CG2040	13266	F
CG2072	2072R-2	E
CG2086	27084	E
CG2086	4833	E
CG2092	33465	E
CG2105	39536	E
CG2146	16902	E
CG2160	33489	E
CG2187	7576	E
CG2196	28349	E
CG2198	22945	E
CG2245	40994	L1 / L2
CG2272	33516	E
CG2310	1338	E
CG2446	40622	F
CG2520	12732	E
CG2522	14877	E
CG2534	7769	E
CG2559	14898	E
CG2590	2590R-1	E
CG2608	20886	E
CG2647	5709	F
CG2650	42825	E
CG2663	33548	E
CG2666	42611	E
CG2671	51249	E
CG2671	51247	E
CG2714	6308	E
CG2715	32413	E
CG2727	12233	E
CG2736	10272	E
CG2759	30033	E
CG2813	44198	E
CG2813	44197	E
CG2827	2827R-3	E
CG2835	24958	L1
CG2845	20909	E
CG2857	7417	E
CG2893	40987	E
CG2902	37333	E
CG2903	20933	E
CG2913	7028	F
CG2922	25166	E
CG2925	20943	E
CG2930	7031	E
CG2969	42750	E
CG2987	2987R-3	E
CG2987	2987R-2	E
CG2989	46285	E
CG2999	33606	E
CG30001	29756	L1

CG30004	25554	E
CG30012	21057	E
CG30013	41415	E
CG30014	25557	E
CG30016	40488	E
CG30017	44785	E
CG30025	38032	E
CG30031	38031	L1
CG30035	8126	F
CG30039	21072	E
CG30040	30799	E
CG30046	13947	E
CG30055	28827	L2
CG30056	45714	E
CG3006	38146	E
CG30065	28828	E
CG30075	25563	E
CG30081	29984	E
CG30084	36563	E
CG30084	36564	E
CG30096	35788	E
CG30126	35791	E
CG30127	25574	E
CG30151	3199	E
CG30152	38848	E
CG30154	8823	E
CG30166	37854	E
CG30176	25592	E
CG30182	44748	E
CG30188	44997	E
CG30203	33913	E
CG30284	21118	E
CG3029	25014	E
CG30321	35798	E
CG3036	42755	E
CG30379	4003	E
CG3039	7136	E
CG30411	8843	F
CG30429	21175	E
CG30447	40186	E
CG30456	21186	E
CG30456	21187	L1
CG30459	21192	E
CG30460	40624	E
CG30461	50760	E
CG30461	50761	E
CG30462	10049	E
CG3047	21206	E
CG30486	21228	E
CG30487	21232	E
CG30488	41281	E
CG30493	43131	F
CG3064	6972	E
CG3086	3170	E
CG3091	24713	E
CG3093	33733	F
CG31000	33735	E
CG31004	40940	E
CG31009	27212	E
CG31012	38854	L2
CG31049	21294	E
CG31055	37893	E
CG3106	42699	E
CG31062	1284	E
CG31062	1283	L1
CG31065	1268	E
CG31088	29813	E
CG31100	42627	E

CG31121	43981	E
CG31122	40207	F
CG31131	29574	E
CG31136	33112	E
CG31137	13366	E
CG31145	25036	E
CG31146	42616	E
CG31149	9869	E
CG31163	25701	L3
CG31163	25702	L4
CG31164	7566	E
CG31168	43222	E
CG31170	25707	E
CG31174	24423	E
CG31179	33783	E
CG31183	858	E
CG31190	6685	E
CG31195	8621	E
CG31198	8624	E
CG31213	40926	L1 / L2
CG31217	43972	L1
CG31223	40018	E
CG31235	45471	E
CG31240	10424	E
CG31247	10208	L1
CG31262	52605	E
CG31286	41155	E
CG3129	40228	E
CG31315	42383	E
CG31317	21317	E
CG3132	16779	E
CG31332	49701	E
CG31347	38939	E
CG3135	14803	E
CG31352	49112	E
CG31385	27177	E
CG31386	51987	E
CG31389	43430	E
CG3143	30556	E
CG31605	43306	E
CG31605	43307	E
CG3161	49290	E
CG31619	33102	E
CG31634	2650	E
CG31638	33981	E
CG31638	33982	E
CG3164	42733	E
CG31640	3498	E
CG31665	8021	E
CG31697	10355R-3	E
CG31708	38261	E
CG3171	3171R-2	E
CG31729	7697	E
CG31741	7930	E
CG31763	31763R-2	E
CG31774	46180	E
CG31783	31783R-1	E
CG31795	7560	E
CG3180	3180R-2	E
CG31811	31811R-1	E
CG31860	7688	E
CG31871	51241	E
CG31871	51242	E
CG31911	7618	E
CG3193	25918	E
CG31964	25931	E
CG31970	37842	E
CG31999	29153	E

CG32019	46252	E
CG32030	34035	E
CG32030	34034	E
CG32079	39496	E
CG32092	41785	E
CG32103	29439	E
CG3212	13030	E
CG32120	11690	E
CG32134	27106	F
CG32138	34412	E
CG32138	34413	E
CG32146	10299	E
CG32204	52444	E
CG32221	21672	E
CG32227	43928	E
CG32263	45835	F
CG3227	3227R-1	E
CG32372	18977	E
CG32377	46224	F
CG32377	46225	E
CG32377	32377R-2	L2
CG32377	32377R-3	F
CG32387	1003	E
CG3242	3242R-2	E
CG32423	37863	E
CG32435	26051	E
CG32465	5783	E
CG32484	41905	E
CG32485	34567	E
CG32631	1733R-2	L2
CG32701	8176	F
CG32750	52425	E
CG32754	50591	E
CG32770	7042	E
CG32782	46425	E
CG32792	47047	E
CG32848	40918	E
CG32904	50145	L2
CG32904	50146	E
CG3299	3299R-1	E
CG33106	29541	E
CG33113	7866	F
CG33135	8754	E
CG33166	7434	E
CG33178	49464	F
CG33182	46444	E
CG3322	42559	E
CG3324	34594	L1
CG33281	7273	E
CG33282	46454	E
CG3340	3340R-1	E
CG33455	15610R-3	F
CG33508	9494	F
CG33518	45360	E
CG3352	9396	E
CG3359	37888	E
CG3359	37889	E
CG3365	3365R-1	E
CG33715	25906	E
CG3376	12226	E
CG3376	12227	E
CG3389	36164	E
CG3397	34604	L1
CG3401	34607	E
CG3401	34606	E
CG3412	3412R-1	E
CG3413	37208	E
CG3427	50372	E

CG34415	15610R-4	L2
CG3445	26196	E
CG3497	3497R-1	E
CG3510	43772	E
CG3522	4053	E
CG3523	29349	E
CG3599	16665	E
CG3618	6977	E
CG3618	6978	E
CG3622	16906	E
CG3648	10157	E
CG3653	6695	E
CG3663	12879	E
CG3665	8393	E
CG3665	8392	E
CG3665	36350	E
CG3665	36351	E
CG3671	44000	L1
CG3689	45281	E
CG3705	3705R-1	E
CG3715	40464	E
CG3727	37525	E
CG3766	3766R-2	F
CG3774	30238	E
CG3777	34224	F
CG3779	3779R-1	E
CG3791	41954	E
CG3792	48231	E
CG3796	7758	E
CG3829	42872	E
CG3837	44576	E
CG3851	9647	E
CG3903	37115	E
CG3903	37116	E
CG3905	43869	E
CG3905	50368	E
CG3915	40484	E
CG3936	3936R-3	E
CG3938	47941	E
CG3938	52662	E
CG3953	16416	E
CG3954	21756	E
CG3954	21757	E
CG3956	6232	E
CG3966	51855	E
CG3971	3241	F
CG4006	2902	F
CG4019	6650	F
CG4027	7139	F
CG4032	2897	F
CG4054	1701	E
CG4082	4082R-2	E
CG4099	7294	E
CG4109	42561	L1
CG4114	22994	E
CG4125	951	F
CG4143	12752	E
CG4143	12751	E
CG4147	14882	E
CG4148	12707	E
CG4148	12706	E
CG4207	46688	E
CG4214	3857	E
CG4257	43867	E
CG4268	45127	E
CG4276	26480	E
CG4276	26482	E
CG4290	26497	E

CG4290	26496	E
CG4322	1800	E
CG4353	2968	F
CG4357	30000	L1
CG4402	33252	E
CG4427	4427R-1	E
CG4482	33185	E
CG4527	43783	E
CG4536	7126	E
CG4551	40534	E
CG4587	3839	E
CG4591	4591R-2	E
CG4591	4591R-1	E
CG4608	4608R-1	E
CG4619	2754	E
CG4629	26574	E
CG4629	26573	E
CG4681	40552	E
CG4690	45739	E
CG4696	4696R-1	E
CG4698	4698R-3	E
CG4698	4698R-2	E
CG4698	38010	E
CG4700	15810	E
CG4700	15811	E
CG4705	40556	E
CG4717	2980	E
CG4722	8892	E
CG4729	48592	E
CG4740	42860	E
CG4755	34896	E
CG4755	34895	E
CG4778	7652	E
CG4780	44534	E
CG4797	10598	F
CG4802	42001	E
CG4821	45232	L1
CG4822	42729	E
CG4823	4823R-2	E
CG4832	44526	E
CG4846	4544	E
CG4846	4543	L1
CG4921	24672	E
CG4922	4922R-1	E
CG4926	932	F
CG4974	14136	E
CG4999	37252	E
CG5008	37255	E
CG5022	8262	E
CG5023	34914	E
CG5027	12106	E
CG5078	8085	E
CG5081	5413	E
CG5089	34928	E
CG5096	27059	E
CG5108	5108R-1	E
CG5109	22005	E
CG5109	22004	E
CG5110	34935	E
CG5123	5123R-3	E
CG5130	5390	E
CG5133	16746	E
CG5149	34942	E
CG5179	30448	E
CG5185	36613	E
CG5195	31044	E
CG5201	42840	E
CG5226	37183	E

CG5227	9437	E
CG5248	9248	E
CG5250	5722	F
CG5254	6887	F
CG5304	6938	E
CG5363	41838	E
CG5370	5370R-1	E
CG5370	34328	E
CG5372	5372R-1	E
CG5372	5372R-2	E
CG5398	33257	E
CG5423	44702	E
CG5424	33200	E
CG5433	5433R-1	E
CG5462	17760	L1
CG5473	21567	E
CG5481	11823	F
CG5492	11901	E
CG5505	11152	E
CG5517	15957	E
CG5532	30346	E
CG5535	42583	E
CG5538	3260	E
CG5545	13056	E
CG5547	27460	E
CG5580	41845	E
CG5595	27465	E
CG5596	34331	E
CG5610	1189	F
CG5634	27198	E
CG5655	5655R-1	E
CG5670	12330	E
CG5671	35731	E
CG5680	5680R-1	E
CG5686	7777	E
CG5700	41320	E
CG5706	42046	E
CG5723	51173	E
CG5738	9573	E
CG5738	9571	E
CG5751	37249	E
CG5760	44002	E
CG5771	22198	E
CG5790	45044	E
CG5803	940	E
CG5803	42231	E
CG5804	23586	F
CG5810	44988	F
CG5814	22200	E
CG5819	27076	E
CG5819	7998	L1
CG5819	837	F
CG5820	899	E
CG5825	5825R-3	E
CG5825	5825R-2	P
CG5847	3163	E
CG5855	37723	E
CG5876	3855	E
CG5884	19731	E
CG5915	40337	E
CG5940	32421	E
CG5942	37721	E
CG5959	43288	E
CG5973	24998	E
CG5993	3282	E
CG6016	7989	E
CG6016	7988	E
CG6027	43634	E

CG6070	1261	E
CG6120	3422	E
CG6124	4301	E
CG6126	7326	E
CG6127	27172	E
CG6173	14703	E
CG6205	47864	E
CG6211	Klämbt 023	E
CG6224	6224R-3	E
CG6225	8276	E
CG6246	6246R-2	E
CG6251	6251R-2	E
CG6292	6292R-1	E
CG6331	6331R-2	F
CG6341	6341R-3	E
CG6341	22488	F
CG6341	45571	E
CG6383	39178	E
CG6384	35078	E
CG6417	42805	L1
CG6426	8805	F
CG6429	41803	E
CG6429	41804	E
CG6435	49621	E
CG6435	6435R-1	L2
CG6435	6435R-2	L2
CG6437	6613	E
CG6437	44911	E
CG6440	12975	E
CG6443	15736	E
CG6445	36320	E
CG6449	5208	E
CG6472	22495	E
CG6484	4954	E
CG6492	6162	E
CG6493	60011	E
CG6493	60008	L1
CG6493	60007	E
CG6493	60009	L1
CG6493	60010	E
CG6502	27645	F
CG6502	27646	E
CG6518	2894	E
CG6518	6518R-1	L2
CG6521	22497	E
CG6546	6546R-1	F
CG6565	39006	E
CG6575	6575R-3	E
CG6588	23014	E
CG6599	39276	E
CG6622	27696	E
CG6649	7320	E
CG6657	6657R-1	E
CG6657	6657R-3	L2
CG6657	8143	E
CG6657	8144	E
CG6665	8202	E
CG6667	45998	E
CG6669	39515	E
CG6677	7141	E
CG6682	26721	E
CG6702	41812	F
CG6702	6702R-1	L1
CG6702	6702R-2	E
CG6702	42535	E
CG6703	34184	E
CG6705	14429	E

CG6713	27722	F
CG6723	13769	E
CG6736	6736R-2	F
CG6736	6736R-3	F
CG6742	27738	E
CG6749	44856	E
CG6751	12576	E
CG6773	50367	E
CG6788	42911	E
CG6796	6796R-1	E
CG6796	24470	E
CG6796	6494	L1
CG6798	1199	E
CG6803	34186	E
CG6812	8534	E
CG6829	35121	L1
CG6831	6831R-2	E
CG6831	40399	E
CG6844	1194	E
CG6851	44305	E
CG6871	6283	F
CG6873	22454	E
CG6875	2910	E
CG6883	6883R-1	E
CG6890	9431	E
CG6898	37357	E
CG6899	1012	E
CG6949	40405	E
CG6953	1530	E
CG6963	26003	E
CG6967	27768	F
CG6975	6313	E
CG6981	11906	E
CG6984	21649	E
CG6984	21650	E
CG6993	Klämbt 025	E
CG6993	12258	E
CG7000	42496	E
CG7001	26006	F
CG7002	37005	E
CG7028	27808	E
CG7037	22335	E
CG7054	40416	E
CG7100	1092	E
CG7100	1093	E
CG7103	6173	E
CG7103	6175	E
CG7109	35171	E
CG7115	9404	E
CG7121	7121R-3	E
CG7123	23119	E
CG7134	27880	E
CG7134	27881	E
CG7166	27116	E
CG7180	34369	E
CG7199	48979	E
CG7227	28611	E
CG7228	33155	E
CG7229	37671	E
CG7250	27102	E
CG7251	27924	E
CG7251	27926	E
CG7266	7266R-1	E
CG7271	22559	E
CG7323	15631	E
CG7351	27966	E
CG7383	7157	F

CG7407	8449	E
CG7422	27997	E
CG7449	27065	E
CG7453	9157	E
CG7467	7810	E
CG7503	17898	E
CG7508	48675	F
CG7509	51585	E
CG7514	37233	F
CG7520	15927	E
CG7524	35252	F
CG7527	36166	E
CG7528	7528R-1	E
CG7577	36659	E
CG7583	37609	E
CG7597	25508	E
CG7628	19713	E
CG7662	46963	E
CG7663	31058	E
CG7708	30301	E
CG7749	7749R-3	E
CG7762	25549	E
CG7770	34203	E
CG7771	26888	E
CG7776	35268	E
CG7776	35271	E
CG7777	8124	E
CG7788	7788R-2	E
CG7793	42848	E
CG7793	42849	L1
CG7800	27121	E
CG7802	46913	E
CG7802	33091	E
CG7802	33093	E
CG7803	37717	E
CG7803	37718	E
CG7809	22564	E
CG7830	4253	E
CG7851	33157	E
CG7867	7867R-2	E
CG7873	26019	E
CG7882	8101	E
CG7888	37263	E
CG7892	3002	E
CG7893	6241	E
CG7896	36340	E
CG7896	907	E
CG7896	3813	E
CG7896	908	E
CG7896	36343	E
CG7904	848	E
CG7935	38963	E
CG7940	22633	E
CG7951	Klämbt 024	E
CG7981	22642	F
CG8013	42423	E
CG8013	42422	E
CG8028	9163	E
CG8049	22675	E
CG8053	26022	E
CG8062	51156	E
CG8065	28186	E
CG8068	30710	E
CG8068	30709	E
CG8085	28194	L1
CG8085	28192	L1 / L2
CG8095	8095R-2	E

CG8103	10766	E
CG8114	35350	E
CG8127	44851	E
CG8146	23126	E
CG8146	48210	E
CG8147	2892	E
CG8166	8138	E
CG8203	35855	L1
CG8226	8747	E
CG8243	26953	E
CG8246	10844	E
CG8256	19565	F
CG8261	28844	F
CG8287	28092	E
CG8308	24297	E
CG8308	24783	F
CG8334	18981	E
CG8355	20210	E
CG8383	35915	E
CG8385	23082	E
CG8390	46229	E
CG8403	42476	E
CG8403	42478	E
CG8416	12734	E
CG8428	46030	L1
CG8428	3229	F
CG8434	42571	E
CG8454	23769	E
CG8472	28242	F
CG8491	23142	E
CG8491	23143	E
CG8507	42641	E
CG8522	37640	E
CG8527	39580	E
CG8531	24120	E
CG8548	8548R-2	E
CG8548	28920	E
CG8556	28926	E
CG8561	44361	L1
CG8581	6557	E
CG8581	29909	E
CG8583	33281	F
CG8595	8595R-2	L3
CG8595	39176	L1 / L2
CG8610	35986	E
CG8625	6208	E
CG8637	35988	E
CG8642	35998	E
CG8647	38188	E
CG8651	37715	E
CG8652	46514	E
CG8660	35432	E
CG8666	37127	E
CG8676	37694	E
CG8709	36006	E
CG8717	8739	E
CG8727	8727R-1	E
CG8727	8727R-3	F
CG8727	11765	E
CG8732	3222	E
CG8739	47750	E
CG8771	36023	F
CG8772	7192	E
CG8774	5861	E
CG8776	40803	E
CG8776	7909	E
CG8779	979	E
CG8780	28947	E

CG8785	4650	E
CG8811	29774	E
CG8846	35439	E
CG8860	8768	E
CG8874	36053	E
CG8887	28982	E
CG8896	8896R-3	E
CG8896	44386	E
CG8907	28986	E
CG8907	28987	E
CG8910	8910R-3	E
CG8912	28989	L1
CG8912	28990	E
CG8942	40748	F
CG8942	40747	E
CG8946	37974	E
CG8946	37975	E
CG8948	42165	E
CG8950	36069	E
CG8950	8950R-2	E
CG8950	8950R-3	E
CG8954	23659	E
CG8961	23660	E
CG8963	26916	E
CG8963	26917	E
CG8963	42110	E
CG8964	3075	E
CG8967	30834	E
CG8967	30833	E
CG8967	879	F
CG8967	878	F
CG8972	45845	E
CG8972	45847	E
CG8980	42175	E
CG8980	42176	E
CG8980	8980R-2	E
CG8980	8980R-3	E
CG9000	37179	F
CG9000	9000R-1	E
CG9000	9000R-3	E
CG9001	4931	E
CG9001	4932	E
CG9002	49812	E
CG9010	40728	E
CG9010	40730	E
CG9010	9010R-1	E
CG9010	9010R-2	L1
CG9015	35698	E
CG9023	51936	E
CG9025	44427	L1
CG9027	37794	E
CG9033	44288	E
CG9035	8759	E
CG9090	44297	L1 / L2
CG9093	9093R-3	E
CG9098	27001	E
CG9100	27002	E
CG9100	27004	E
CG9126	47074	F
CG9138	1047	E
CG9151	47881	E
CG9151	9827	E
CG9153	36090	E
CG9163	30076	E
CG9195	9130	F
CG9211	29897	E
CG9222	27010	E
CG9233	9233R-3	E

CG9330	44649	E
CG9335	12814	E
CG9364	30730	E
CG9379	22823	E
CG9393	44400	E
CG9398	29110	E
CG9412	29113	F
CG9413	45180	E
CG9426	10843	E
CG9431	914	E
CG9431	915	E
CG9453	40973	F
CG9483	2821	F
CG9494	9494R-1	E
CG9494	9494R-2	L2 / L3
CG9495	3796	E
CG9495	3795	E
CG9496	2824	E
CG9499	7900	E

CG9501	7903	E
CG9507	12370	F
CG9508	24052	F
CG9509	6336	E
CG9528	44686	E
CG9537	29374	E
CG9554	43911	E
CG9559	28667	E
CG9579	36107	E
CG9611	36120	L1 / L2
CG9620	42623	E
CG9623	44885	E
CG9637	9073	E
CG9640	24077	E
CG9640	9640R-1	E
CG9640	9640R-2	E
CG9642	40744	L1
CG9655	37308	E
CG9657	43922	E

CG9659	45161	E
CG9670	24085	E
CG9696	7787	E
CG9699	7742	E
CG9704	8495	E
CG9710	9710R-1	E
CG9739	44390	E
CG9749	36142	F
CG9774	3793	E
CG9936	13777	F
CG9951	36172	E
CG9952	9952R-2	E
CG9968	29693	E
CG9968	36186	F
CG9968	36185	F
CG9977	49572	E
CG9984	9984R-4	L1
CG9990	30032	E

Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel und Quellen benutzt habe. Alle Stellen der Arbeit, die dem Wortlaut oder dem Sinn nach anderen Werken entnommen sind, habe ich in jedem Fall unter Angabe der Quelle deutlich als Entlehnung kenntlich gemacht.

Münster, den

