

***Drosophila melanogaster* (Meigen, 1830)**
als Modell für die Untersuchung
neurodegenerativer Erkrankungen

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
des Fachbereichs Biologie
der Universität Hamburg

vorgelegt von Helge Marquardt
Hamburg im März 2005
Tag der Disputation 22.4.2005

Inhaltsverzeichnis

	Akürzungsverzeichnis	1
1.0	Einleitung	3
1.1	Synuclein und <i>Substantia nigra</i>	4
1.2	Dopamin und dopaminerges System	5
1.3	Biosynthese des Dopamins	7
1.4	Funktion des Synucleins	8
1.5	Ursachen für die Parkinsonsche Krankheit	9
1.5.1	Zelluläre Prozesse	9
1.5.2	Exogene Ursachen	10
1.5.3	Genetische Faktoren	10
1.6	Behandlungsmöglichkeiten für die Parkinsonsche Erkrankung	11
1.7	Genom und Transkriptom	11
1.8	Methoden zur Untersuchung differentieller Genexpression	13
1.9	Tiermodelle neurodegenerativer Erkrankungen	15
1.10	Dopamin und Dopaminrezeptoren bei Insekten	16
1.11	Das GAL4/UAS-System	17
1.12	Zielsetzung der Arbeit	18
2.0	Material und Methoden	20
2.1	Versuchsobjekt	20
2.2	Fliegenhaltung	20
2.3	Kreuzen der Treiber- und Effektorlinien	21
2.4	Verhaltensversuche	22
2.5	Präparation der Gewebe	
2.5.1	Einfrieren nach Fujita	23
2.5.2	<i>Fluorescence Activated Cell Sorting</i> (FACS)	24
2.6	Elektronenmikroskopische Aufnahmen	24
2.7	Fällen und Reinigen von Nucleinsäuren	24
2.8	Reverse Transkription (RT) und RT- <i>Primer</i>	25
2.9	PCR und PCR- <i>Primer</i>	26
2.10	Gelelektrophorese	27
2.11	Synthese der cRNA	27
2.12	Überprüfung der cRNA-Synthese	28

2.13	Die ccDNA-Synthese	29
2.14	(<i>Southern-Blot</i>): Kontrolle der ccDNA-Synthese	29
2.15	GFP-Expression dopaminerger Zellen: Präparation und Aufnahmen	31
2.16	Immunhistochemie	32
2.16.1	Antikörpernachweis	32
2.16.2	Färbereaktion	33
2.17	Die Farbstoffe	33
2.18	Kopplung der Farbstoffe	34
2.19	Die cDNA- <i>Microarrays</i>	35
2.20	Hybridisierung	36
2.20.1	Hybridisieren der cDNA- <i>Microarrays</i>	36
2.20.2	Stringenzwaschungen der cDNA- <i>Microarrays</i>	37
2.20.3	Auslesen (<i>Scannen</i>) der cDNA- <i>Microarrays</i>	37
2.21	Ablauf der Auswertung	38
2.21.1	Auswertung der cDNA- <i>Microarrays</i>	38
2.21.2	Analyse differentiell exprimierter Gene	39
2.22	Datenbankrecherche	41
2.23	Flussdiagramm	42
3.0	Ergebnisse	44
3.1	Ansicht des Gehirns von <i>Drosophila melanogaster</i>	44
3.2	Kontrolle der PCR	45
3.3	Kontrolle der cRNA-Synthese	46
3.4	Kontrolle der ccDNA-Synthese	47
3.5	Dopaminerge Zellen mit GFP-Expression	49
3.5.1	Larvalstadien	49
3.5.2	Das adulte Gehirn und 2D-Rekonstruktion	51
3.5.3	Zeichnung vom adulten Gehirn	53
3.5.4	Thorakales Verbundganglion	54
3.6	Antikörpernachweis des Synucleins	55
3.7	Ergebnis der Verhaltensversuche	58
3.7.1	Ergebnis der Laufaktivität	58
3.7.1.1	Signifikanztest	61
3.7.2	Ergebnis der Ruheaktivität	61

3.8	Überprüfung der Hybridisierungen	62
3.8.1	cDNA-Micorarrays	62
3.8.2	Der Korrelationsplot	65
3.8.3	<i>Dye-Flip</i>	66
3.8.4	Überprüfung der Vorgehensweise	67
3.9	FACS-Analyse dopaminerger Zellen	69
3.9.1	Scatter-Plot und Hybridisierung	69
3.9.2	Relevante Gene für dopaminerge Zellen	70
3.9.3	Arrayauswertung dopaminerger Zellen	72
3.10	Vergleich Synuclein exprimierende <i>Drosophila</i> gegen Wildtyp	74
3.10.1	Stärker in Synuclein exprimierenden Fliegen exprimierte Gene	75
3.10.2	Stärker im Wildtyp exprimierte Gene	76
3.10.3	Im Wildtyp stärker exprimierte Gene an allen Untersuchungszeitpunkten	79
3.10.4	Ausgewählte, stärker exprimierte Gene im Wildtyp	81
3.10.5	Tabellarische Auflistung der ausgewählten Gene im WT	81
4.0	Diskussion	88
4.1	Aspekte der Vorgehensweise und Methoden	88
4.1.1	Vorgehen bis zur ccDNA-Synthese	88
4.1.2	Hybridisierungen auf den <i>Canada-12k-Drosophila-Microarrays</i>	88
4.1.3	Normalisierung und Korrelationsplot	89
4.1.4	Farbaustausch (<i>Dye-Flip</i>)	89
4.1.5	Die Verifikation der Methode	90
4.2	Visualisierung dopaminerger Neurone durch GFP	90
4.3	Immunhistochemischer Nachweis des Synucleins	92
4.4	Expression des Synuclein und Verhalten	93
4.4.1	Laufaktivität	93
4.4.2	Ruheverhalten	94
4.5	FACS sortierte dopaminerge Neuron und D2-Rezeptor	95
4.5.1	Vergleich mit dem <i>Canada-12k-Microarray</i>	95
4.5.2	Autorezeptor D2	95
4.6	Differentiell exprimierte Gene	96
4.6.1	Stärker im Wildtyp exprimierte Gene zu allen Untersuchungszeitpunkten	96
4.6.2	Differentielle (stärker im Wildtyp exprimierte) Gene im Wildtyp	96

4.6.2.1	Antioxidative Funktion	97
4.6.2.2	Apoptotse Gene	97
4.6.2.3	Proteinkatabolismus	98
4.6.2.4	Ubiquitinylierung	99
4.6.2.5	Neurotransmittertransport-und Metabolismus	99
4.6.2.6	Lokomotion	100
4.6.2.7	Signaltransduktion	100
4.6.2.8	Trankriptionsfaktoren	100
4.6.3	Stärker exprimierte Gene in Synuclein _{wt} Fliegen	101
4.6.4	Abschließende Betrachtung differentiell exprimierter Gene	102
4.7	Implikationen für neuroprotektive Strategiein	102
4.8	Ausblick	103
4.8.1	Verifikation der Untersuchung	103
4.8.2	Erweiterung der GAL4-UAS-Methode	103
4.8.3	Pharmakologie und genetische Veränderung	105
5.0	Zusammenfassung	106
6.0	Literaturverzeichnis	107
Anhang I	Geräte und Materialien	116
Anhang II	Tabellen	118
	Danksagung	

Abkürzungsverzeichnis

(aa)dUTP	Amino-allyl modifizierte Desoxyuracilltriphosphat
ANOVA	Analysis of Variances, Signifikanztest
°C	Grad Celsius
µm	Mikrometer
2D	Zweidimensional
Abd	Abdominalganglien.
AIDA	Advanced Image Data Analyzer; Auswertungssoftware
An	Antennalloben
AP	Alkalische Phosphatase
BCIP	5-Brom-4 Chlor-3-Indolylphosphat
bp	Basenpaare
C	<i>Calyx</i>
ccDNA	Komplementäre Desoxyribonukleinsäure nach zweiter reverser Transkription
cDNA	Komplementäre Desoxyribonukleinsäure
CG-Nummer	<i>Curated Gene Number</i> , Klon-Nummer
cm	Zentimeter
COMT	Catechyl-O-Methyltrnsferase
CREB	<i>cAMP-response-element-binding-protein</i>
D2R	Dopaminrezeptor2 ähnlich
DA	Dopamin
DAT	Dopamintransporter
Dat	Dopamin N-Acetyltransferase
DBH	Dopamin-β-Hydroxylase
DDc	Dopamin Decarboxylase
dH ₂ O	Destilliertes Wasser
DNA	Desoxyribonukeleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleinsäuren
DopR	Dopaminrezeptor 1
DopR2	Dopaminrezeptor 2
DTT	Dithiotreitol
EDTA	Ethylendiammentetraacetat
Exp.	Experiment
G	Gehirn
g	Gramm
GABA	γAminobuttersäure
GAL4	Hefetranskriptionsfaktor
GAL-Datei	<i>Gene Pix Array List</i> ; Koordinaten-Lokationsliste
GFP	Green Fluorescence Protein
Glu	Glutamat
GPe	<i>Globus pallidus externa</i>
GPi	<i>Globus pallidus interna</i>
h	Stunde
ID	Identifikationsnummer
k	Kilo
kD	Kilodalton
L2	Larvenstadium zwei
L3	Lavenstadium drei
La	Lamina;
lacZ	Lactose-Operons
L-DOPA	L-Dihydroxyphenylalanin
Lo	<i>Lobula</i>

LP	Laterales Protocerebrum
Lsg.	Lösung
MAOA	Monoaminoxidase A
Me	Medulla
Meso	Mesothorakalganglion
Met	Metathorakalganglion
MHPG	3-Methoxy-4-hydroxyphenylglykol
ml	Milliliter
mM	millimolar
mm	Millimeter
MOPS	3-(N-Morpholino)-Propansulfonsäure
MPP(+)	1-Methyl-4-Phenylpyridinium
MPTP	1-Methyl-4-Phenyl-1,2,3,6-Tetrahydropyridine
mRNA	Botenribonukleinsäure
NBT	4-Nitroblau-tetrazolium-chlorid
nm	Nanometer
Nr	Nummer
OL	Optische Loben
P	Pilzkörper
PBS	Phosphatpuffer
PCR	Polymerasekettenreaktion
PEM	Phanylethanolamin-S-Methyltransferase
Pro	Protocerebrum
Proth	Prothoraklganglion
Re:	Retina
ROS	<i>Radical Oxidative Species</i>
SAGE	<i>Serial Amplifikation of Gene Expression</i>
SNC	<i>Substantia nigra pars compacta</i>
SÖG	Subösophagialganglion
SSC	Natriumcitratpuffer
STN	<i>Subthalamischer nucleus</i>
Syn	Synuclein
Tbh	Tyramin β -Hydroxylase
TCS	Transmission Confocal System;
T	Tage
TH	Tyrosinhydroxylase
U/min	Umdrehungen pro Minute
UAS	Upstream-Activator-Sequence
usw	und so weiter
UV	Ultraviolett
V	Versuch
VMS	Vanillylmandelinsäure
WT	Wildtyp
Zk	Zentralkörper

1.0 Einleitung

Neurodegenerative Erkrankungen wie Alzheimer, Huntington und Parkinson gehören zu den häufigsten Erkrankungen des Menschen. Diese insbesondere im letzten Lebensabschnitt auftretenden Erkrankungen, haben im allgemeinen eine schlechte Prognose und stellen nicht nur für den Betroffenen, sondern auch für sein näheres Umfeld eine erhebliche Belastung dar. Für die drei genannten Erkrankungen sind derzeit kaum erfolgversprechende Therapieansätze verfügbar. Einen Ausweg aus dieser Situation bietet ein besseres Verständnis der dieser Erkrankungen zugrunde liegenden molekularen Prozesse. Im Falle des *Morbus Parkinson* (1817 von dem Londoner Arzt James Parkinson [1755-1824] als eine *Paralysis agitans* bezeichnete Erkrankung beschrieben), von der ca. 1% der Bevölkerung über 60 Jahre betroffen ist (Bower, 1999), konnte gezeigt werden, dass ein Protein namens α -Synuclein eine herausragende Rolle spielt. Es wird in dopaminergen Neuronen der *Substantia nigra* abgelagert und führt dort zum Absterben der entsprechenden Neuronen. Die *Substantia nigra* gehört zum extrapyramidal-motorischen System, welches unwillkürliche Muskelkoordination, Begleitbewegungen und den Ablauf gelernter motorischer Programme koordiniert. Das Fehlen dieser Zellen führt zu den bekannten Symptomen des *Morbus Parkinson*, die allesamt auf Störungen der Bewegungssteuerung basieren:

1. *Akinese* (Verlangsamung von Bewegungen, keine Folgebewegungen)
2. *Rigor* (Steifigkeit der Bewegungsabläufe)
3. Ruhetremor (Zittern der Hände im Ruhezustand)

Bei familiär auftretendem Parkinson konnten zwei Mutationen im α -Synuclein-Gen identifiziert werden, die zum Austausch der Aminosäuren an den Positionen 30 und 53 führen (Polymeropoulos et al., 1997 ; Krüger et al., 1998). Die entsprechenden veränderten Proteine zeigen eine weit größere Neigung zur Aggregation und zur Ausbildung sogenannter *Lewy-Körper* (Spillantini et al., 1997), was mit der Ausprägung einer schweren Form des Parkinsons korreliert. Obwohl die Bedeutung des α -Synuclein für die Erkrankung allgemein akzeptiert wird, ist unser Wissen bezüglich anderer Aspekte dieser Erkrankungen rudimentär. Warum Parkinson überhaupt ausbricht, warum gerade dopaminerge Neuronen der *Substantia nigra* absterben, wie dieser Prozeß ausgelöst wird oder was in den nachgeschalteten Neuronen passiert, ist weitgehend unbekannt.

Die biomedizinische Grundlagenforschung hat in den letzten Jahrzehnten entscheidend von Erkenntnissen profitiert, die an wirbellosen Modellorganismen wie *Drosophila melanogaster* und *Caenorhabditis elegans* gewonnen wurden. Derartige Organismen bieten den unschätzbaren Vorteil, dass sie vergleichsweise einfach organisiert sind und vielfältigen genetischen, physiologischen und pharmakologischen Untersuchungen zugänglich sind. In jüngster

Vergangenheit wurden neue *Drosophila melanogaster* und *Caenorhabditis elegans* Modelle für die Analyse humaner Erkrankungen eingeführt. Besonders hervorzuheben sind hierbei die Parkinson-, Huntington- und Alzheimer-Modelle, die sowohl phänotypisch wie auch pharmakologisch den korrespondierenden Mausmodellen entsprechen und verblüffende Übereinstimmungen mit den humanen Krankheitsbildern zeigen (Beal, 2001).

Diese Übereinstimmungen lassen den Schluss zu, dass grundlegende Eigenschaften dieser Systeme zwischen Säugetieren und Insekten/Nematoden konserviert sind. So kann ein „Parkinson-Äquivalent“ durch Expression des humanen α -Synuclein sowohl bei *Drosophila melanogaster* als auch bei *Caenorhabditis elegans* induziert werden. Interessanterweise sind primär bei beiden Organismen dopaminerge Neurone beteiligt. Die sich ergebenden phänotypischen Veränderungen sind den bei Parkinson-Patienten zu beobachtenden vergleichbar. In beiden Fällen ist die Bewegungskoordination entscheidend gestört.

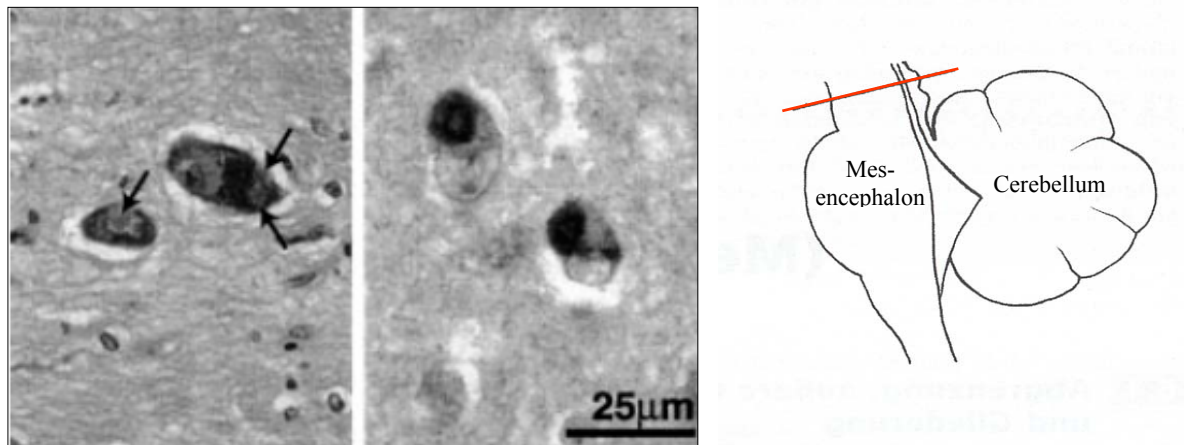


Abbildung 1.1 Linke Seite und Mitte: Dopaminerge Zellen mit *Lewy*-Körpern (Pfeile links) in *Substantia nigra* (links) und in der *Amygdala* (rechts) Aus: *Clinical correlates of selective pathology in the amygdala of patients with Parkinson's disease* (Halliday, 2002) Rechte Seite: Lage der *Substantia nigra* im menschlichen Gehirn (roter Balken). Verändert nach Trepel (2003)

1.1 Synuclein und *Substantia nigra*

Neben der *Substantia nigra* ist auch die *Amygdala* von der Bildung von *Lewy*-Körpern betroffen (Abbildung 1.1; Halliday et al., 2002). Die Bildung von *Lewy*-Körpern geht auch hier einher mit einem Verlust von Neuronen (Abbildung 1.2). Dieser Verlust an Zellen könnte mit dem beobachteten psychischen Symptomen bei Parkinson Patienten, wie Halluzinationen oder Depression in Zusammenhang stehen.

Lewy-Körper sind runde intracytoplasmatische Einschlüsse, die sich mit Antikörpern nachweisen lassen (Halliday et al., 2002). Ihr Hauptbestandteil im Fall der Parkinsonschen Erkrankung ist das α -Synuclein (Spillantini et al., 1997). Neben dem α -Synuclein finden sich in

den Einschlüssen verschiedene dem Synuclein assoziierte Proteine, wie Parkin (Shimura et al., 2001) und UCH-L1 (Lowe et al., 1990).

Bislang ist nicht geklärt, welche Funktionen die *Lenny*-Körper haben und welche Folgen für die betroffenen Zellen damit einhergehen. Es wird diskutiert, dass die Bildung von *Lenny*-Körpern eine Form der Abwehr der Zellen ist, um nicht degradierbare Proteine zu entsorgen (Olanow et al., 2004). Möglicherweise werden die Zellfunktionen neben dem Funktionsverlust der Proteine auch durch die *Lenny*-Körper selbst gestört und die Zelle stirbt dadurch (Conway, 1998; Rockwell et al., 2000).

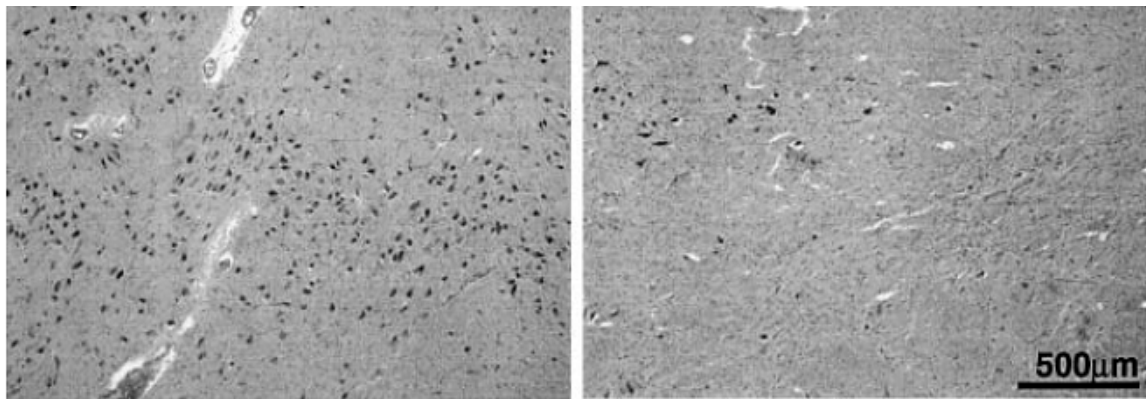


Abbildung 1.2 Zeigt einen mit Haematoxylin/Eosin angefärbten Querschnitt durch die *Substantia nigra* eines an Parkinson Erkrankten (rechts) und zum Vergleich ein Querschnitt aus einem gesunden Kontrollindividuum (links). Deutlich zu erkennen sind dopaminerge Zellen (schwarze Punkte) in (A) und der Verlust in (B). Aus *Clinical correlates of selective pathology in the amygdala of patients with Parkinson's disease*. Halliday et al., (2002)

1.2 Dopamin und dopaminerges System

Das zentralnervöse dopaminerge System lässt sich entsprechend der Ursprungs- und Projektionsgebiete in zwei wichtige Subsysteme unterteilen: Das nigrostriale Dopaminsystem entspringt in der *Substantia nigra*, ist die größte Gruppe dopaminergischer Zellen im Gehirn und endet im dorsalen Teil des *Striatums*. Die Zellkörper des *mesolimbischen* Dopaminsystems liegen im ventralen *Tegmentum* des Mittelhirns und senden ihre Axone in das ventrale *Striatum*, die *Amygdala* und den präfrontalen Kortex. Das Projektionsgebiet des mesolimbischen Dopaminsystems (u.a. präfrontaler Kortex) hat zu der Annahme geführt, dass Dopamin bei der Regulation höherer kognitiver Fähigkeiten, Emotionen und Verhalten eine wichtige Rolle spielt. Der anteriore *Gyrus cingulus* zeigt die höchste kortikale Innervation mit dopaminergen Zellen. Auch in der Verteilung der dopaminergen Endigungen auf die verschiedenen Zellschichten unterscheidet der anteriore *Gyrus cingulus* von anderen Kortexarealen: Im anterioren *Gyrus cingulus* enden die dopaminergen Axone in Schicht II-IV, wohingegen sie in anderen Kortexregionen tief in Schicht V liegen (Descarries et al., 1987). Dopaminerge Zellen lassen sich mit Haematoxylin/Eosin anfärben (Issidorides et al., 1989), siehe Abbildung 1.2.

Das *nigrostriale* Dopaminsystem erhält seine exzitatorischen Afferenzen über das *Striatum* vom Cortex, wo Bewegungen geplant werden (Abbildung 1.3). Es führt seine Efferenzen über einen „direkten“ und „indirekten“ Pfad zurück zu den prämotorischen Zentren des *Thalamus*, der wiederum seine Efferenzen zu den motorischen Zentren des Cortex zurückführt.

Der „direkte“ Pfad führt über eine inhibitorische Efferenz zum *Globus Pallidus interna* (GPi) und *Substantia nigra pars reticularis* (SNr) und von dort über eine inhibitorische Efferenz direkt zum *Thalamus*. Beide Teilabschnitte haben als Transmitter γ -Aminobuttersäure (GABA). Der „indirekte“ Pfad führt über eine inhibitorische Efferenz zum *Globus pallidus externa* (GPe), vermittelt durch GABA und von dort auf einer inhibitorischen Efferenz (GABA) zum *Subthalamischen nucleus* (STN). Vom STN führt eine exzitatorische Efferenz zum GPi, vermittelt durch den Transmitter Glutamat (Glu). Vom GPi/SNr führt eine inhibitorische Afferenz (GABA) zum *Thalamus* und von dort über eine exzitatorische Efferenz (Glu) zu den motorischen Zentren des Cortex.

Das Dopamin der *Substantia nigra pars compacta* wirkt, fördernd auf den „direkten“ Pfad und hemmend auf den „indirekten“ Pfad (Parent, 2000).

Eine Störung der Dopaminausschüttung im *Striatum* auf den „indirekten“ Pfad, bewirkt dass vermehrt GABA auf den GPe ausgeschüttet wird, der wiederum weniger GABA auf den STN ausschüttet. In der Folge wird vom STN mehr Glutamat auf den GPi/SNr-Komplex ausgeschüttet und von dort mehr GABA auf den *Thalamus*. Dies wiederum bewirkt, daß weniger Glutamat in die motorischen Zentren des Cortex ausgeschüttet wird. Dies erklärt,

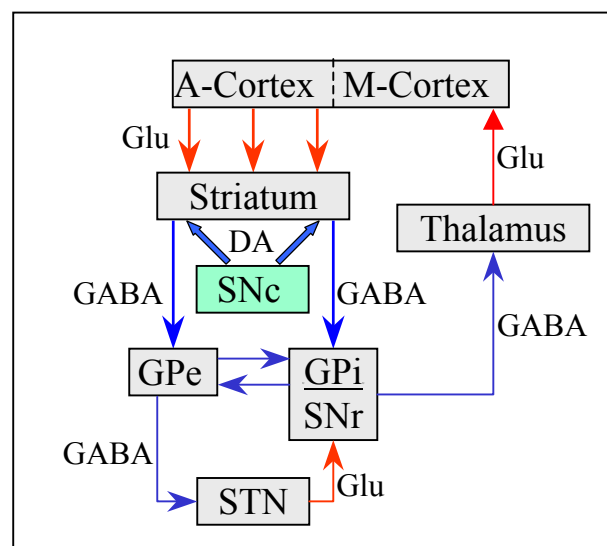


Abbildung 1.3 Dopaminerges System (schematisch). Inhibitorische Verbindungen sind durch blaue Pfeile, exzitatorische durch rote Pfeile dargestellt. A-Cortex: Assoziationscortex; M-Cortex: Motorcortex; Glu: Glutamat; GABA: γ Aminobuttersäure; DA: Dopamin. SNc: *Substantia nigra pars compacta*; GPe: *Globus pallidus externa*; GPi: *Globus pallidus interna*; SNr: *Substantia nigra pars reticularis*; STN: *Subthalamischer nucleus*. Verändert nach Parent (2000).

warum Patienten mit der Parkinsonschen Erkrankung Schwierigkeiten beim Starten von Bewegungsabläufen haben (*Akinese*).

Auf dem „direkten“ Pfad führt die verminderte Ausschüttung von GABA auf den GPi/SNr-Komplex zum gleichen Ergebnis der vermehrten Ausschüttung von GABA auf den Thalamus.

In den kleinen Kernen des Diencephalons dient das Dopamin der Regulation endokriner und vegetativer Funktionen. Das Dopamin hat hier nicht nur eine Funktion als Neurotransmitter, sondern auch als Hormon. So hemmt es z. B. gemeinsam mit dem Endothelin die Abgabe des Prolaktins aus der Adenohypophyse.

1.3 Biosynthese des Dopamins

Unter den biogenen Aminen gehört Dopamin zu den Katecholaminen. Katecholamine tragen zwei Hydroxy-Gruppen am Grundkörper. Dopamin wird aus der Aminosäure Tyrosin über die Zwischenstufe L-DOPA (L-Dihydroxyphenylalanin) durch einen Decarboxylierungsschritt synthetisiert (Abbildung 1.4). Die Synthese findet im Cytosol statt und der Transmitter wird mit Hilfe des vesikulären Dopamintransporters in dopaminerge Vesikel verpackt. Von dem Dopamin lassen sich die Katecholamine Noradrenalin und Adrenalin ableiten.

Dopamin bindet an zwei Gruppen von Dopaminrezeptoren (D), die jeweils zur Familie der 7-Transmembranrezeptoren gehören. Während die Aktivierung der D₁-Typ Rezeptoren (D₁, D₃, D₅) zu einer cAMP-Produktion führen, hat die Bindung des Dopamins an die D₂-Typ Rezeptoren (D₂, D₄) den gegenteiligen Effekt. Die Rezeptoren befinden sich sowohl post- als auch präsynaptisch. Präsynaptisch wirken sie als sogenannte Autorezeptoren. Nach der Wiederaufnahme durch den Dopamintransporter (DAT) in die synaptische Endigung wird Dopamin durch die Monoaminoxidasen A und B bzw. durch die Katechol-O-Methyltransferase inaktiviert.

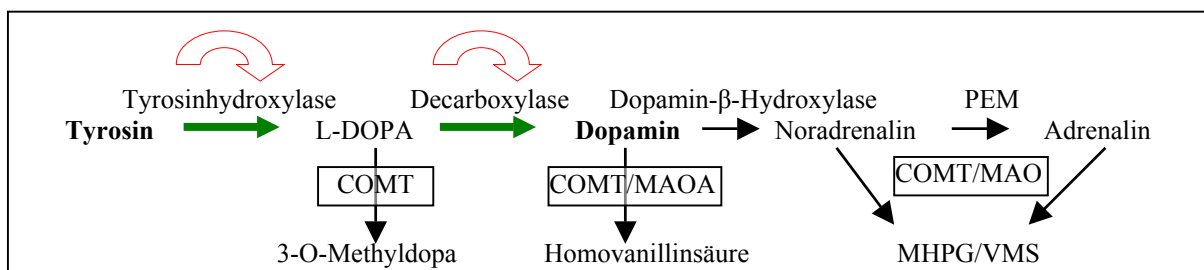


Abbildung 1.4 Metabolismus der Katecholamine. Es sind nur die wichtigsten Schritte und die Enzyme, die als Kandidatengene in diese Arbeit eingegangen sind, dargestellt. MAOA: Monoaminoxidase A, DBH: Dopamin-β-Hydroxylase, TH: Tyrosinhydroxylase, COMT: Catechol-O-Methyltransferase, MHPG: 3-Methoxy-4-hydroxyphenylglykol, PEM: Phenylethanolamin-N-Methyltransferase VMS: Vanillylmandelinsäure. Verändert nach Brautigam (1999).

1.4 Funktion des Synucleins

Das Synuclein ist ein ~19kD schweres Protein, bestehend aus 140 Aminosäuren (Clayton und George, 1998 und 1999; George, 2002). Es wird gehäuft in präsynaptischen Endigungen verschiedener Gehirnregionen exprimiert und findet sich in 3 Subtypen wieder: α -, β -, γ -Synuclein (Clayton und George, 1999; George, 2002; Lavedan, 1998)

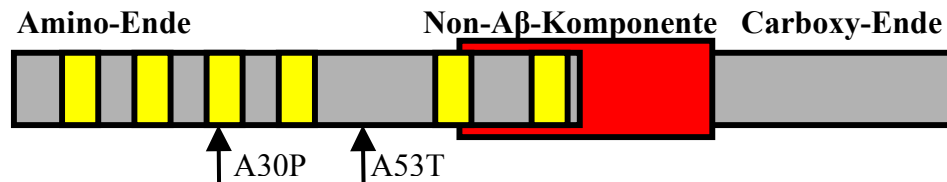


Abbildung 1.5 Aufbau des α -Synucleins. Es gibt drei Hauptabschnitte: Amino- und Carboxy-Ende und die mittlere, Non-A β -Komponente. Die repetitiven Sequenzen im Bereich des Amino-Endes sind gelb hinterlegt, die Orte der Mutationen der familiären Formen sind durch Pfeile gekennzeichnet. Verändert nach Kahle (2001).

Alle Synucleinformen bestehen aus drei Abschnitten: Einem hochkonservierten Amino-Ende (Aminosäuren 1-67) mit einer repetitiven Aminosäuresequenz, einem hydrophoben Mittelteil (AS 61-95), welches non-A β Komponente genannt wird und einem Carboxy-Ende (Abbildung 1.5). Es ist zu 50% mit Membranen assoziiert und liegt zu 50% frei im Cytosol vor. Zur Funktion werden verschiedene Hypothesen diskutiert. Es finden sich Untersuchungen die

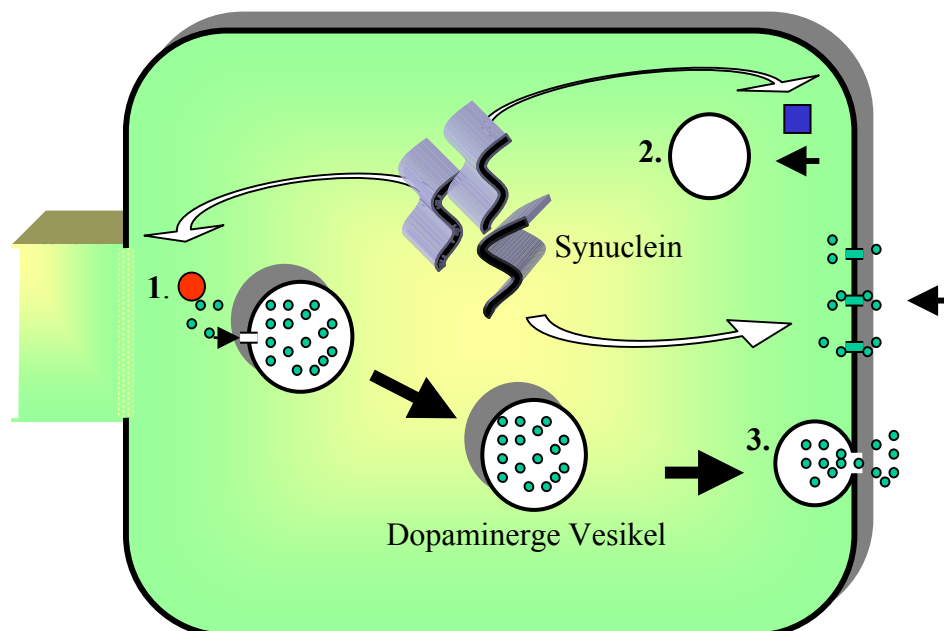


Abbildung 1.6 Synapse eines dopaminergen Neurons: Dopamin wird von der Tyrosinhydroxylase synthetisiert (1) und in Vesikel verpackt. Dopaminerge Vesikel wandern in die Richtung des synaptischen Spalts und verschmelzen dort bei Bedarf mit der Zellmembran. Mögliche Wirkungen des Synucleins sind mit weißen Pfeilen gekennzeichnet. Dazu gehört ein regulatorischer Effekt auf eine Phospholipase D2 mit Folgen für die Vesikelrekrutierung (2), die Regulation des membrangebundenen Dopamintransporters (3) oder die negative Regulation der Tyrosinhydroxylase (1)

zeigen, dass das Synuclein negativ regulatorisch auf die Tyrosinhydroxylase wirkt. Die Tyrosinhydroxylase ist das entscheidende Enzym bei der Synthese des Dopamins (Perez et al., 2002), in Abbildung 1.6 mit (1) bezeichnet. Andere zeigen, dass das Synuclein die Funktion des membrangebundenen Dopamintransporters (DAT) reguliert (Sidhua et al., 2004), Abbildung 1.6 (2) oder, dass das Synuclein einen regulatorischen Effekt auf die Phospholipase D2 hat, welche ihrerseits über Zwischenprodukte Einfluss auf die Rekrutierung neuer Vesikel aus der synaptischen Membran hat (Brundin und Lotharius, 2002), siehe Abbildung 1.6 (3). Letztendlich haben Störungen in den dargestellten Funktionen des Synucleins Folgen für die Menge des freien Dopamins in den Synapsen und somit auch für die Konzentration der relevanten Abbauprodukte.

1.5 Ursachen für die Parkinsonsche Krankheit

Als mögliche weitere Ursachen für den Verlust dopaminerger Zellen wurden sowohl genetische Faktoren (Krüger et al., 1998; Polymeropoulos et al., 1997), als auch exogene Faktoren, wie z.B. die Exposition mit Insektengiften (Rotenon) gefunden (Vanacore et al., 2002). Beide Möglichkeiten führen offensichtlich zum erhöhten oxidativen Stress in den dopaminergen Neuronen und schließlich zu deren Verlust.

1.5.1 Zelluläre Prozesse

Der Abbau des Dopamins führt, bei normalem intrazellulärem pH-Wert, durch Autooxidation, zur Bildung von Dopamin-Quinon, Wasserstoffperoxid und Hydroxyl-Radikalen (Graham, 1978). Die Monoaminoxidase baut das Dopamin zu der nicht giftigen 3,4-Dihydroxyphenylacetsäure ab, aber auch zu Wasserstoffperoxid, was wiederum zu cytotoxischen Hydroxylradikalen abgebaut wird (Maker et al., 1981). Die bei diesem Prozess entstehenden freien Sauerstoffradikale (ROS [Radical Oxidative Species]) sind für die Zelle toxisch und müssen daher abgebaut werden. Erfolgt dieses nicht, kommt es in den betroffenen Zellen zu verstärktem oxidativen Stress, da ROS unspezifische Schädigungen an Membranen und anderen Zellbestandteilen hervorrufen (Halliwell, 1992).

Diese Prozesse laufen vermehrt dann ab, wenn sich das Dopamin frei im Cytoplasma befindet. Mutationen des Synucleins führen möglicherweise zu einer verringerten Anzahl von Vesikeln, die Dopamin transportieren können und dadurch zu einer Erhöhung des cytoplasmatischen Dopaminspiegels.

Dopamin-Quinon wiederum kann seinerseits als 5-Cysteinyl-Dopamin an das Synuclein binden, wobei es zur Bildung cytotoxischer Protofibrillen kommt (Ogawa et al., 2004). Diese Fibrillen können ihre normale Funktion nicht mehr erfüllen und müssen entsorgt werden. Es kommt zu einer Kaskade der „Selbstzerstörung“ dopaminerger Zellen, sobald der Prozess der

ROS-Bildung einmal eingesetzt hat (Brundin et al., 2002).

1.5.2 Exogene Ursachen

Exogene Ursachen für die Parkinsonsche Krankheit ist die Exposition mit Neurotoxinen wie zum Beispiel mit dem 1-Methyl-4-Phenyl-1,2,3,6-Tetrahydropyridine (MPTP). Die Aufnahme von MPTP führt, nach wenigen Tagen zu einer Entwicklung von parkinson- ähnlichen Symptomen und histologisch betrachtet zur Degeneration dopaminerger Zellen in der *Substantia nigra* (Youdim et al., 2004). Das MPTP wird durch den Dopamintransporter selektiv in dopaminerge Zellen aufgenommen und von der Monoaminoxidase zu 1-Methyl-4-Phenylpyridinium (MPP(+)) verstoffwechselt. Dieser selektive Mechanismus ist der Grund für die selektive Wirkung auf dopaminerge Zellen.

In der Folge der Synthese des (MPP(+)) scheint es zu einem komplexen Aufschaukeln der Entstehung von ROS zu kommen. Zum einen ist MPP(+) ein Hemmstoff für den Mitochondrienkomplex I und führt dadurch zur Entstehung von ROS, zum anderen gibt es Anzeichen dafür, das MPP(+) den Transport von Dopamin über den vesikulären Dopamintransporter ins Cytosol fördert (Lotharius et al., 2000). Wobei in der Folge wiederum ROS entstehen. Außerdem könnte dies die Selektivität für dopaminerge Neurone erklären.

1.5.3 Genetische Faktoren

Als genetisch bedingte Ursachen für die Parkinsonsche Erkrankung konnten sowohl die Mutationen A30P und A53T des Synucleins (Krüger et al., 1998; Polymeropoulos et al., 1997), als auch Mutationen die den Ubiquitin vermittelten, enzymatischen Abbau von Proteinen (Synuclein) betreffen, identifiziert werden. Bei den Mutationen A30P und A53T kommt es zum Austausch der Aminosäure Alanin an Position 53 durch Threonin bzw. der Aminosäure 30 Alanin durch Prolin. Beide Mutationen beeinflussen die Ausbildung der Tertiärstrukturen des Synucleins und dadurch die Bindungsfähigkeit an Membranen (Conway et al., 1998 und 2000). Die „normale“ Funktion des Synucleins ist dadurch offensichtlich gestört. In diesem Zusammenhang wird die Ausbildung zylinderförmiger Protofibrillen diskutiert, die sich aus α -Synuclein zusammensetzen und unspezifisch Membranen durchdringen. Dieses hat im Allgemeinen dramatische Folgen für die betroffene Zelle und führt im Fall dopaminerger Vesikel zum Ausstrom des Dopamins mit oben beschriebenen Folgen (Landsbury et al., 2000; Volles et al., 2001). Ob und in welcher Funktion Prozesse wie Apoptose (kontrollierter Zelltod) eine Rolle bei der Degeneration dopaminerger Zellen spielen, ist bisher erst teilweise aufgeklärt (Kermer und Bähr, 2002). Auch gibt es wenig Informationen darüber, welche intrazellulären Signalkaskaden möglicherweise an einer Aktivierung von Transkriptionsfaktoren zu einer zellulären Antwort bei der Ausbildung der Parkinsonschen Erkrankung beteiligt sind.

1.6 Behandlungsmöglichkeiten für die Parkinsonsche Erkrankung

Alle bisher bekannten Strategien zur Behandlung der Parkinsonschen Erkrankung können diese nicht heilen, sondern nur temporär die Symptome lindern. Die bisherige „klassische“ Behandlungsmöglichkeit für Patienten mit Parkinsonscher Erkrankung ist eine Substitution des nicht mehr ausgeschütteten Dopamins durch die Dopaminvorstufe L-DOPA (Leskow und Lachenmeyer, 1992), das die Blut-Hirn-Schranke passieren kann und in den Nervenzellen zu Dopamin umgewandelt wird. Die langfristige Einnahme von L-DOPA führt zu sogenannten „*End of dose*“-Effekten (Fuchs, 1997), d.h. es kommt entweder zu schwer kontrollierbaren Wirkungsschwankungen wie dem „*On-off*-Phänomen“ (Merims et al., 2003) oder zur völligen Wirkungslosigkeit des Medikaments.

Durch diese Behandlung wird in die vorletzte Stufe im Wirkmechanismus des dopaminergen Systems eingegriffen, der Neurotransmitter wird ersetzt. Eine weitere Strategie ist die Behandlung mit Dopaminrezeptoragonisten, wie Apomorphin, die die Wirkung des Dopamins an seinen Rezeptoren nachahmen (Zijlmans et al., 2004).

Neuere Ansätze versuchen die Degeneration dopaminerger Zellen zu verhindern, indem sie oben angesprochene oxidative Prozesse verhindern oder abschwächen. Ein Beispiel ist die Behandlung mit Monoaminoxidase-Hemmern oder Substanzen mit anti-apoptotischen Eigenschaften (Buccafusco et al., 2005). Zuletzt genannte Strategien müssen natürlich im Tiermodell experimentell erprobt werden, wobei neueste molekularbiologische Techniken (Array-Technologie) wichtige Instrumente zur Überprüfung der Ergebnisse sein können.

Es hat sich gezeigt, dass der Einsatz transgener Tiere in Kombination mit modernen cDNA-*Microarray*-Methoden wesentliche Fortschritte für das Verständnis der Pathogenese bringen kann, was letztlich in neue, effektivere Behandlungsstrategien münden kann.

1.7 Genom und Transkriptom

Das Genom repräsentiert die Gesamtheit aller Gene eines Organismus. Die Transkriptom-Analyse eröffnet neue und umfassende Einblicke in den physiologischen Zustand einer Zelle oder eines Organs. Begriffe wie Genom und Transkriptom spielen schon seit geraumer Zeit eine zentrale Rolle in der modernen Biomedizin.

Schon 1934 formulierte Paul Morgan die Theorie der differentiellen Genaktivität. Hierbei hatte er zunächst die nacheinander geschaltete Aktivierung verschiedener Gene während der Entwicklung eines Organismus im Auge. Seither hat es bezüglich der Aufklärung der molekularen Struktur und Funktion der Gene entscheidende Fortschritte gegeben. Angefangen bei der Bestätigung der „*One-gene one-enzyme*“-Hypothese (Vorgeschlagen von Beadle, Ephrussi und Tatum, 1941), über die Aufklärung der Struktur der DNA-Doppelhelix durch Watson und Crick (1956) oder die Codierung der Aminosäuren in einem Triplett-Code

bis hin zur Sequenzierung des Genoms von Modellorganismen wie *Caenorhabditis elegans*, *Drosophila melanogaster* (Venter et al., 2001) und *Mus musculus*.

Heute kann differentielle Genexpression als Tatsache angesehen werden. Dies wurde bestätigt zum Beispiel durch die Analyse sogenannter „*Homöobox-Gen*“, oder die Tatsache, dass zum Beispiel bestimmte Neurotransmitter ausschließlich in bestimmten Nervenzellen synthetisiert werden, was sich nur durch eine differentielle Genexpression verschiedener Enzyme zur Synthese dieser Neurotransmitter erklären lässt.

Differentielle Genexpression kann begriffen werden als Expression verschiedener Gene in einem Organismus zu verschiedenen Zeitpunkten, in verschiedenen Geweben oder Geschlechtern (Abbildung 1.7). Ursachen für die differentielle Genexpression sind u.a. die Substratinduktion und die damit ausgelöste Expression bestimmter Stoffwechselenzyme gezeigt am Beispiel des Lactose-Operons (*lacZ*) von *Escherichia coli*, die rezeptorvermittelte Initiation der Transkription zur Expression bestimmter Ionenkanäle oder Rezeptoren (CREB-Elemente [*cAMP-responsive-elements*]), oder der Start bestimmter Entwicklungsvorgänge (Hox-Gene) und die Rezeptorvermittelte Apoptose (kontrollierter Zelltod). Es gibt allerdings immer einen bestimmten Satz von Genen, die in allen Geweben, Geschlechtern und zu allen Zeitpunkten der Entwicklung eines Organismus exprimiert werden, die sogenannten „*Housekeeping-Gen*“. Gesteuert wird das „An und-Abschalten“ differentiell exprimierter Gene über das Wirken von Transkriptionsfaktoren, auf die Promotoren, *Enhancer* und *Silencer* der Gene.

Besonderes Interesse hat die Analyse differentieller Genexpression gewonnen, durch das Bekanntwerden, dass es im Verlauf von krankheitsbedingten Vorgängen, wie zum Beispiel

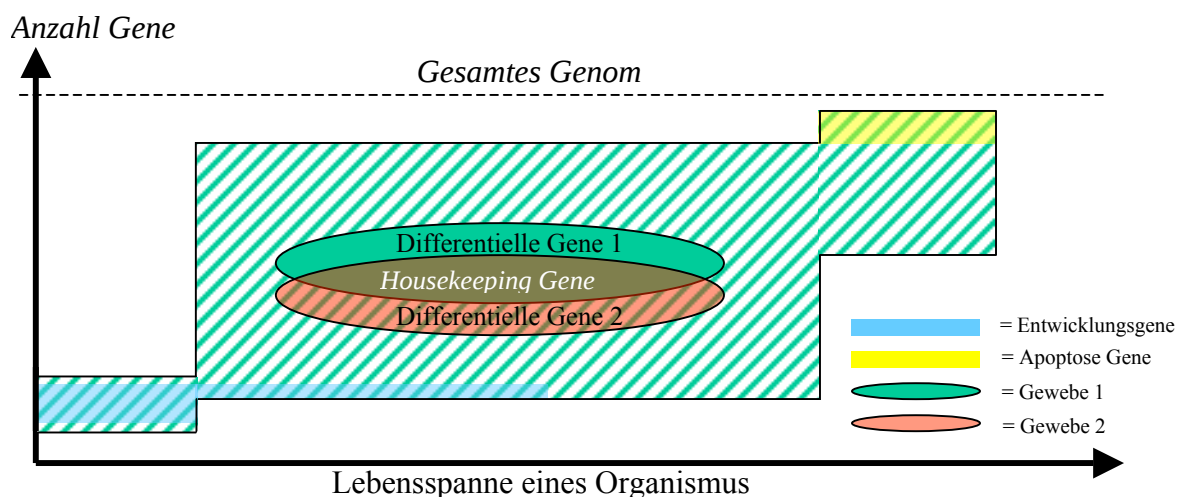


Abbildung 1.7 In obiger Grafik ist beispielhaft differentielle Genexpression zweier Gewebe, im Verlauf der Lebensspanne eines Organismus dargestellt. Die Gesamtheit aller exprimierten Gene ist grün schraffiert. Zu Beginn der Entwicklung werden wenige Gene und Entwicklungsgene (blau) exprimiert. In der Adultphase wird eine große Anzahl an Genen exprimiert, während zum Ende der Lebensspanne apoptotische Gene (gelb) aktiv sind und die Gesamtzahl exprimierter Gene abnimmt. Differentielle Genexpression, ergibt sich überall dort, wo Gene ausserhalb der Schnittmenge exprimierter Gene zweier, zu vergleichender Gewebe zu finden sind (rot/grün hinterlegt).

von Tumorerkrankungen oder neurodegenerativen Erkrankungen, zur differentiellen Expression von Genen kommt. Diese Erkenntnisse beruhen allerdings bis heute auf Einzeluntersuchungen zu den beteiligten Proteinen zum Beispiel durch die Isolierung von Proteinen. Was bisher allerdings noch nicht geklärt wurde, ist die Gesamtheit von differentiell exprimierten Genen in Geweben, Geschlechtern und Zeitpunkten. Diese Gesamtheit, inklusive der „*Housekeeping-Gene*“ bezeichnet man als Transkriptom, wobei sich das Interesse natürlich auf die differentiellen Gene konzentriert. Eine völlig neue Möglichkeit zur Untersuchung und Darstellung des Transkriptoms ist die Arbeit mit *cDNA-Microarrays*, mit deren Hilfe die Gesamtheit der exprimierten Gene analysiert werden kann.

1.8 Methoden zur Untersuchung differentieller Genexpression

Grundsätzlich kann differentielle Genexpression auf verschiedenen Wegen untersucht werden. Hierbei sind besonders die Transkriptions- und Translationsebene von Bedeutung. Während im ersten Fall die mRNA analysiert wird, bezieht sich die zweite Strategie auf die Endprodukte der Expression, die Proteine. Unterschiede auf der Ebene der Proteine werden im Allgemeinen mit Hilfe der 2D-Gelelektrophorese und sich anschließender massenspektroskopischer Analyse untersucht. Der Nachteil dieser Methode ist darin zu sehen, dass sowohl schwach exprimierte Proteine als auch Membranproteine einer derartigen Analyse kaum zugänglich sind.

Um die differentielle Genexpression direkt auf Ebene des Gewebes zu analysieren, bieten sich verschiedene Methoden an. Dazu gehört der Einsatz, wobei die zu untersuchenden Organismen oder Gewebe in der Regel mit einem *Kryotom* oder *Vibratom* in dünne Scheiben (10µm-15µm) geschnitten werden und dann mit den entsprechenden Antikörpern inkubiert werden. Die folgende Anfärbung kann dann die unterschiedliche Genexpression der Zielproteine zeigen. Allerdings werden für diesen Weg spezifische Antikörper gebraucht und es lässt sich immer nur ein Zielprotein untersuchen.

Bei der *Enhancer-Trap* Methode wird mit Hilfe der P-Elemente (im Genom von *Drosophila melanogaster* vorkommende Einheiten, die ganze Genabschnitte verschieben) das Gen für die β -Galaktosidase unter die Kontrolle eines beliebigen *Enhancers* (Abschnitte im vorderen Bereich der Gene, welche die Transkription initiieren) gestellt und somit nur in bestimmten Teilen des Organismus exprimiert. Im folgenden Schritt werden die Organismen histologisch aufgearbeitet, durch Inkubation mit dem Substrat der β -Galaktosidase, der Galaktose, und einer anschließenden Färbereaktion. Dadurch, dass bei jedem Versuch die *Enhancer Trap* an einer anderen Stelle im Genom inseriert, zeigt sich die Expression der β -Galaktosidase auch an einer anderen Stelle und ist somit ein Nachweis für differentielle Genexpression. Der Nachteil dieser Methode ist, dass die Insertion ins Genom nicht zielgerichtet ist und somit

eine Unzahl von Versuchen notwendig ist um eine repräsentative Anzahl von Genen lokalisieren zu können. Außerdem wird dadurch weder die Sequenz noch die Funktion der lokalisierten Gene bekannt.

Auf der Ebene der Transkription, d.h. der transkribierten mRNAs, ergeben sich eigene Ansätze zu denen die *Differential-Display-PCR*, die subtraktive Hybridisierung, die SAGE (*Serial Amplifikation of Gene Expression*) und vor allem die cDNA-Microarray-Analyse gehören.

Bei der *Differential-Display-PCR* (Liang und Pardee, 1992) wird zunächst die mRNA der zu untersuchenden Gewebe isoliert und revers transkribiert. Die so entstandene cDNA-Population wird durch Amplifikation mit spezifischen *Primern* (Transkriptionsinitiationsfaktoren) in Subpopulationen aufgeteilt und dann mit biotinylierten Zufalls-*Primern* nochmals amplifiziert und elektrophoretisch aufgetrennt. Proben zu vergleichender Gewebe laufen parallel. Durch die Konstruktion der Transkriptions-Initiationsfaktoren (*Primer*) kann schon im zweiten Amplifikationsschritt, gezielt nach bestimmten Genen (Transmembranproteinen o.Ä.) gesucht werden. Dies ist sicher ein Vorteil gegenüber den oben genannten Methoden, wobei dieses Vorgehen relativ zeitaufwendig ist und die Anzahl der zu ermittelnden differentiell exprimierten Gene eingeschränkt ist.

Die für diese Arbeit gewählte Methode ist das *Screening* und der Vergleich der Expressionsmuster mit Hilfe der cDNA-Microarray-Analyse. Grundgedanke der *Array-Technologie* ist es, parallel aus hunderten bis tausenden von Repräsentanten entsprechender Gene eines Organismus Hybridisierungen durchzuführen. Die Repräsentanten (meistens cDNA-Klone oder abgeleitete Oligonukleotide) werden auf einem Glaträger (meistens im Objektträgerformat) aufgebracht, wo sie für eine Hybridisierung zugänglich sind (Abbildung 1.8). Durch Hybridisierung mit aus verschiedenen Geweben oder Entwicklungsstufen gewonnener und Fluoreszenz markierter cDNA kann nun ein Vergleich der Genexpressionsmuster derselben erfolgen.

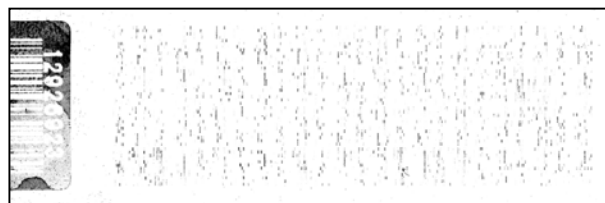


Abbildung 1.8 *Canada-12k-Drosophila-Microarray* in Originalgröße. Array Nr. 12926923. Hybridisiert mit eigenen Proben.

Auf Objektträgern können mehrere tausend Klone aufgebracht werden. Im Fall des in dieser Arbeit verwendeten *Canada-12k-Drosophila-Microarray* sind 12600 Klone doppelt auf den Objektträger aufgetragen, was annähernd der vorhergesagten Anzahl der Gene von *Drosophila*

melanogaster entspricht. Die übrigen 1400 Plätze sind mit sogenannten Kontrollen bzw. Kontrollgenen belegt, die der Verifikation der Untersuchung dienen.

Der Vorteil dieser Methode gegenüber oben beschriebenen Wegen ist, dass mit einer Untersuchung sofort eine sehr große Anzahl von Genen analysiert werden kann.

1.9 Tiermodelle neurodegenerativer Erkrankungen

Tiermodelle sind mittlerweile ein gut etablierte Standards zur Erforschung neurodegenerativer Erkrankungen (Tabelle 1.1). Dabei handelt es sich um Modelle, bei denen mit neurodegenerativen Krankheiten in Zusammenhang stehende Proteine ektopisch exprimiert werden. Als Beispiel dient die Expression des mit der Alzheimer Erkrankung in Zusammenhang stehenden β -Amyloid Peptid $A\beta_{1-42}$ in *Caenorhabditis elegans* (Link, 1995), das mit der Huntingtonschen Krankheit assoziierte Protein Huntingtin bei *Drosophila melanogaster* (Jackson et al., 1998; Wyang-Ching et al., 2004) oder das ebenfalls mit der Parkinsonschen Erkrankung verbundene Protein Ubiquitin bei *Drosophila melanogaster*.

Des weiteren gibt es Modelle, die mit Hilfe von Neurotoxinen die Degeneration von Nervenzellen und das Ausbilden von Symptomen neurodegenerativer Erkrankungen induzieren (Beal, 2001).

Für die Parkinsonsche Erkrankung im Besonderen gibt es inzwischen diverse Tiermodelle, die auf oben genannten Mechanismen beruhen. Hier geht es zum Beispiel um die Überexpression bzw. ektopische Expression des humanen α -Synucleins bei *Drosophila melanogaster* (Feany und Bender, 2000) und *Mus musculus* (Masliah et al., 2000) oder die Induktion von Parkinson durch MPTP (Walton, 1999), Rotenon (Coulom und Birman, 2004) oder 6-Hydroxydopamin. Alle diese Tiermodelle haben jeweils Vor- und Nachteile. Die Induktion von Parkinson durch Rotenon bei der Ratte führt nicht immer mit vollständiger Sicherheit zu einer Degeneration dopaminerger Zellen. Ebenso wie die Überexpression des Synucleins bei der Maus zwar zu einer Degeneration dopaminerger Zellen führt, aber nicht in der *Substantia nigra*. Außerdem hat das Maus-Überexpressions-Modell den Nachteil, dass die phänotypische Ausprägung mehr als ein Jahr dauert.

Tabelle 1.1 Parkinsonsche Erkrankung im Tiermodell Beispiele

Tiermodell	Protein	Autor
<i>Drosophila melanogaster</i>	Humanes α -Synuclein _{wt} ; A30P/A53T-Synuclein	Feany und Bender, 2000
<i>Mus musculus</i>	Humanes α -Synuclein _{wt}	Masliah et al., 2000
<i>Mus musculus</i>	Synuclein knock out	Abeliovic et al., 2000
Zellkulturen	Synuclein Überexpression	Hsu, 2000; Bangs et al. 2000
<i>Drosophila melanogaster</i>	Rotenonexposition	Coulom und Birman, 2004

Lediglich die Überexpression von Synuclein in der Fruchtfliege bietet alle an ein solches Tiermodell geforderten Vorteile. Dazu gehören die kurze Generationsdauer, ein einfach zu erkennender Phänotyp (statistisch verifizierbare Defizite in der Laufaktivität), die Ausbildung von *Levy*-Körpern und ein graduierter Verlust dopaminerger Zellen über den Zeitverlauf der Lebensspanne eines erwachsenen Tieres (Beal; 2001).

1.10 Dopamin und Dopaminrezeptoren bei Insekten

Dopamin ist schon relativ lange bei Insekten nachgewiesen (Klemm und Axelsson, 1973; Evans, 1980). Es findet sich in vergleichsweise hohen Konzentrationen im Nervengewebe verschiedener Insekten, wie der Honigbiene *Apis mellifera* oder der Heuschrecke *Schistocerca gregaria* (Schäfer und Rehder, 1989; Wendt und Homberg, 1992). Die Anzahl dopaminerger Neurone reicht dabei von wenigen hundert bei der Honigbiene bis zu über 3000 bei der Heuschrecke. Durch immunhistochemischen Nachweis der Enzyme zur Synthese des Dopamins, wie Dopamindecarboxylase oder Tyrosinhydroxylase konnten die dopaminsezernierenden Zellen lokalisiert werden (Abbildung 1.9).

Bei den adulten *Drosophila melanogaster* finden sich die Hauptgruppen dopaminerger Zellen im superioren, medialen und lateralen Protocerebrum. Die medialen Zellgruppen liegen in der Nähe der Pilzkörper. Kleinere Zellgruppen liegen im Subösophagialganglion. Vereinzelt Zellen liegen in den Zellschichten der *Medulla*. Im thorakalen Verbundganglion finden sich die wesentlichen Zellgruppen im Bereich der den abdominalen Segmenten zugehörig ist, sowie in den cranialen Bereichen, welchen den thorakalen Segmenten zugeordnet werden (Monastirioti, 1999). In den Larvalstadien finden sich mehrere Gruppen dopaminerger Zellen lateral in den *Loben*, sowie median und lateral einzelne Neurone im Thorakalganglion (Monastirioti, 1999).

Die Dopaminrezeptoren finden sich bei *Drosophila melanogaster* zum einen in den Perikarien der optischen Loben (Gotzes et al., 1994), als auch in den Somataregionen der Pilzkörper (Han et

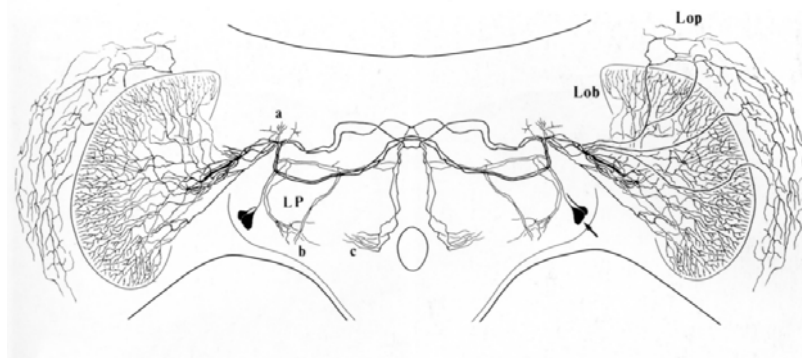


Abbildung 1.9 Dopaminerge Zellen und Projektionen im Gehirn der Schmeissfliege. Die dopaminergen Zellen liegen im ventro-lateralen Protocerebrum und projizieren in die Lobula und in das mittlere Protocerebrum. LP: Laterales Protocerebrum, Lob: Lobula, Lob: Lobula Platte (Nässel, 1999)

al., 1996). Die *Loben* der Pilzkörper werden von oben genannten dopaminergen Zellgruppen innerviert, so dass diese vermutlich Interneurone zwischen den Pilzkörpern als auch zu anderen Neuropilen darstellen. Die Lage dopaminergischer Zellgruppen, sowie die Verteilung der Dopaminrezeptor tragenden Neurone lassen den Schluß zu, dass Dopamin eine Funktion im optischen System, und in den Pilzkörpern hat. Dopamininjektionen in das Mesothorakalganglion von *Manduca sexta* aktivierte den Flugmuster-generator, wodurch gezeigt werden konnte, dass das Dopamin auch eine Rolle beim Generieren von Bewegungsmustern spielt (Claassen und Kammer., 1986). Dies geht konform mit der Lokalisation dopaminergischer Zellen im thorakalen Verbundganglion.

1.11 Das GAL4/UAS-System

Eine anderer Ansatz zur Transkriptomanalyse, der zugleich eine physiologische Charakterisierung ermöglicht, wird mit Hilfe des sogenannten GAL4/UAS-Systems verfolgt. GAL4-Linien von denen mehrere Tausend bei *Drosophila melanogaster* verfügbar sind, exprimieren den Hefe-Transkriptionsfaktor GAL4, abhängig von der Linie, in unterschiedlichen Geweben. Die Kreuzung mit einer zweiten Linie, die ein Reporter- bzw. Effektormolekül (zum Beispiel GFP-cameleon [GFP: „Green Fluorescence Protein“]) unter Kontrolle des von GAL4 erkannten und aktivierten Promotors (UAS, [Upstream Activator

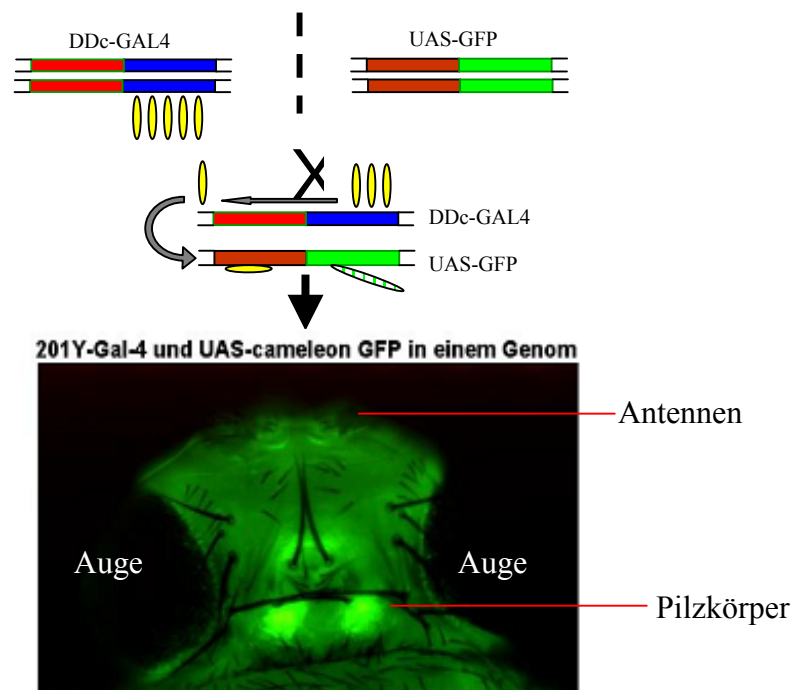


Abbildung 1.10 Die *Drosophila* GAL4 Linie 201Y exprimiert GAL4 exklusiv in den Pilzkörpern. Die Kreuzung dieser Linie mit einer UAS-Cameleon (GFP) Linie ermöglicht die Isolierung der Pilzkörperneurone mit Hilfe des Fluoreszenz aktivierten Zell-Sorters und die anschließende Transkriptomanalyse dieser Zellen, denen für des Lernens und Gedächtnisses eine zentrale Rolle zukommt. Im unteren Teil des Bildes ist ein Fliegenkopf (von dorsal) gezeigt, in dem die Pilzkörper das GFP exprimieren.

Sequence]) enthält, dirigiert die GFP-*cameleon* Expression in die Zellen, in denen GAL4 exprimiert wird. Es gibt mehrere Linien, wie die 201Y-GAL4-Linie oder die DDc-GAL4, die ausschließlich in den Pilzkörpern (Zentren des Lernens und des Gedächtnisses) bzw. den dopaminergen Zellen exprimieren (Abbildung 1.10). Das ermöglicht es, diese Zellpopulationen zu isolieren, physiologisch zu analysieren und sie zu manipulieren. Zudem ist es möglich GFP-fluoreszierende Zellen nach der Dissoziation des Nervensystems, mittels eines FACS (*Fluorescence Activated Cell Sorting*), zu sortieren, die mRNA zu isolieren und eine cDNA zu synthetisieren. Zum anderen können wir, durch den Ca^{2+} -Sensor GFP-*cameleon*, den Ca^{2+} -Haushalt eben dieser Zellen analysieren. Das ermöglicht es uns zu überprüfen, ob die Information bezüglich der Rezeptorausstattung z.B. der Pilzkörper, die wir mit Hilfe unserer cDNA-Microarray-Analyse gewonnen haben, ein physiologisches Korrelat hat. Es handelt sich um eine direkte Verknüpfung von Transkriptomanalyse und physiologischer Charakterisierung. Die Vielfalt der GFP-Linien ermöglicht es, die molekulare Ausstattung vieler Zellen des Nervensystems zu analysieren und anschließend physiologisch zu charakterisieren.

Oben genannte dirigierte Expression des GFP in definierten Zielgeweben gilt auch für die Expression beliebiger anderer Proteine wie zum Beispiel der ektopischen Expression des Synucleins in den dopaminergen Zellen von *Drosophila melanogaster*.

1.12 Zielsetzung der Arbeit

Mit Hilfe des GAL4/UAS-Systems und der cDNA-Microarray-Analyse sollen am Modellorganismus *Drosophila melanogaster* folgende Ziele bearbeitet und Fragen geklärt werden: Dopaminerge Zellen im Nervensystem von *Drosophila melanogaster* sollen mit Hilfe einer UAS-GFP-Effektorlinieline und der DDc-GAL4 Treiberlinie visualisiert werden. Gleichzeitig soll unter Einsatz der FACS-Analyse („*Fluorescece Activated Cell Sorting*“) geklärt werden, ob sich aus einer kleinen Anzahl von Zellen soviel mRNA isolieren lässt, um damit das Expressionsmuster der dopaminergen Zellen darstellen zu können.

Das mit der Parkinsonschen Erkrankung in Zusammenhang stehende Protein α -Synuclein soll mit Hilfe der UAS-Synuclein-Effektorlinie bzw. der UAS-A30P-Synuclein-Effektorlinie und der DDc/GAL4-Treiberlinie in den dopaminergen Zellen exprimiert werden. Die Expression soll immunhistochemisch und durch Verhaltensversuche nachgewiesen werden. Anschließend soll das Expressionsmuster durch Hybridisierungsexperimente auf dem *Canada-12k-Drosophila-Microarray* im Vergleich mit *Drosophila melanogaster* Wildtyp analysiert werden. Diese Analyse soll unter folgenden Fragestellungen durchgeführt werden:

1. Wie ändert sich das Expressionsmuster quantitativ und qualitativ. Welche Gene sind betroffen?

2. Ist die Änderung des Expressionsmusters mit der Degeneration der dopaminergen Zellen in Zusammenhang zu bringen?
3. Kommt es zum Beispiel zur Expression von Genen, welche im Zusammenhang mit Neuroprotektion oder apoptotischen Prozessen stehen?
4. Welche dynamischen Veränderungen des Genexpressionsmusters könnte die Expression des Synucleins bei *Drosophila melanogaster* auslösen.

2.0 Material und Methoden

2.1 Versuchsobjekt

Die Untersuchungen werden an adulten Tieren der Art *Drosophila melanogaster* durchgeführt. Es wurde nicht nach männlichen oder weiblichen Tieren unterschieden.

Drosophila melanogaster

Ordnung: *Diptera*

Gruppe: *Brachycera*

Unterordnung: *Cyclorrhapha*

Familie: *Schizophora*

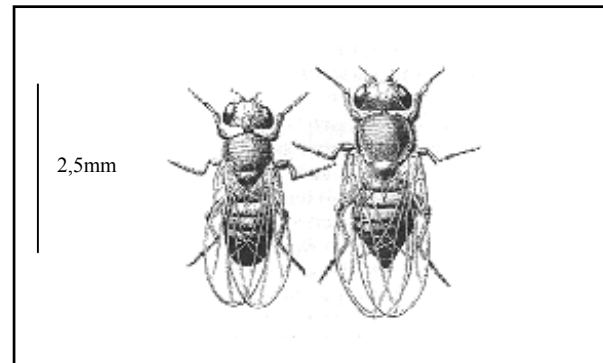


Abbildung 2.1 *Drosophila melanogaster*, Taufliege; links: ♀; rechts: ♂; ca. 2,5mm (Strickberger, 1962 aus Honomichl 1998)

Tabelle 2.1 Fliegenlinien die für die Untersuchung verwendet werden

Linien			
Linie	Nummer	Eigenschaft	Bezugsquelle
Canton S	1	Wildtyp	Bloomington Stock Center
Synuclein _{wt}	8146	Effektorlinie; exprimiert humanes Synuclein; idopathische Form; UAS-GAL4	Nancy Bonini; University of Pennsylvania, Philadelphia
Synuclein _{A30P}	8147	Effektorlinie; exprimiert humanes Synuclein; mutiert; UAS-GAL4	Nancy Bonini; University of Pennsylvania, Philadelphia
DDc	7009	Treiberlinie; exprimiert GAL4 Transkriptionsfaktor; unter Kontrolle von Dopamindcarboxylase-Promotor	Bloomington Stock Center
GFP-Cameleon	6966	Effektorlinie; exprimiert das Green-Fluorescence Protein unter Kontrolle der GAL4-Upstream-Activator-Sequenz	Bloomington Stock Center

2.2 Fliegenhaltung

Die Fliegen werden in Stopfengläsern (50mm x 100mm oder 35mm x 80mm), je nach benötigter Anzahl, gehalten. Die günstigste Aufzuchttemperatur liegt bei 25°C (Demerec, 1950). Die Luftfeuchtigkeit sollte bei mindestens 80% liegen. Zu diesem Zweck werden die Fliegengläser in fast geschlossenen Kunststoffbehältern gehalten, die 1cm hoch mit Wasser gefüllt sind. Um gegenseitige Kontamination mit Milben zu verhindern ist dem Wasser handelsübliches Spülmittel beigegeben, was die Oberflächenspannung herabsetzt.

Die Bestandteile des Aufzuchtmediums (Tabelle 2.2) werden in kochendem Wasser gelöst und ständig gerührt, bis die Masse gut homogenisiert ist. Die Propionsäure und das Nipagin (Methyl-4-Hydroxybenzoat) werden kurz vor dem Erkalten zugegeben. Die Gläser werden ca. 1- 1,5cm hoch ausgegossen und sofort mit Stopfen abgedeckt. Bis zur Verwendung werden

die Gläser bei 4°C aufbewahrt (Sullivan et al., 2000).

Bei einem Auftreten von Bakterienbefall, werden die Fliegen in Aufzuchtmedium mit Antibiotika umgesetzt (Tabelle 2.2). Die folgende Generation kann dann wieder in antibiotikafreies Medium umgesetzt werden. Das Umsetzen der Tiere erfolgt nach Betäubung mit gasförmigen Stickstoff.

Tabelle 2.2: Bestandteile des Aufzuchtmediums

Leitungswasser	1l
Agar	9g
Mehl	66,6g
Zucker	47g
Hefe	17g
Propionsäure	3,2ml
Methyl-4-Hydroxybenzoat in 10ml 50% EtOH	1gr
Bei Bedarf zusätzlich Antibiotika:	
Spectinomycin	10mg/ml 5ml
Ceftriaxone	50mg

2.3 Kreuzen der Treiber- und Effektorlinien

Für Kreuzungen werden jungfräuliche Weibchen der Treiber- oder Effektorlinie gebraucht. Dazu werden Puppen, die kurz vor dem Schlupf stehen, in 15ml Inkubationsröhrchen überführt (Tiere müssen schon als adult zu erkennen sein) und vereinzelt. Die Puparien dürfen nicht beschädigt werden. Nach dem Schlupf werden die Weibchen in ein Aufzuchtglas gesetzt und Männchen der jeweils anderen Linie dazugesetzt.

Nachdem sich die ersten Larven der F1-Generation verpuppt haben (10 Tage) wird die Parentalgeneration in ein neues Glas umgesetzt. So können aus einer Parentalgeneration durch mehrmaliges Umsetzen bis zu 45 Tage immer neue Filialgenerationen angelegt werden.

Wie im Kreuzungsschema dargestellt (Abbildung 2.2), werden durch das Kreuzen von Treiber- und Effektorlinie die beiden Hälften des GAL4/UAS-Systems (Biffo und Marcisio, 1999) zusammengebracht, so dass hier der gewünschte Effekt (in diesem Fall GFP bzw. α -Synuclein) unter der Kontrolle des Treibers (DDc-GAL4) in den dopaminergen Zellen des Nervensystems exprimiert wird. Die mutante Synuclein-Form A30P wird im folgenden Synuclein_{A30P} genannt, die „normale“ Form Synuclein_{wt}. Beide Formen werden zur Kreuzung eingesetzt.

Alle folgenden Untersuchungen werden im Zeitabstand von jeweils 10, 20, 30 usw. Tagen nach dem Schlupf der Tiere durchgeführt.

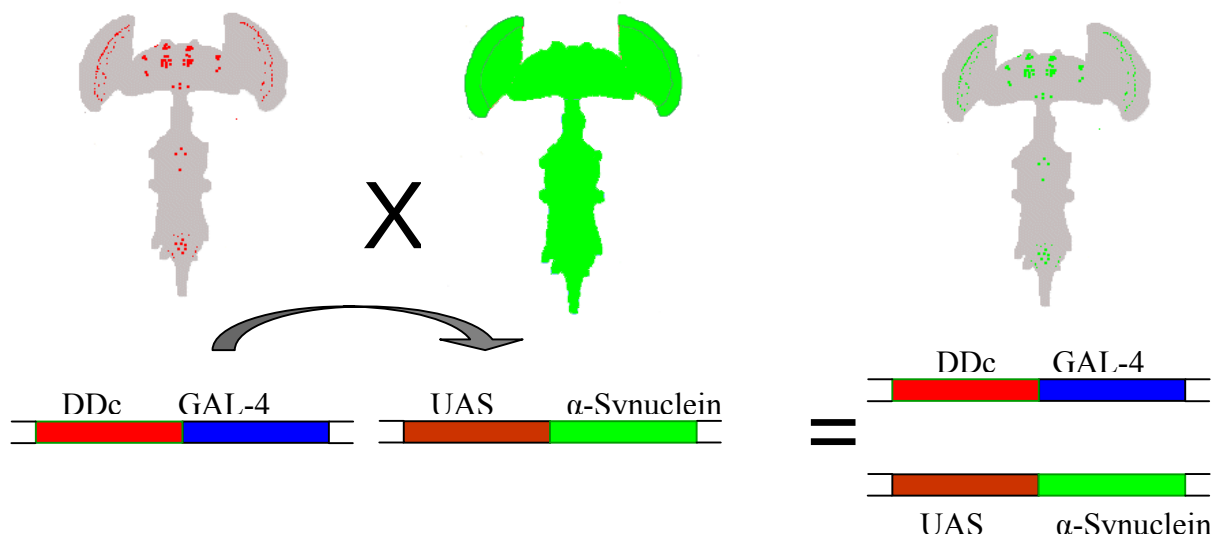


Abbildung 2.2 Kreuzungsschema der DDC-Treiberlinie mit der α -Synuclein Effektorlinie. In der Parentalgeneration (P) wird der GAL4 Transkriptionsfaktor in den dopaminergen Zellen der Treiberlinie exprimiert (rot; linke Seite). Der Effektor (α -Synuclein) ist im Genom integriert, wird aber nicht exprimiert (grün; Mitte). Nach der Kreuzung der beiden Linien wird der Effektor in der Filialgeneration (rechts) in den dopaminergen Zellen unter der Kontrolle des Treibers exprimiert (grüne Punkte; rechte Seite).

2.4 Verhaltensversuche

Mit Fliegen, die Synuclein in Neuronen bzw. Neuronensubpopulationen exprimieren werden Verhaltensversuche durchgeführt. Die Verhaltensänderungen werden durch 2 Testsysteme quantifiziert. Der erste Test, eingeführt von Feany und Bender(2000), dient zur Quantifizierung der Laufaktivität. Ein zweiter, selbst entwickelter Test dient zur Quantifizierung der Ruheaktivität. Beide Beobachtungen dienen dazu, diejenigen Fliegen zu identifizieren, die entsprechende phänotypische Veränderungen aufweisen. Das ist erforderlich, um identifizierte Unterschiede im Expressionsmuster mit den Verhaltensänderungen zu korrelieren.

Nach den Verhaltensversuchen werden die Tiere auf Aceton eingefroren und bis zur weiteren Verwendung aufbewahrt.(siehe 2.5.1).

- a) Zum Messen der Laufaktivität macht man sich zu Nutze, dass *Drosophila melanogaster* das Bestreben zeigt, in einem Glas immer nach oben, dem Licht entgegen zu laufen. Die Laufaktivität wird gemessen, indem ca. 20-30 Tiere betäubt und in eine 50x50x10mm große Glasküvette überführt werden, welches mit einem Kunststoffstreifen abgedeckt wird. Nach dem Abklingen der Betäubung (ca. 5min) werden die Tiere in der Küvette nach unten geklopft. Es wird gezählt wie viele der Tiere nach 20s bis an den oberen Rand der Küvette gelaufen sind. Dieser Versuch wird 5 mal wiederholt und durch Filmaufnahmen dokumentiert.
- b) Die Ruheaktivität wird jeweils für 60-120s beobachtet. Gezählt wird die Anzahl der Tiere,

die sich innerhalb des Beobachtungszeitraums von ihrem ursprünglichen Standort weg bewegen. Beide Verhaltensversuche werden jeweils im Abstand von 10 Tagen nach dem Schlupf der Tiere, sowohl mit dem Wildtyp (Kontrollgruppe), als auch mit der Synuclein_{wt} und der Synuclein_{A30P} Linie durchgeführt.

Da für die einzelnen Beobachtungstage nicht immer die gleiche Anzahl an Tieren eingesetzt wird, wird zunächst der Quotient ausgerechnet:

$$\text{Quotient} = \frac{\text{Anzahl Tiere oben}}{\text{Anzahl Tiere gesamt}}$$

bzw.

$$\text{Quotient} = \frac{\text{Anzahl Tiere in Bewegung}}{\text{Gesamtzahl Tiere}}$$

Für die Laufaktivitätsuntersuchung wird die Standardabweichung s errechnet

$$s = \sqrt{\frac{\sum (x_i - \bar{x})^2}{n-1}}$$

Mit: n = Anzahl der Beobachtungen

Zur Prüfung, ob die Laufaktivität der Linien Synuclein_{wt} und Synuclein_{A30P} signifikant unterschiedlich zur Kontrollgruppe sind, wird der F-Test (nicht-verbundene Stichproben, parameterfreie Varianzanalyse) nach Tukey eingesetzt.

$$D_k = \sqrt{\frac{\text{MAQinn}}{n}} \times q_{k/v}$$

MAQinn: Mittleres Abweichungsquadrat

q: Tabelle der Spannweiten

k: Anzahl der Stichproben, v: Freiheitsgrade

n: Stichprobenumfang

Quelle: Lozan, 2004

Als Nullhypothese wird hier $p < 0,05$ angenommen. Alle gezählten und errechneten Werte werden tabellarisch und z.T. graphisch dargestellt. Der F-Test wird mit Hilfe des Computerprogramms SigmaStat 2.0 für Windows durchgeführt.

2.5 Präparation der Gewebe

2.5.1 Einfrieren nach Fujita

Zu 70 ml Aceton werden 6 g Na₂SO₄-Anhydrit gegeben (Erlenmeyerkolben) und in flüssigem Stickstoff gekühlt, bis das Aceton zu 50% gefroren ist. Dann werden die Tiere betäubt und dazugegeben (Fujita, 1987). Die Erlenmeyer-Kolben werden mit Parafilm abgedeckt (**Explosionsgefahr !**) und 10 bis 14 Tage bei -25°C gelagert bis die Tiere getrocknet sind (Fujita et al., 1987). Dann werden die Tiere einzeln entnommen (Erlenmeyer-Kolben auf Eis) und das Gehirn herauspräpariert. Die präparierten Gehirne werden bis zur mRNA-Isolierung im Kühlschrank aufbewahrt.

Mit dieser Methode kann die mRNA bis zu einem Jahr konserviert werden.

2.5.2 *Fluorescence Activated Cell Sorting (FACS)*

Die entsprechenden Gewebe (frisch entnommene Gehirne) werden in L15-Zellkulturmedium präpariert und in ein 1,5ml Reaktionsgefäß mit L15-Medium überführt. Nach Beendigung der Präparation werden die Gewebe ca. 5min bei 3000-4000U/min zentrifugiert und das Medium abgenommen. Die Dissoziation wird mit Hilfe eines Enzym-Mixes aus 1mg Collagenase/Dispase pro 1ml L15-Medium (Bicker et al., 1988) durchgeführt. Die Inkubation erfolgt für 45-60min bei Raumtemperatur, wobei alle 15min aufgeschüttelt wird. Danach werden die Präparationen für 5min bei 3000-4000U/min zentrifugiert, das Medium abgenommen und dreimal mit 200µl L15-Medium gewaschen. Das Präzipitat wird in einem kleinen Volumen L15-Medium aufgenommen (10-15µl) und mit einer 10 µl Pipette vorsichtig trituiert bis die Lösung milchig ist und keine Zellklumpen mehr zu erkennen sind. Nach dem Aufnehmen in 100µl L15-Medium, müssen die Zellen vereinzelt sein. Die dissoziierten Zellen werden auf Eis gelagert. Die Zellsortierung wird mit dem BD *FACSCalibur* System von Becton Dickinson durchgeführt.

Um die Zellen sortieren zu können werden sie zunächst vom *Cell-Sorting System* in einzelne Tropfen verpackt, diese elektrisch geladen und einer Fluoreszenzmessung unterzogen. Die fluoreszierenden Zellen werden in einem Durchfluss durch ein elektrisches Feld so abgelenkt, dass sie in einem gesonderten Auffangbehälter landen (Durchflusszytometrie, FACS). Die Fraktion mit den fluoreszierenden Zellen wird auf Eis gelagert und zur Isolierung der mRNA lysiert.

2.6 Elektronenmikroskopische Aufnahmen

Bei einigen der gefriergetrockneten Tiere wird das Gehirn präpariert über Nacht getrocknet und für die Aufnahmen im Elektronenmikroskop mit Gold bedampft. Die Aufnahmen wurden mit dem Rasterelektronenmikroskop REM LEO 1525V angefertigt.

2.7 Fällern und Reinigen von Nucleinsäuren

Bei vielen der folgenden Schritte werden die beteiligten Nucleinsäuren gefällt und gereinigt. Daher wird dieser Arbeitsschritt allgemein beschrieben. Das Fällern und Reinigen der Nucleinsäuren wird mit 1 Volumen Isopropanol, 1/10 Volumen NaAcetat und 1/100 Volumen Glycogen durchgeführt. Nach dem Vortexen wird der Ansatz 20min bei -25° im Tiefkühlschrank gelagert, dann 20min bei 13000U/min (Biofuge 13, Heraeus) zentrifugiert und zweimal mit 70% EtOH gewaschen (Mühlhardt, 2001). Alle weiteren molekularbiologischen Methoden werden, sofern nicht gesondert aufgeführt, nach den

Anweisungen des Handbuchs: *Molecular Cloning* von Sambrook et al. (1989) durchgeführt.

2.8 Reverse Transkription (RT)

Die mRNA wird mit dem RNA-Isolierungskit der Firma Eppendorf durchgeführt. Im Anschluß an die RNA-Isolierung erfolgt sofort die cDNA-Synthese durch reverse Transkription (Protokoll der Firma Invitrogen). Ziel der reversen Transkription ist es, die mRNA durch das Umschreiben in eine einzelsträngige cDNA in eine stabile Form zu bringen und mit einem definierten 5'-und 3'-Ende zu versehen (5'-RACE; Schramm, 2000). Dieses Vorgehen ermöglicht die spätere Amplifikation, cRNA- und ccDNA-Synthese. Die RNA wird in dH₂O aufgenommen, und mit einem *OligodT-Primer* (*Primer1*), der zusätzlich eine spezifische Sequenz enthält (in diesem Fall die „Erkennungssequenz“ für die T7-RNA-Polymerase) und dNTPs bei 65°C für 5min inkubiert (Denaturierungsschritt). Der Ansatz wird auf Eis gestellt und der cDNA-Synthesepuffer, DTT und RNase-Inhibitor kommen hinzu. Danach inkubiert der Ansatz bei 42°C für 2min (Anlagerungsschritt). Nach Zugabe der Reversen Transkriptase wird der Ansatz bei 42°C für 1h inkubiert (cDNA-Syntheseschritt).

Nach dem ersten Teil der cDNA-Synthese hat der Erststrang ein definiertes 5'-Ende. Nun wird in Abwandlung des üblichen Protokolls ein zweiter *Primer* (*Primer2*) hinzugegeben, welcher sich an den, von der reversen Transkriptase synthetisierten, *Oligo-dC*-Überhang anlagert. Dieser *Primer* trägt an seinem 5'-Ende eine *Oligo-dG* Sequenz und an seinem 3'-Ende eine spezifische Sequenz (die „Erkennungssequenz“ für die SP6-RNA-Polymerase), um welche der cDNA-Erststrang verlängert wird. Dazu werden der *Primer* und die reverse Transkriptase zum Ansatz gegeben und nochmals bei 42°C für 1h inkubiert. Die Reaktion wird durch Inkubation bei 70°C für 15min beendet (Tabelle 2.3).

Tabelle 2.3 Reaktionsansatz für reverse Transkription

<i>Oligo-dT</i> (500µg/ml) <i>Primer1</i>	1µl
total RNA/mRNA	1ng – 5µg/1-500ng
10mM dNTP	1µl
mit aqua dest. auf 12µl auffüllen 5 min bei 65°C erhitzten und dann schnell auf Eis	
<i>First-Strand</i> -Puffer	4µl
0,1M DTT	2µl
RNaseOUT™ (40 unit/µl)	1µl
Vortexen; 2min bei 42°C inkubieren	
<i>SuperScript</i> TM RT	1µl
Vortexen; 1h bei 42°C inkubieren (Heizpilz)	
<i>Primer 2</i>	1µl
<i>SuperScript</i> TM RT	1µl
Vortexen; 1h bei 42°C inkubieren (Heizpilz)	
Inaktivieren durch 15min erhitzen bei 70°C	

RT-Primer

Für die reverse Transkription werden folgende *Primer* eingesetzt: *Primer 1* hat ein biotinyliertes 5'-Ende und die T7-RNA-Polymerase Erkennungssequenz (hervorgehoben). *Primer 2* hat die SP6-RNA-Polymerase Erkennungssequenz.

Primer1 (Biotin-Oligo dT'T7I):

Biot-5'-GAG AGA GGA TCC AAG TAC **TAA TAC GAC TCA CTA TAG** GGA GA -
(T)₂₅A/C/G-3

Primer 2 (SP6rG1):

5'-CAG CGG CCG CAG **ATT TAG GTG ACA CTA TAG A**-(G)₂₅

2.9 PCR

Die PCR (*Polymerase-Chain-Reaction*) wird nach dem Standardprotokoll (Maniatis, 1989) durchgeführt. Dem gemäß findet die Denaturierung der DNA bei 94°C statt, die Anlagerung der Primer zwischen 52°C und 58°C und die Synthese des DNA-Doppelstranges bei 72°C (Tabelle 2.4). Zunächst wird eine PCR mit verschiedenen Anlagerungstemperaturen der *Primer* im *Robo-Cycler Gradient* durchgeführt, um die optimale Anlagerungstemperatur zu ermitteln. Dann wird eine PCR mit verschiedenen Zyklenzahlen durchgeführt, damit die optimale Zyklenzahl gefunden wird. Die optimale Zyklenzahl ist hier die Anzahl der Zyklen, bei der die PCR nicht in den linearen Bereich kommt. Eine Verschiebung des Verhältnisses von niedrig-transkribierten zu hoch-transkribierten Transkripten und kurzen zu langen Transkripten wird hierdurch begrenzt. Wenn die optimale Anlagerungstemperatur der *Primer* und die richtige Zyklenzahl ermittelt sind, wird eine PCR mit 5,5 min Schreibzeit durchgeführt und die vorhandene Menge Erststrang-cDNA amplifiziert.

Tabelle 2.4 PCR-Ansatz und Temperaturprofil

PCR-Puffer + MgCl ₂	5µl
<i>Primer 1</i> (T7II-PCR ; 10mM)	1µl
<i>Primer 2</i> (SP6-PCR; 10mM)	1µl
dNTP (10mM)	1µl
Template DNA ; Erststrang-cDNA aus der RT	2µl
Taq-DNA-Polymerase (5U/µl)	0,4µl
ad 50µl dH ₂ O	
<u>Zyklen- und Temperaturprofil:</u>	
Denaturieren:	94°C für 30s
Anlagerung <i>Primer</i> :	56°C für 30s
Synthese:	72°C für bis zu 4,5min
Maximale Zyklenzahl: 30	

PCR-Primer

Für die PCR wurden folgende *Primer* eingesetzt:

Primer 1: (OdT-T7 II)

-5'-GAG AGA GGA TCC AAG TAC TAA TAC GAC TCA CTA TAG G-3

Primer 2: (SP6rG2)

5'CAG CGG CCG CAG ATT TAG GTG ACA CTA TAG ArGrG rGA/C/T

Die PCR-Produkte werden mit dem PCR-Purification-Kit von Genomed gereinigt, gefällt (Siehe 2.7) und bei -25°C im Eisschrank gelagert.

2.10 Gelelektrophorese

Zur Kontrolle der PCR wird eine Gelelektrophorese in einem 1%igen Agarosegel durchgeführt. 1g Agarose (*SeaKem®* LE Agarose) wird in 100ml TBE-Puffer aufgekocht (Tabelle 2.5). Zur Detektion der DNA wird nach dem Abkühlen 1µl Ethidiumbromid hinzugefügt (Tabelle 2.5). Das Gel wird mit TBE überschichtet und die DNA wird mit Ladepuffer gemischt in die Taschen eingebracht. Als Standard dient der 1kb *GeneRuler®* (Fermentas) oder der λ / EcoRI + HindIII-Verdau. Die Elektrophorese wird bei 90mV durchgeführt. Zur Kontrolle wird ein Gelfoto im Transilluminator angefertigt.

Tabelle 2.5 10x TBE-Puffer

Tris	154,5g
dH ₂ O	810ml
Borsäure	26,2g
Titriplex III (EDTA)	9g

2.11 Synthese der cRNA

Die Synthese der cRNA wird nach dem Protokoll der Firma Ambion durchgeführt. Zunächst werden die PCR-Produkte mit dem PCR-Purification-Kit (JETquick Spin Column Technique) von Genomed gereinigt. Je 100µl PCR-Reaktion werden mit 400µl Puffer H1 gemischt, gevortext und auf die Säulen gegeben. Nach dem Zentrifugieren (13000U/min; 1min) wird mit 500µl Puffer H2 gewaschen (Zentrifugieren 13000U/min; 1min) und nachzentrifugiert. Die cDNA wird mit 50µl H₂O eluiert (13000U/min; 2min). Die gereinigte cDNA wird auf 100µl Volumen aufgefüllt und mit Isopropanol, Na-Acetat und Glycogen gefällt (siehe 2.7). Nach dem Fällern werden die PCR-Produkte in 8µl H₂O aufgenommen und mit NTPs, Reaktionspuffer und SP6-Polymerase gemischt. Der Ansatz wird über Nacht bei 37°C inkubiert (Tabelle 2.6). Der Reaktionsansatz wird mit H₂O auf 100µl aufgefüllt und gefällt.

Tabelle 2.6 cRNA-Synthese

ATP (50mM)	2µl
CTP (50mM)	2µl
GTP (50mM)	2µl
UTP (50mM)	2µl
10x Reaktionspuffer	2µl
Template DNA	1µg
Enzym Mix	2µl
auf 20µl Totalvolumen auffüllen; vortexen; über Nacht bei 37°C inkubieren	
5M NaOH	2µl
Vortexen; 10min bei 65°C erhitzen	
1,2µl 5M Essigsäure zum Neutralisieren	

2.12 Überprüfung der cRNA-Synthese

Die Kontrolle der cRNA-Synthese findet mittels Photometrie und eines RNA-Gels (nach Maniatis, 1987) statt. Die Agarose wird in 357ml dH₂O aufgekocht. Beim Abkühlen wird MOPS-Puffer und Formaldehyd hinzugegeben und das Gel gegossen (Tabellen 2.7 und 2.8).

Tabelle 2.7 RNA-Gel

Agarose	4g
dH ₂ O	357ml
Formaldehyd	23ml
20x MOPS-Puffer:	20ml

Tabelle 2.8 20xMOPS-Puffer

20x MOPS-Puffer	
400mM MOPS	83,6g
100mM NaAcetat	13,6g
20mM EDTA	7,4g
ad 1l dH ₂ O einstellen auf pH 7,0	

Die cRNA wird im Verhältnis 1:2 mit Ladepuffer (Tabelle 2.9) gemischt, gevortext und bei 68° 10min denaturiert. Vortexen und Denaturierung werden zweimal wiederholt und der Ansatz 2min auf Eis gestellt. Dann wird das Gel beladen. Als Standard dient die RNA-Ladder *High Range* (Fermentas).

Tabelle 2.9 Ladepuffer

Formamid	2,88ml
20x MOPS	0,32ml
Formaldehyd	1,0ml
dH ₂ O	0,72ml
Glycerol	0,72ml
BPB	0,02%
Xylen Cyanol	0,02%

Die Elektrophorese wird bei 90mV durchgeführt. Zur Kontrolle wird ein Gelfoto im Transilluminator angefertigt. Falls ein *Southern-Blot* durchgeführt werden soll wird ein Maßstab angelegt und mitfotografiert, um die Rf-Werte ermitteln zu können.

2.13 Die ccDNA-Synthese

Abweichend von der oben beschriebenen reverser Transkription nach der Isolierung der mRNA aus den präparierten Geweben findet eine zweite reverse Transkription nach der Amplifikation der Erststrang-cDNA, der PCR und der cRNA-Synthese statt. Die entstehende cDNA wird abweichend ccDNA genannt, um sie von der ersten cDNA unterscheiden zu können. Bei dieser ccDNA-Synthese werden Amino-allyl-modifizierte ccDNA-Einzelstränge synthetisiert. An die Amino-allyl-modifizierte ccDNA werden in einem späteren Arbeitsschritt Farbstoffmoleküle gekoppelt und die Hybridisierungen durchgeführt.

Die Modifikation dieser reversen Transkription besteht darin, dass der hinzugegebene dNTP-Mix einen Anteil Amino-allyl-modifizierter (aa)dUTP enthält, welche bei der Synthese mit eingebaut werden. 1µl 10mM dNTP+amino-allyl-dUTP mix (dATP, dCTP, dGTP + dTTP^{1/2} + aadUTP^{1/2}). Nach der reversen Transkription findet eine alkalische Hydrolyse der RNA statt, um Reste der cRNA zu entfernen (Tabelle 2.10).

Tabelle 2.10 Reaktionsansatz alkalischen Hydrolyse

0,5M EDTA, pH 8,0	0,25µl
Vortexen	
5M NaOH	2µl
Vortexen; 10min bei 65°C erhitzen	
1,2µl 5M Essigsäure zum Neutralisieren	

2.14 (*Southern-Blot*): Kontrolle der ccDNA-Synthese

Zur Kontrolle der ccDNA-Synthese wird ein *Southern-Blot* durchgeführt. Zunächst wird die ccDNA elektrophoretisch aufgetrennt (siehe 2.10) und dann auf eine Nylonmembran (Hybond N) transferiert („geblottet“). Anschließend findet eine Färbereaktion statt, um die ccDNA nachzuweisen.

Vor dem *Blotten* wird ein 10cm hoher Stapel aus Zellstoff zurechtgeschnitten. Darauf wird ein Filterpapier und die Nylonmembran gelegt. Hierauf kommt das Gel und ein weiteres Filterpapier, das mit 10x SSC (Tabelle 2.11) getränkt ist. Oben auf den Stapel werden mit 10x SSC getränkte Schwämme gelegt. Wichtig ist, dass der Zellstoffstapel, das Filterpapier und die Nylonmembran immer genau das Format des Gels haben müssen. Wenn der Stapel so

aufgeschichtet ist, wird die DNA durch die Saugkraft des unten liegenden Zellstoffs mit Hilfe des SSC aus dem Gel auf die Nylonmembran transferiert.

Tabelle 2.11 20x SSC

20x SSC	
NaCl	175,3g
Natriumcitrat	88,2g
dH ₂ O	800ml
Mit 10N NaOH auf pH7 einstellen; auf 1L auffüllen; autoklavieren.	

Nach dem *Blotting* wird die DNA durch Bestrahlung mit UV-Licht (120mJ) auf der Membran fixiert (*cross-linking*) und getrocknet.

Der Nachweis durch eine Färbereaktion findet mit Hilfe der Antikörper-gekoppelten Alkalischen-Phosphatase gegen das Biotin (biotinylierte *Primer* bei der ccDNA-Synthese) statt. Zunächst wird die Membran geblockt, um eine unspezifische Anlagerung der Alkalischen-Phosphatase an die Membran zu verhindern. Dazu wird die Nylonmembran für eine Stunde mit der Blockierungslösung (Tabelle 2.12) bei Raumtemperatur inkubiert.

Tabelle 2.12 Blockierungslösung

Maleinsäure	23,31g
NaCl	17,53g
NaOH-Pellets	16g
dH ₂ O	2l
Auf pH 7,5 einstellen	
0,1% Triton-X-100	
0,5% I-Block	

Dann folgt eine Inkubation mit Maleinsäurepuffer und dem Antikörper-Alkalische-Phosphatase-Konjugat für 30min bei 37°C. Anschließend wird die Membran dreimal 15min mit 1xPBS (Tabelle 2.13) bei Raumtemperatur gewaschen und für 60s in den Reaktionspuffer (Tabelle 2.14) getaucht.

Tabelle 2.13 1xPBS

1xPBS	
NaCl	80g
KCl	2g
Na ₂ HPO ₄	14,4
KH ₂ PO ₄	2,4g
dH ₂ O	1l
Auf pH 7,4 einstellen	
0,1% Triton X-100	

Zu 10ml Reaktionspuffer (+0,1% TritonX) werden 45µl Nitroblau-Tetrazoliumsals (NBT) und 35µl BCIP gegeben und 5ml dieser Lösung werden zu der Membran in ein 15ml Reaktionsröhrchen gegeben und bei Raumtemperatur die Inkubation so lange fortgeführt, bis die gewünschte Intensität erreicht ist und die RNA als blauer „Schmier“ auf der Membran erscheint. Nach Beendigung der Reaktion, wird die Membran kurz in H₂O gewaschen und getrocknet.

Tabelle 2.14 Reaktionspuffer

Tris/HCl	12,1g
NaCl	5,8g
MgCl ₂	10,15g
Mit dH ₂ O auf 1L auffüllen; pH 9,5; steril filtrieren	

2.15 GFP-Expression dopaminerger Zellen: Präparation und Aufnahmen

Versuchstiere, welche GFP in dopaminergen Zellen exprimieren, müssen für die Aufnahmen mit dem konfokalen Laserscanning-Mikroskop präpariert werden. Die Präparation des Gehirns bzw. zentralen Verbundganglions wird in L15 Zellkulturmedium durchgeführt. Tiere werden auf Eis gelegt und in einer kleinen Petrischale mit L15 Zellkulturmedium werden das Nervensystem (bei L3/L2 Larven) oder das Gehirn und das zentrale Verbundganglion (bei Adulten) herauspräpariert. Larven im L1 und L2 Stadium können ohne vorherige Präparation gescannt werden. Die L3 Larven werden präpariert indem mit einer Pinzette (*Dumont No. 5*) das hintere Drittel der Larve gefasst wird und mit einer weiteren Pinzette an den Mandibularhaken das Tier auseinandergezogen wird. Dabei quellen die inneren Organe und das zentrale Nervensystem heraus.

Die adulten Tiere werden decapitiert und dann wird mit zwei Pinzetten die Kopfkapsel eröffnet. Die herauspräparierten Teile des Nervensystems werden auf Objekträger in einen Tropfen L15 Zellkulturmedium überführt, mit einem Deckglas abgedeckt und mit Nagellack abgedichtet. Damit die Objekte nicht beschädigt werden, werden am Rand der Objektträger zerbrochene Deckgläser als Abstandshalter aufgelegt.

Die präparierten Teile des Nervensystems können nun unter Fluoreszenzlicht mikroskopiert (Mikroskop Leica DM IRBE) und mit dem Konfokal-System Leica TCS-NT (*Transmission Confocal Scanning*) gescannt werden. Es wird mit 200 bis 400facher (Ölimmersion) Vergrößerung mikroskopiert. Die Aufnahmen mit dem Konfokal-System werden bei 100-bis 200facher Vergrößerung gemacht um möglichst eine „Wholemount“-Ansicht herzustellen.

Zunächst wird das GFP bei 480nm im blauen Bereich angeregt und unter Durchlichtbedingungen überprüft, ob eine Fluoreszenz vorhanden ist. Wenn das Präparat nach Lage und Fluoreszenz geeignet ist, wird eine Aufnahme mit dem Konfokal-System gemacht. Das Konfokal-System arbeitet mit einem Argon-Krypton Laser, der eine Anregung

bei 488nm, 568nm oder 647 nm Wellenlänge hat, und wird mit dem Programm TCS-User über den angeschlossenen Rechner bedient. Die Anregung für die konfokalen Aufnahmen wird bei 488nm gewählt. Dann wird der Vergrößerungsaktor (z.B. 100fach) und die Laserintensität auf einen mittleren Wert eingestellt. Nach dem Start des *Scans* muss noch die Empfindlichkeit des *Photomultipliers* und die Blendenweite so verändert werden, dass die leuchtenden Neuronen scharf abgebildet werden, keine Sättigung eintritt und möglichst wenig Hintergrund zu sehen ist. Dann wird der Scanbereich in z-Richtung (z.B. 100µm) und die Anzahl der Ebenen, durch die gescannt werden soll, festgelegt.

Der eingeleseene Stapel kann mit dem zugehörigen Programm nachbearbeitet werden, z.B. Übereinanderlegen der einzelnen Bilder zur Gesamtrekonstruktion der Aufnahme oder zur 3D-Rekonstruktion der Lage der Neurone.

2.16 Immunhistochemie

Der Nachweis der Synuclein-Expression in den Zielgeweben erfolgt mit Hilfe spezifischer Antikörper.

Köpfe und Thorax von *Drosophila*-Wildtyp Fliegen und Tieren, die Synuclein_{wt} exprimieren, werden in verschiedenen Altersstufen in TISSUE-TEK[®] O.C.T. Compound eingebettet, in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80° C aufbewahrt. Beim Einbetten werden die Tiere so ausgerichtet, dass sie von dorsal geschnitten werden können. Zum Schneiden werden die eingebetteten Köpfe und Thorax auf -25°C aufgewärmt und im *Kryotom* geschnitten. Es werden 12µm Schnitte angefertigt und auf Objektträger aufgebracht. Die Schnitte können bei -80°C gelagert werden.

2.16.1 Antikörpernachweis

Der Nachweis erfolgt in einem gekoppelten Antikörpernachweis mit zwei Antikörpern, wobei der erste Antikörper (rabbit polyclonal α -Synuclein Antikörper (C-20)-R: sc-7011-R von Santa Cruz Biotechnology) auf dem Epitop des gesuchten Antigens aufsetzt und der zweite, Alkalischen-Phosphatase (AP) gekoppelte Antikörper (donkey anti-rabbit IgG AP: sc-2083, von Santa Cruz Biotechnology) der auf dem Epitop des ersten Antikörpers aufsetzt.

Die von der alkalischen Phosphatase katalysierte Umsetzung von 5-Brom-4-Chlor-3-Indolylphosphat (BCIP oder X-Phosphat) und NBT sorgt für eine Färbung der Synucleinvorkommen. Hierbei wird BCIP durch die enzymatische Abspaltung der Phosphatgruppe in das entsprechende Indoxyl überführt, das zu einem Keton tautomerisiert. Unter den Detektionsbedingungen dimerisiert das Keton zu blauem Indigo, wobei H^+ freigesetzt wird. Dieses reduziert schließlich das zur Farbverstärkung eingesetzte NBT zum

purpurnen Diформazan. Beide Farbstoffe fallen dabei in unmittelbarer Nähe der AP-Moleküle aus und färben die Umgebung der markierten DNA-Sonde dunkelviolett an (<http://www.biomedpage.de/prot6.html>).

2.16.2 Färbereaktion

Zunächst werden die Schnitte auf den Objektträgern mit 10% Paraformaldehyd 10min vorfixiert (Tabelle 2.15). Dadurch halten die Schnitte besser auf den Objektträgern.

Tabelle 2.15 Paraformaldehyd

Paraformaldehyd	2g
dH ₂ O	22ml
10min im Wasserbad bei 60°	
1N NaOH Zutropfen bis Lsg. klärt; mit dH ₂ O auf 25ml auffüllen	
0,2mol PBS	25ml
pH auf 7,2-7,4 einstellen; filtrieren; nur 1 Tag haltbar!	

Nach dem Vorfixieren erfolgt ein dreimaliges kurzes Waschen mit Blockpuffer und eine Inkubation mit Blockpuffer (1x Maleinsäurepuffer + 0,5% I-Block + 0,1% TritonX) für 1 Stunde. Danach werden die Schnitte mit dem primären Antikörper (Anti-Synuclein) für eine Stunde (oder über Nacht) inkubiert. Die Antikörper werden dazu im Verhältnis 1:500 mit der Blockierungslösung gemischt und jeweils 100µl auf die Objektträger aufgetragen. Sie werden mit Deckgläsern abgedeckt und in einer feuchten Glaskammer gelagert.

Nach der Inkubation mit dem primären Antikörper werden die Schnitte dreimal 15min mit PBS + 0,1% TritonX gewaschen. Weiter erfolgt eine Inkubation mit Blockierungslösung (siehe oben) für eine Stunde und die Inkubation mit dem sekundären Antikörper. Der sekundäre Antikörper wird im Verhältnis 1:5000 mit Blockpuffer verdünnt, jeweils 100µl auf jeden Objektträger aufgetragen und für eine Stunde inkubiert. Es folgt ein weiterer Waschschritt mit PBS+ 0,1%TritonX. für dreimal 15min.

Vor der Nachweisreaktion werden die Schnitte für 60s in Reaktionspuffer (siehe 2.14) getaucht und dann mit NBT und BCIP die Färbereaktion gestartet. Zu 10ml Reaktionspuffer (+0,1% TritonX) werden 45µl NBT und 35µl BCIP gegeben und 100µl dieser Lösung werden auf die Objektträger gegeben und die Inkubation so lange fortgeführt, bis die gewünschte Intensität erreicht ist. Die Färbereaktion wird unter Deckgläsern durchgeführt.

Nach Abschluss der Färbereaktion werden die Objektträger 15s in 1x PBS + 0,1% TritonX getaucht und mit AQUATEX® eingedeckelt.

2.17 Die Fluoreszenzfarbstoffe

Alle im folgenden aufgeführten Methoden zur Arbeit mit cDNA-Microarrays, werden nach

den Anweisungen des Buchs: Der Experimentator *Microarrays* von Müller und Röder (2004) durchgeführt. Zum markieren der der Amino-allyl-modifizierten ccDNA (Abschnitt 2.13) werden zwei Fluoreszenzfarbstoffe der Firmen Molecular Probes (*Alexa Dye®*) oder Amersham (Cy-Farbstoffe) verwendet. *Alexa Dye®* 555/Cy3 haben ihr Absorptionsmaximum bei einer Wellenlänge von 555nm und ihr Emissionsmaximum bei 565nm. *Alexa Dye®* 647/Cy5 haben ihr Absorptionsmaximum bei einer Wellenlänge von 650nm und Emissionsmaximum bei einer Wellenlänge von 665nm.

2.18 Kopplung der Farbstoffe

An die Amino-allyl-modifizierte ccDNA werden zur Markierung fluoreszierende Farbstoffmoleküle gekoppelt (Abbildung 2.3). Alle nachfolgenden Arbeiten finden bei möglichst wenig Lichtexposition statt (abgedunkelte Räume, lichtgeschützte Gefäße, schwache Beleuchtung), um die lichtempfindlichen Farbstoffe nicht vorzeitig auszubleichen.

Das nach der ccDNA-Synthese gefällte Präzipitat wird in 5µl H₂O aufgenommen und durch pipettieren gelöst. Dazu kommen in 2µl Dimethylsulfoxid gelöste Fluoreszenzfarbstoffe und 3µl Natrium-Bicarbonat. Der Ansatz wird für 3-4h bei Raumtemperatur inkubiert.

Die Bindung findet über die Amino-Allyl (NH₂-) modifizierten Zuckerreste der aa-dUTP und eine Carbonsäuregruppe der Farbstoffe unter Ausbildung einer Aminoesterbindung statt. Die Bindung ist kovalent. Das Markieren der ccDNA wird mit dem *CyScribe Post-Labeling Kit* von Amersham durchgeführt.

Nach dem Koppeln der Farbstoffe wird die farbstoffmarkierte ccDNA gereinigt. Der Ansatz wird mit H₂O auf 100µl aufgefüllt und mit dem *ccDNA Purification Kit* von Genomed gereinigt, d.h. von den nicht inkubierten Farbstoffmolekülen und der Reaktionslösung getrennt. Die gereinigte ccDNA wird gefällt (siehe 2.7). Das Präzipitat wird zur Hybridisierung eingesetzt.

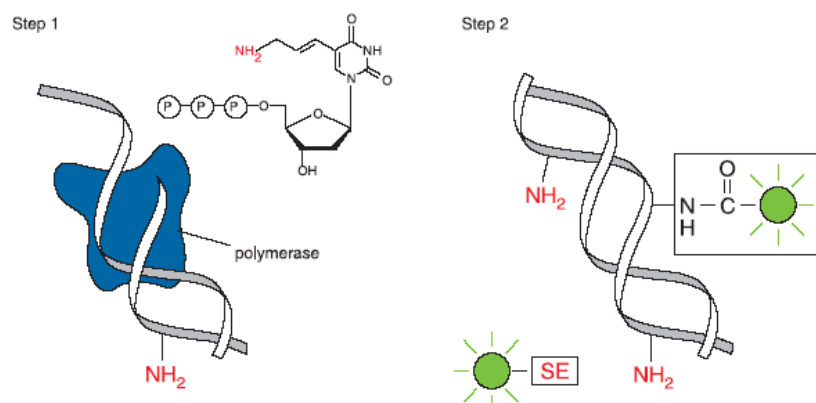


Abbildung 2.3 Einbau der Aminoallyl-dNTP während der ccDNA-Synthese (links) und markieren der ccDNA mit Fluoreszenzfarbstoffen (rechts). Quelle: www.probes.com/handbook/figures/0645.html

2.19 Die cDNA-Microarrays

Die in dieser Arbeit verwendeten cDNA-Microarrays sind silanisierte Objektträger (76x26mm), auf die mit einem sogenannten *Spotter* die Klone der verwendeten cDNA-Bibliotheken aufgetragen (gespottet) sind. Nach dem Auftragen wird die cDNA durch kurzzeitiges Bestrahlen mit UV-Licht an die Oberfläche der Objektträger gebunden (*cross-linking*). Die Bindung findet über die Phosphat-Zucker-Reste der cDNA an die NH₂-Reste der oberflächenbehandelten Objektträger statt.

Durch weitere Arbeitsschritte wird die Oberfläche der Objektträger, welche nicht mit cDNA belegt ist, mit Amino-Block-Lösung geblockt, um eine Bindung mit der Sonde zu verhindern. Zudem wird die aufgetragene cDNA durch Erhitzen auf 100° C (1min) einzelsträngig gemacht und ist dann fertig zur Hybridisierung. Die cDNA-Microarrays werden in diesem Zustand vom Hersteller geliefert. Der in dieser Arbeit verwendete *Canada-12k-Drosophila-Microarray* wurde freundlicherweise von Prof. Dr. Ian Meinertzhagen aus Halifax, Kanada zur Verfügung gestellt.

Die cDNA wird in einer Anordnung (*Array*) auf die Objektträger aufgetragen, die im Fall der *Canada-12k-Drosophila-Microarrays* (12000 Clone) aus 48 Unterarrays (*Sub-Arrays*) besteht, die wiederum aus 24 x 24 Reihen und Spalten bestehen.

Die Anordnung der Klone wird nach dem Auftragen in einer sogenannten „GAL-Datei“ (*GenePix Array List*) festgehalten. Die „GAL-Datei“ enthält also die Information über die räumliche Anordnung der Klone mit Nummerierung, die Position im Gitter, dem Namen der Klone (CG-Nummer [*Curated Gene Number*]) und dem Namen der Genbibliothek aus dem der Klon stammt, aber auch Informationen über das zugehörige Protein, Lage auf dem Chromosom usw.. Ein Beispiel für CG17759 ist in Tabelle 2.16 dargestellt.

Tabelle 2.16 Beispiel für die Notation der Lokalisation der Gene mit Namen, Identifikationsnummer (ID) und Namen des Proteins im „GAL-file“. Block, Column und Row: Information über Block, Spalte und Reihe in der der Klon liegt.

"Block"	"Column"	"Row"	"Name"	"ID"	Gene Name
1	1	1	CG17759	GM01501	G-Protein alpha 49b

Aus der „GAL-Datei“ erzeugt die Auswertungssoftware dann das Gitter, welches über das auszuwertende *Array* gelegt wird. Die Arrayarchitektur kann grundsätzlich verschieden sein. So werden bei dem selbst entworfenen „*Self-made*-Signaltransduktionschip“ (Schramm, 2004) die aufgetragenen Klone in der Art angeordnet, dass Klone, die eine bestimmte Gruppe von Proteinen repräsentieren (z.B. spannungsgesteuerte Kanäle, Katecholaminrezeptoren)

nebeneinander bzw. in einer Region auf das cDNA-*Microarray* aufgetragen werden. Dadurch werden differentiell exprimierte Gene aus diesen Gruppen sofort nach dem Auslesen sichtbar. Der in dieser Arbeit verwendete *Canada-12k-Drosophila-Microarray* hat eine andere Architektur. Hier werden in jedem Unter-*Array* (24 x 24 *Sub-Array*) Klone aufgetragen, die vollkommen unterschiedliche Gruppen von Genen (Proteinen) repräsentieren.

In jedem Fall aber werden die Klone zwei bis mehrfach auf das cDNA-*Microarray* aufgetragen, um eine hohe Redundanz zu erzeugen. Auf diese Weise werden zufällig falsche bzw. durch Verschmutzung zustande gekommene Hybridisierungen erkannt und von der Analyse ausgeschlossen.

2.20 Hybridisierung

2.20.1 Hybridisieren der cDNA-*Microarrays*

Auf einem *Canada-12k-Drosophila-Microarray* werden immer zwei zu vergleichende Proben hybridisiert, die mit zwei verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffen markiert wurden. Dadurch ist ein direkter Vergleich dieser Proben möglich. Die Hybridisierung der *Canada-12k-Drosophila-Microarrays* mit den fluorchromgekoppelten ccDNA findet in *Corning* Hybridisierungskammern statt. Für die Hybridisierung auf dem cDNA-*Microarray* wird ein Volumen von 60µl Hybridisierungslösung (DIG *Easy Hyb* + ccDNA) eingesetzt. Zu 100µl DIG *Easy Hyb* werden 5µl Hefe tRNA (10mg/ml) und 5µl Heringssperma (10mg/ml) zugegeben. Die gefällte cDNA wird in 10µl H₂O aufgenommen und mit 50µl der vorbereiteten DIG *Easy Hyb*-Lösung gemischt und bei 65°C 10min denaturiert.

Die Probe wird, unter Vermeidung von Blasenbildung, auf das cDNA-*Microarray* aufgetragen und mit einem Deckglas (24 x 60mm) vorsichtig abgedeckt. Das cDNA-*Microarray* wird in eine *Corning* Hybridisierungskammer gelegt. Zur Aufrechterhaltung der Luftfeuchtigkeit wird 2 x 10µl DIG *Easy Hyb* in die Kammer gegeben und diese verschlossen. Die Hybridisierung findet unter Lichtausschluss, bei 37°C über Nacht statt. Zur Bestätigung der Untersuchungsergebnisse wird ein sogenannter *Dye-Flip* (Farbwechsel) durchgeführt. Beim *Dye-Flip* werden die Fluoreszenzfarbstoffe zum markieren der ccDNA ausgetauscht, und überprüft, ob sich nach den Hybridisierungen bei ausgetauschten Fluoreszenzfarbstoffen gleiche Intensitäten für die gleichen Proben ergeben. Zusätzlich wird in dieser Untersuchung eine Hybridisierung mit Probenmaterial aus *Retina* und *Lamina* Wildtyp durchgeführt. Dadurch soll überprüft werden, ob die für diese Arbeit gewählte Vorgehensweise zur Synthese fluoreszenzmarkierter ccDNA, für Probenmaterial über das schon viel Information in den Datenbanken vorliegt, geeignet ist Hybridisierungen durchzuführen.

2.20.2 Stringenzwaschungen der cDNA-Microarrays

Nach dem Hybridisieren wird das Deckglas durch vorsichtiges Bewegen in 1x SSC (bei RT) abgelöst. Es folgen dreimal 15min Stringenzwaschungen in 1 x SSC + 0,1% TritonX, um nicht hybridisierte cDNA und nicht gekoppelte Farbstoffe vom cDNA-Microarray abzuwaschen. Durch zweimal 15s eintauchen in 0,1x SSC und 1x SSC wird das cDNA-Microarray auf Raumtemperatur gebracht.

Nach der Entnahme aus dem Waschgefäß wird das cDNA-MicroArray zur Trocknung mit gasförmigem Stickstoff trockengeblasen. Dieser Vorgang muss schnell erfolgen, damit keine Reste der Waschlösungen zurückbleiben. Nun wird das cDNA-Microarray mit einer fluoreszenzschützenden Schicht (*Dye-Saver*) überzogen und lichtgeschützt gelagert.

2.20.3 Auslesen (*Scannen*) der cDNA-Microarrays

Die hybridisierten cDNA-Microarrays werden in einem Fluoreszenzlesegerät (*Scanner*) ausgelesen. Die dieser Arbeit zugrunde liegenden cDNA-Microarrays wurden mit verschiedenen Fluoreszenzlesegeräten ausgelesen. Zum Einsatz kamen das Gerät *ArrayWoRx* der Firma Applied Precision und das Gerät GMS 418 der Firma MWG-Biotech. Der Ablauf des Auslesens ist aber bei allen Geräten im Prinzip wie folgt:

1. Einlegen des hybridisierten cDNA-Microarrays; Festlegen der Anregung und Emission entsprechend der zwei verwendeten Fluoreszenzfarbstoffe
2. Durchführen eines sogenannten „Pre-Scans“ zur Lokalisation des hybridisierten Bereichs
3. Auswahl dieses Bereichs
4. Festlegen der Scanzeit bzw. Einstellen der Empfindlichkeit des *Photomultipliers*
5. Scannen und Sichern der Daten

Beim Festlegen der Scanzeit bzw. Empfindlichkeit des *Photomultipliers* werden die Einstellungen so gewählt, dass die am stärksten fluoreszierenden Punkte noch nicht in Sättigung gehen um eine korrekte Abstufung zwischen den einzelnen Intensitäten zu gewährleisten. Zudem sollte die Intensität sogenannter Kontrollpunkte, für die beiden zu analysierenden Proben, annähernd gleich sein, um spätere Fehlinterpretationen auszuschließen. Die Kontrollpunkte auf dem *Canada-12k-Drosophila-Microarray* sind ein Gemisch aus 5000 Genen, welche in einer aufsteigenden Verdünnungsreihe auf dem cDNA-Microarray aufgetragen sind.

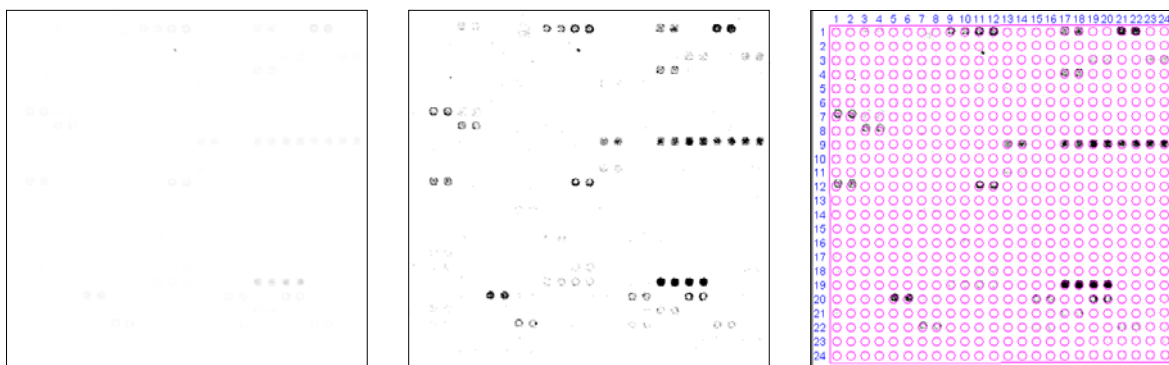
2.21 Ablauf der Auswertung

2.21.1 Auswertung der cDNA-Microarrays

Die Auswertung der eingeleseenen cDNA-Microarrays erfolgt mit den Analyseprogrammen AIDA *Image Analyzer* (Version 3.45) und AIDA *Array Compare* (Version 3.45) der Firma Raytest. Die Auswertung erfolgt für beide hybridisierten Proben getrennt. Zunächst wird das eingescannte cDNA-Microarray in das Programm AIDA *Image Analyzer* geladen und mit der Funktion *Display Control* in seiner Erscheinung so bearbeitet, dass das zu dem cDNA-Microarray gehörige Gitter über die Abbildung des Arrays gelegt werden kann. Hierbei wird die eingeleseene Abbildung des Arrays in ihren Eigenschaften (Pixelzahl, Helligkeit, Kontrast) aber nicht verändert. In der Regel erscheint das Array in der graphischen Darstellung auf Grund der Einlesebedingungen so hell, dass einzelne Punkte nicht gesehen werden können. Durch Verschieben des Histogrammreglers treten die Punkte, an denen eine Hybridisierung stattgefunden hat in Erscheinung und machen so den Aufbau des Arrays sichtbar (Abbildung 2.4 a und b).

Nach der optischen Korrektur der Abbildung des Arrays wird das beim Spotten erzeugte Gitter mit der Positionsinformation der Klone, geladen (Abbildung 2.4c). Es erscheint als Punktraster und bildet das Array-Gitter ab. Die Gitterpunkte sind als Kreise dargestellt. Das Gitter wird nun durch Verschieben und Verzerren über das Array gelegt. Am einfachsten orientiert man sich dabei an den äußeren Gitterpunkten, welche mit den äußeren Eckpunkten des Arrays zur Deckung gebracht werden.

Es folgt die Anpassung (*Alignment*) des Gitters an die Punkte über dem Array. Die Anpassung wird automatisch durch das Programm ausgeführt und dient dazu, das Gitter mit den Array möglichst ideal zur Deckung zu bringen (Abbildung 2.5a und b). Dieser Prozess ist notwendig, weil beim Auftragen nicht immer alle Klone so gleichmäßig auf den Objektträger



a) Vor Bearbeitung

b) Nach Bearbeitung

c) Aufziehen des Gitters

Abb. 2.4 Darstellung der Analyse des Arrays: a) Ausgangszustand, b) nach Kontrastverstärkung und c) Aufziehen des Gitters. Ausschnitt aus dem Array Nr. 12717659

aufgetragen wurden, dass sie mit den Positionsinformationen des Gitters zu 100% übereinstimmt.

Nach der Anpassung folgt das Auslesen der Intensitätswerte der zu jedem Gitterpunkt gehörigen *Array*-Punkte innerhalb eines Kreises. Die Intensitätswerte für einen *Array*-Punkt werden aus dem Mittelwert aller in einem *Array*-Punkt enthaltenen Pixelintensitäten gebildet und als dimensionsloser Wert in einer Tabelle dargestellt und abgespeichert.

Der eventuell vorhandene Hintergrund wird herausgerechnet, indem jeweils ein weiterer Kreis um die Gitterpunkte herumgelegt wird, und die, in diesen so entstehenden Ringen, ausgelesenen Intensitätswerte von den Intensitätswerten der inneren Kreise abgezogen werden. Die Intensitätswerte werden auf diese Weise hintergrundbereinigt.

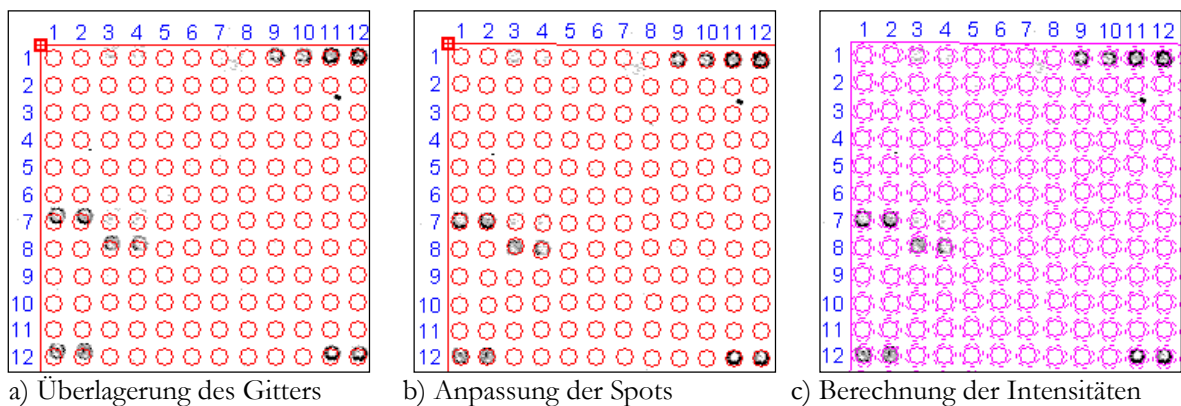


Abb. 2.5 Darstellung der Analyse des *Arrays*: a) Überlagerung der Spots mit den Gitterpunkten (rote Kreise), b) Anpassung der Gitterpunkte an die Spots (*Alignment*) und c) Berechnung der Intensitäten

2.21.2 Analyse differentiell exprimierter Gene

Nachdem die Intensitätswerte für die beiden hybridisierten Proben gemessen und für jeden Punkt auf den *Arrays* bestimmt wurden, folgt der softwaregestützte Vergleich der Hybridisierungen. Die tabellarisch dargestellten Intensitäten der beiden Hybridisierungen werden mit dem Programm *AIDA Array Compare* (Version 3.45) aufgerufen. Das zu analysierende *Array* wird dabei als *Master-Array* bezeichnet und das zum Vergleich herangezogene als *Client-Array*. Die zu vergleichenden *Arrays* werden sowohl graphisch (Abbildung 2.6), als auch mit ihren Werten tabellarisch dargestellt. Der Vergleich erfolgt, indem der Intensitätswert für einen Klon auf dem *Master-Array*, durch den Intensitätswert des entsprechenden Klons auf dem *Client-Array* geteilt wird. Dieser Quotient wird *Ratio* genannt. Als differentiell exprimiert werden diejenigen Gene angesehen, für die sich bei der softwaregestützten Analyse ein Verhältnis (*Ratio*) von $>2,0$ oder $<0,5$ ergibt. Diese Ausschlusswerte können je nach Qualität der Hybridisierung variiert werden.

Auf Grund dieses Vorgehens werden durchaus auch Gene als differentiell exprimiert

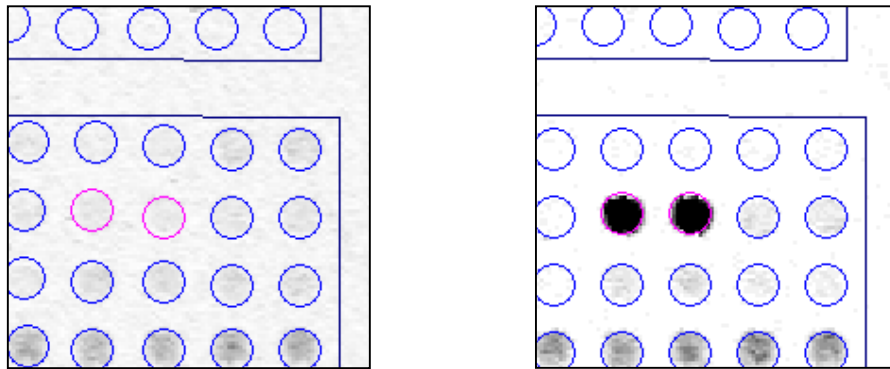


Abb. 2.6 Ausschnitt aus *Array* 12926913. Dargestellt sind Abbilder der beiden hybridisierten Proben, nach Bearbeitung mit dem Computerprogramm *AIDA Image Analyzer*. Links: *Master-Array*; rechts: *Client-Array*. Das zu den Punkten gehörende Gen ist differentiell exprimiert, weil die Ratio kleiner als 0,5 ist.

angesehen, die zwar in beiden Proben exprimiert werden, sich aber in ihrer Intensität deutlich voneinander unterscheiden, d.h. deutlich stärker oder schwächer exprimiert sind.

Zudem können je nach Qualität, der Hybridisierungen, bestimmte Filter aktiviert werden, so dass zum Beispiel Hybridisierungsereignisse die mit ihrer Intensität über oder unter einem bestimmten Wert liegen von der Analyse ausgeschlossen werden können. So können unerwünschte Ereignisse, wie unspezifische Hybridisierungen oder Hintergrundfluoreszenz, welche die Auswertung verfälschen würden eliminiert werden.

Vor Beginn der Analyse wird eine sogenannte Normalisierung der Intensitätswerte durchgeführt. In Abhängigkeit von den Randbedingungen eines Experiments, kann es dazu kommen, dass an sich gleich stark exprimierte Gene in zu vergleichenden Geweben etc. unterschiedlich starke Intensitätswerte aufweisen. Dies könnte fälschlicherweise dazu führen, dass Gene als differentiell exprimiert angesehen werden, obwohl dies tatsächlich nicht der Fall ist. Ursächlich hierfür sind u.a. die unterschiedlich starke Intensität der Emission der Farbstoffe, eine abweichende Empfindlichkeit bei der Einstellung des *Photomultipliers* beim Auslesen oder ein abweichend starker Einbau von Farbstoffen bei den zu vergleichenden Proben.

Die Normalisierung erfolgt unter der Annahme, dass die überwiegende Zahl aller Gene, die ein *Array* enthält nicht differentiell exprimiert werden. Unter dieser Voraussetzung müsste die Ratio für den Durchschnitt aller Intensitätswerte gleich 1 sein. Ist dieser Wert für den Vergleich innerhalb eines oder verschiedener *Arrays* nicht gegeben, wird ein Normalisierungsfaktor errechnet, indem die Summe der Intensitätswerte aller *Array*-Punkte einer Probe, durch die Summe aller Intensitätswerte aller *Array*-Punkte der anderen Probe geteilt und hieraus die Quadratwurzel gezogen wird. Die Intensitätswerte des *Arrays* mit den niedrigeren Intensitäten werden mit dem Normalisierungsfaktor multipliziert, während die Intensitätswerte des *Arrays* mit den höheren Intensitätswerten mit dem Kehrwert des Normalisierungsfaktors multipliziert werden. Durch dieses Verfahren wird das

Intensitätsniveau der zu vergleichenden Hybridisierungen soweit angeglichen, dass oben genannte Fehlerquellen ausgeschlossen werden.

2.22 Datenbankrecherche

Die bei der Analyse der cDNA-*Microarrays* als differentiell ermittelten Gene, werden tabellarisch dargestellt und, soweit bekannt, mit den Koordinaten, dem Namen, der Ratio und, sofern vorhanden, dem Kürzel belegt. Besonders ausgewählte Gene werden mit der CG-Nummer, dem Kürzel und einer kurzen Funktionsbeschreibung belegt.

Wenn eine sehr große Anzahl Gene, als differentiell exprimiert erkannt werden, wird eine Auswahl vorgenommen, entsprechend der Gene, die für das Thema dieser Arbeit eine besondere Relevanz haben.

Die Einteilung der ausgewählten Gene entspricht der Einteilung der Gene, wie sie von der Datenbank *Gene Ontology* (www.geneontology.org) vorgeschlagen werden. Die Datenbank *Gene Ontology* teilt die Gene nach biologischen Prozessen und molekularen Funktionen ein, um einen einheitlichen Standard der Nomenklatur und Beschreibung von Genen einzuhalten. Hierzu gehört auch die Einteilung in Untergruppen, aus denen die Zusammenstellung ermittelt wird. Zu den in dieser Arbeit ausgewählten Gengruppen, gehören Gene ,deren Genprodukte Funktionen im Zusammenhang mit antioxydativer Funktion, Signaltransduktion, Ubiquinierung, Transmittertransport-und Metabolismus, Apoptose und Proteinmetabolismus haben Die eigentliche Einteilung erfolgt durch Eingabe der differentiellen Gene in die Datenbank *FatiGO* unter der Internetadresse www.fatigo.bioinfo.

Genauere Informationen werden zu den einzelnen Genen werden unter der Internetadresse www.flybase.bio.indiana.edu/cgi-bin/fbidatch.html abgefragt.

Ein Teil der auf dem *Canada-12k Drosophila Microarray* aufgetragenen Gene ist nur mit der CG-Nummer oder einer cDNA-Genbibliotheksnummer hinterlegt. Für diese Gene kann unter: <http://www.fruitfly.org> die Nucleotidsequenz bzw. ein Teil dieser Sequenz abgefragt werden und unter der Adresse www.flybase.net/blast einer sogenannten *Blast*-Suche unterzogen werden. Hierbei wird die eingegebene Nucleotidsequenz in einem offenen Leseraster gelesen und ihr dann mögliche Aminosäuresequenzen zugeordnet. Diese Aminosäuresequenzen werden einem Homologievergleich mit bisher bekannten Aminosäuresequenzen unterzogen und diese Homologien in einer absteigenden Reihenfolge dargestellt. Ist die Homologie besonders hoch wird das entsprechende Gen mit aufgeführt. Die gewonnenen Informationen sollen in Bezug auf das Thema der vorliegenden Arbeit diskutiert.

2.23 Flussdiagramm

Da der Ablauf der Untersuchung mit seinem Fortschreiten und zusätzlichen Kontrollen zum Teil etwas unübersichtlich erscheint, soll er an dieser Stelle in einem Flussdiagramm (Diagramm 2.1) dargestellt und kurz zusammengefasst werden.

Der eigentliche Ablauf der Untersuchung ist durch grün hinterlegte Felder dargestellt. Die Kontrolle einzelner Zwischenschritte wird in blau und die Visualisierung dopaminerger Neuronen sowie die FACS-Analyse in rot bzw. rot/grün dargestellt.

Zur Untersuchung der Genexpressionsmuster Synuclein exprimierender *Drosophila melanogaster* werden die Treiber- und Effektorlinien (DDcGAL4 und UAS-Synuclein) gekreuzt. Nach dem Schlupf der Fliegen werden in bestimmten Abständen (10 Tage) Verhaltensversuche durchgeführt. Die verwendeten Fliegen werden in Aceton eingefroren. Der weitere Verlauf der Untersuchung wird mit diesen Tieren fortgeführt. Gleichzeitig werden Tiere eingebettet und am *Kryotom* geschnitten. Mit diesen Schnitten wird der immunhistochemische Nachweis der Synuclein-Expression geführt.

Aus den eingefrorenen Tieren wird die mRNA (als Repräsentant des Expressionsstatus) isoliert. Die mRNA wird revers Transkribiert (cDNA) und durch PCR amplifiziert. Die Amplifikate werden mit einer Gelelektrophorese verifiziert. Anschließend wird aus den Amplifikaten eine cRNA synthetisiert, die mit einer RNA-Gelelektrophorese und durch Photometrie nachgewiesen wird. Aus dieser RNA wird eine ccDNA synthetisiert in die Amino-Allyl-dUTP mit eingebaut werden. Die ccDNA wird mit einem *Southern-Blot* detektiert. Es folgt die Markierung mit Fluoreszenzfarbstoffen und die Hybridisierung mit dem cDNA-*Micro.Array*. Wenn das cDNA-*Micro.Array* ausgelesen ist, wird es analysiert und ausgewertet.

Zur Visualisierung dopaminerger Neurone durch GFP werden die Treiber- und Effektorlinien (DDc-GAL4 und UAS-GFP) gekreuzt. Sowohl bei Larvalstadien als auch bei adulten Tieren werden die Gehirne, sowie die Thorakalganglien präpariert, auf Fluoreszenz überprüft und mit dem konfokalen Laserscanning-Mikroskop Aufnahmen gemacht.

Um Genexpressionsmuster-Analysen dopaminerger Zellen durchzuführen werden GFP-Effektorlinien mit verschiedenen Treiberlinien (DDc-GAL4,) gekreuzt. Etwa 14 Tage nach dem Schlupf werden dann die Gehirne herauspräpariert, einem Verdau unterzogen und in einem *Cell-Sorter* nach GFP-Fluoreszenz sortiert. Nach der Lyse der Zellen wird die mRNA isoliert, woraufhin die Analyse des Genexpressionmusters in den Weg der anderen Untersuchung einmündet.

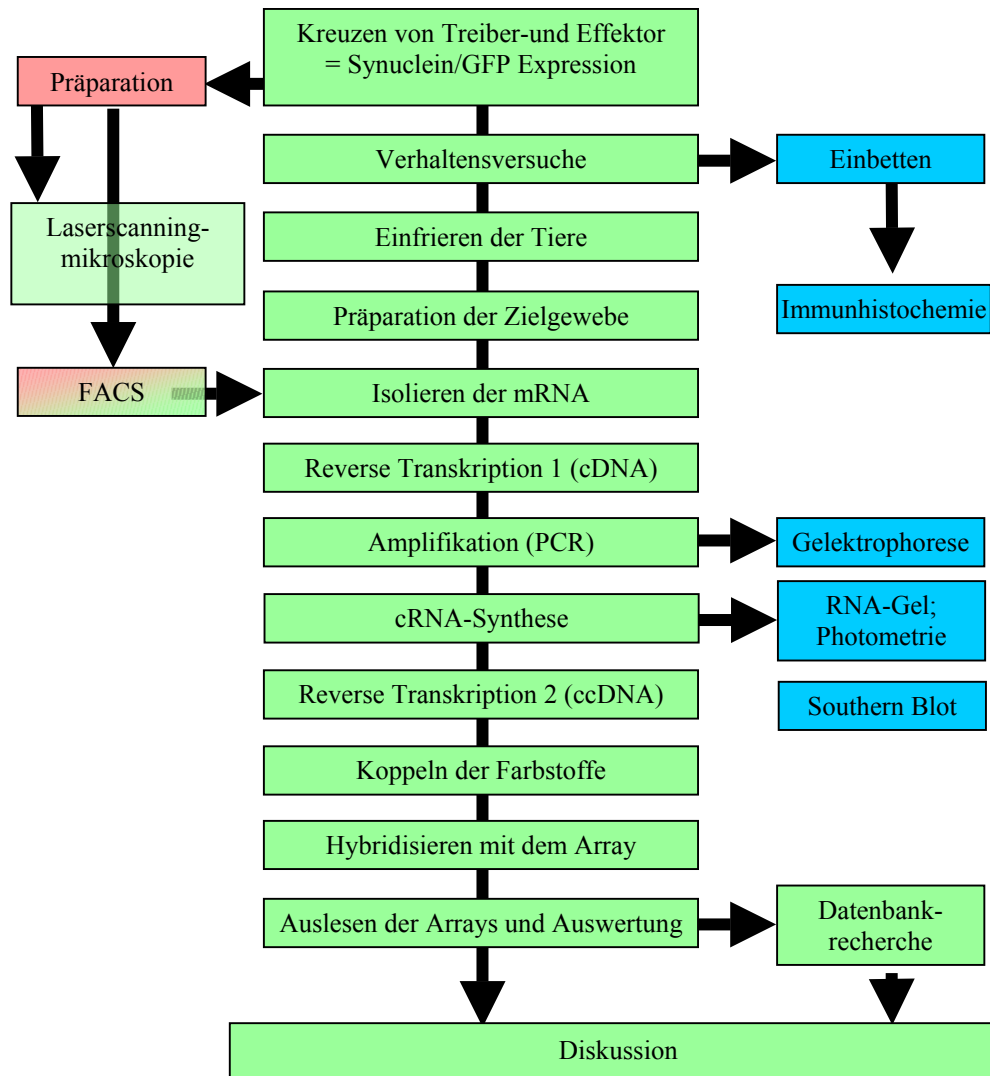


Diagram 2.1 Flussdiagramm: Abfolge der Untersuchungen zur Analyse Synuclein exprimierender *Drosophila melanogaster*. Der Hauptgang der Untersuchungen ist grün hinterlegt. Kontrolluntersuchungen sind blau hinterlegt. Die Visualisierung dopaminerger Zellen und die FACS-Analyse sind rot hinterlegt.

3.0 Ergebnisse

3.1 Ansicht des Gehirns von *Drosophila melanogaster*

Von den Gehirnen der eingefrorenen *Drosophila melanogaster* wurden Aufnahmen mit dem Elektronenmikroskop gemacht. Die Tiere wurden unter dem Binokular präpariert und zur Vorbereitung der Aufnahmen mit Gold bedampft. Die Aufnahmen wurden freundlicherweise unter Anleitung von Frau Renate Walter im Zoologischen Museum des Fachbereichs Biologie der Universität Hamburg gemacht.

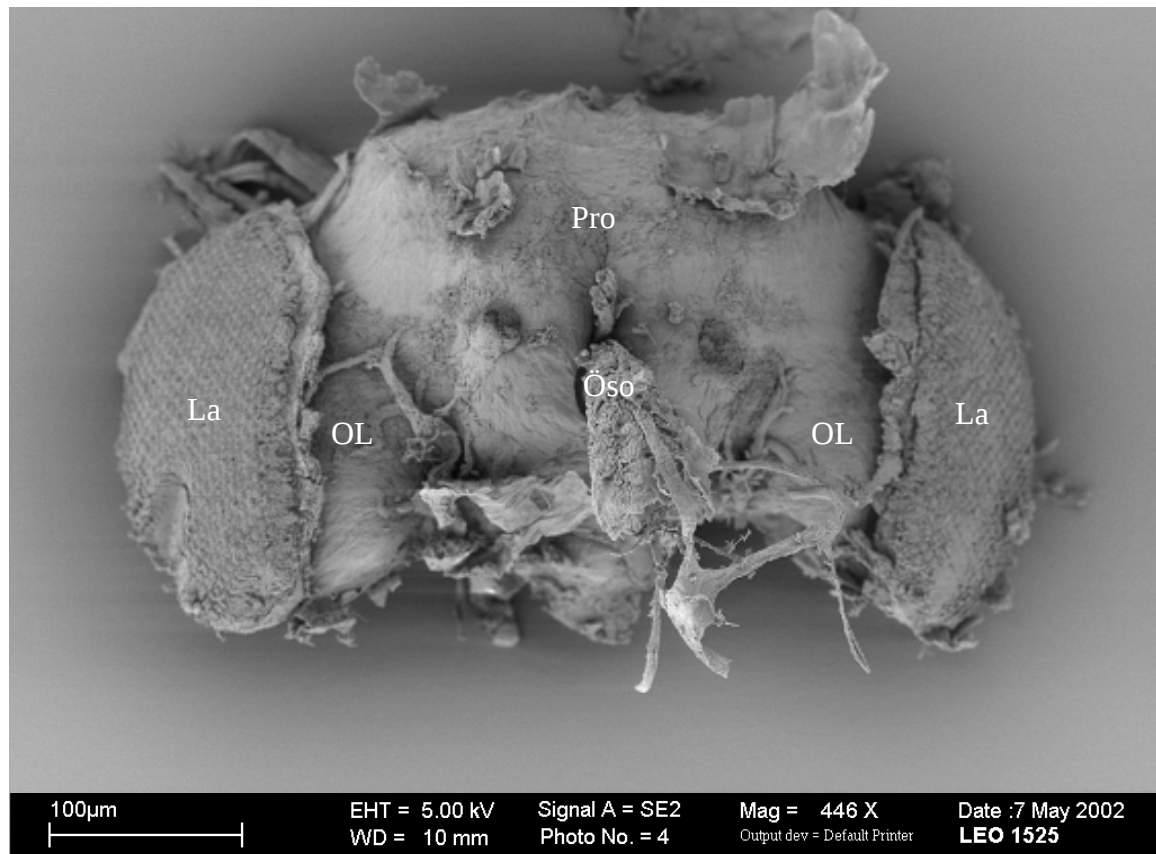


Abbildung 3.1 Elektronenmikroskopische Aufnahme eines Gehirns von *Drosophila melanogaster* im Maßstab 400:1. Gesamtansicht von frontal. Zu erkennen ist das Gehirn mit Proto- Deuto- und Tritocerebrum und die optischen Loben mit der aufliegenden *Lamina*. Die drei Gehirnteile sind vollständig miteinander verschmolzen. In der Mitte ist ein kurzes Stück des Ösophagus zu sehen, dass an der Grenze zwischen Proto- und Deutocerebrum das Gehirn durchzieht. La: Lamina; OL: Optische Loben; Öso: Ösophagus; Pro: Protocerebrum.

Die Aufnahme (Abbildung 3.1) zeigt das Gehirn von *Drosophila melanogaster* in der Frontalansicht. Die drei miteinander verschmolzenen Gehirnteile werden in der Mitte von einem Teil des Ösophagus durchzogen. Links und rechts der optischen Loben liegt die *Lamina* auf. Während der Präparation der Gehirne wurden die Retina und die *Lamina* entfernt, um die zu isolierende mRNA-Population auf das zu untersuchende Gewebe einzugrenzen. Nach der Präparation wurde die mRNA sofort isoliert und revers Transkribiert. Die entstandene cDNA wurde durch PCR amplifiziert.

3.2 Kontrolle der PCR

Die Abbildungen 3.2 und 3.3 zeigen beispielhaft die Kontrolle der Amplifikation (PCR) nach der cDNA-Erststrangsynthese für die Gehirne vom Wildtyp und den Synuclein exprimierenden *Drosophila melanogaster*. Die Amplifikate wurden jeweils zweifach auf das Agarosegel aufgetragen. Die maximale Länge der Amplifikate reicht von 2000 Basenpaaren beim Wildtyp 30 Tage bis zu 4000 Basenpaare beim Wildtyp 60 Tage (Abbildung 3.2).

Die maximale Länge der Amplifikate bei den Synuclein exprimierenden *Drosophila melanogaster* reicht von 750 Basenpaaren Syn 10 Tage bis zu 2500 Basenpaaren Syn 30 Tage (Abbildung 3.3). Die einzelnen Bahnen zeigen zum Teil eine unterschiedliche Dichte und distinkte Banden, was anzeigt, dass hier Gene mit hoher Expressionsrate zu finden sind, die auch besonders stark amplifiziert werden.

Als Standard wurde der *GeneRuler™* DNA-Ladder 1kb eingesetzt. Die Bahn in der der Standard mitlief wurde aus Gründen der Sichtbarkeit auf den Gelfotos etwas aufgehellt. Die Zyklenzahlen in der PCR waren für den Wildtyp 22 bis 24 Zyklen. Für die Synuclein exprimierenden *Drosophila melanogaster* war sie in diesem Fall 21 bis 24 Zyklen. Zur Amplifikation wurden der SP6-II- und der T7-II-Primer eingesetzt.

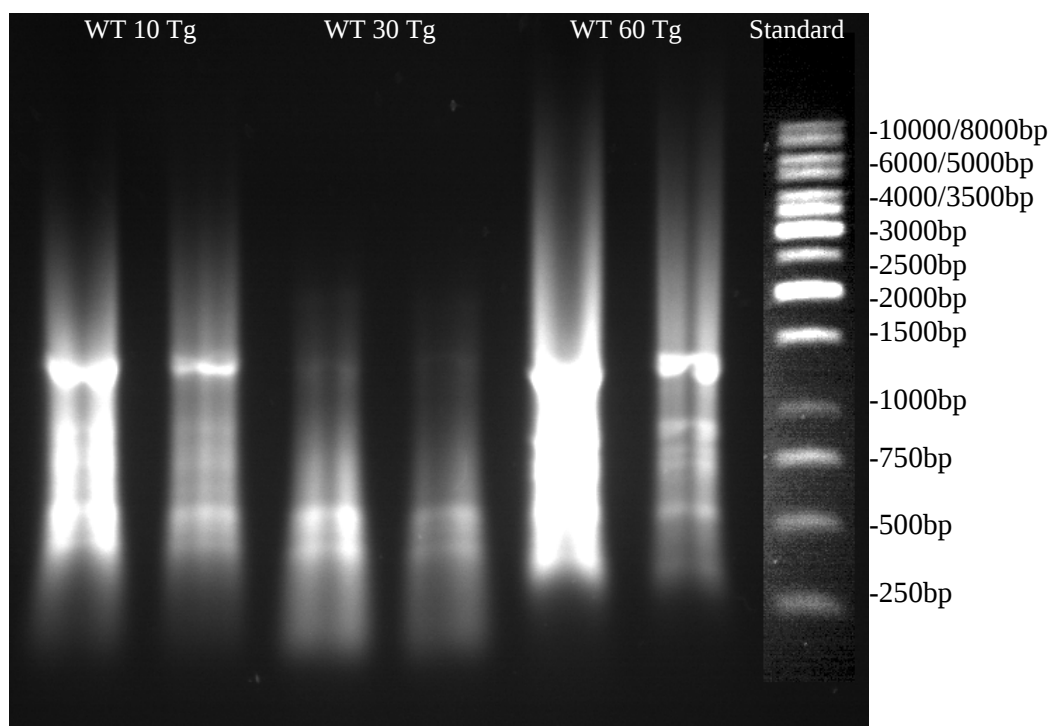


Abbildung 3.2 Gelfoto: PCR-Produkte Wildtyp *Drosophila melanogaster*, Gehirn; 10-, 30-, 60-Tage alt; 4,5min Schreibzeit; Standard: *GeneRuler™* DNA-Ladder 1kb, aufgehellt. WT: Wildtyp, bp: Basenpaare.

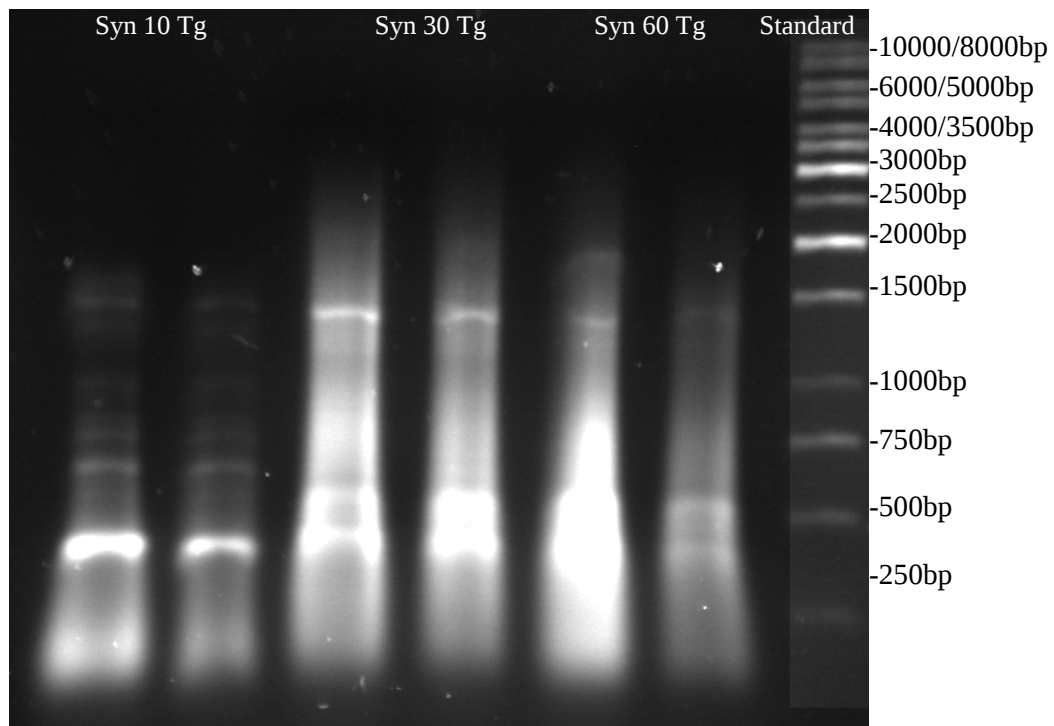


Abbildung 3.3 Gelfoto: PCR-Produkte Synuclein expremierende *Drosophila melanogaster*; Gehirn; 10-, 30-, 60-Tage alt; 4,5min Schreibzeit; Standard: GeneRuler™ 1kb DNA-Ladder, aufgehellt.

3.3 Kontrolle der cRNA-Synthese

Zum einen wurde die Konzentration der cRNA photometrisch bestimmt und zu anderen in einem RNA-Gel analysiert. In Abbildung 3.4 wird die Kontrolle der cRNA-Synthese am Beispiel der Wildtypgehirne 20 und 50 Tage und der Synuclein exprimierenden Gehirne von 20 und 50 Tage alten Tieren gezeigt.

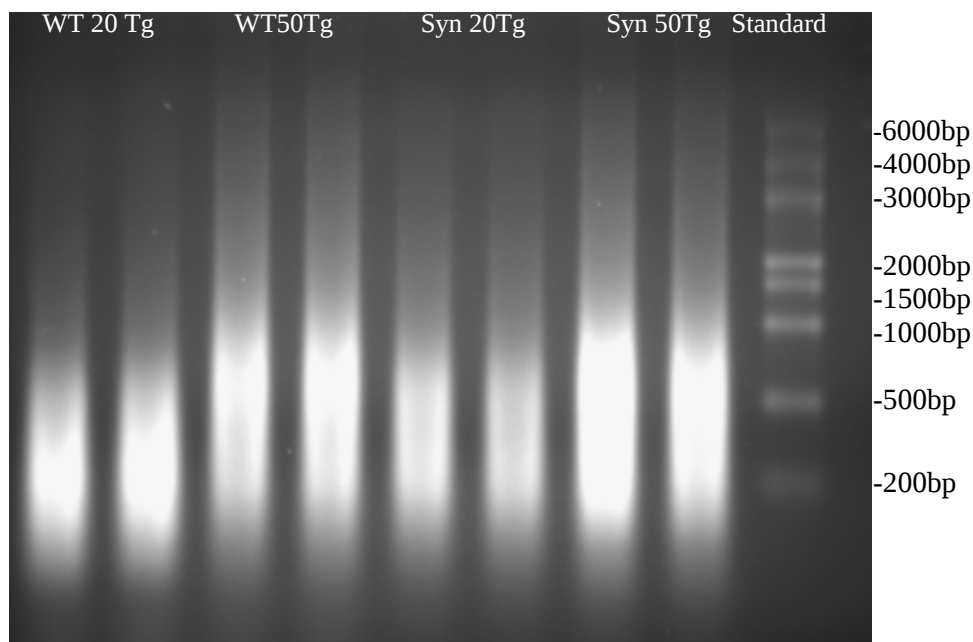


Abbildung 3.4 Gelfoto cRNA-Synthese Wildtyp 20/50 Tage; WT Gehirn und Synuclein expremierende Tiere 20/50 Tage; Gehirn. Synthese mit dem SP6 RNA-Synthese Kit (*MaxiScript*) von Ambion.

Die cRNA wurde in einem 1% Formaldehydgel 1,5 Stunden bei 90mV aufgetrennt. Als Standard wurde der RNA-Ladder *High Range* von Fermentas eingesetzt. Die Länge der cRNA reicht von ca. 4000bp bis ca. 100bp. Der weitaus größte Anteil der cRNA hat eine Länge zwischen 100bp und 1000bp.

In Tabelle 3.1 sind exemplarisch die photometrisch gemessenen cRNA-Mengen für verschiedene Untersuchungszeitpunkte aufgeführt. Es zeigt sich, dass bis zu 107µg cRNA durch die cRNA-Synthese synthetisiert werden konnten. Diese Menge war in jedem Fall ausreichend, um nachfolgend bis zu zehnmal eine ccDNA-Synthese durchführen zu können. Es wurden hierfür maximal 10µg benötigt.

Tabelle 3.1 Ergebnisse der cRNA-Synthese. Die Menge der cRNA ist in totalen Werten angegeben. WT = Wildtyp, Syn = Synuclein_{wt} und A30P = Synuclein_{A30P}. Die zugehörigen Zahlen stehen für den Untersuchungszeitraum. Es werden exemplarisch zwei cRNA-Synthesen aufgeführt. Exp. = Experimente

	WT 20T	WT 50T	WT 60T	Syn 20T	Syn 50T	Syn 60T	A30P 50T
Exp 1.	102µg	99µg	107µg	98µg	88µg	103µg	95µg
Exp.2	100µg	87µ	94µg	93µg	102µg	100µg	96µg

3.4 Kontrolle der ccDNA-Synthese

Abbildung 3.6 zeigt das Ergebnis des *Southern-Blots* zur Kontrolle der ccDNA-Synthese für die Gehirne aus Synuclein_{wt} 20 Tage, 50 Tage und Wildtyp 50 Tage.

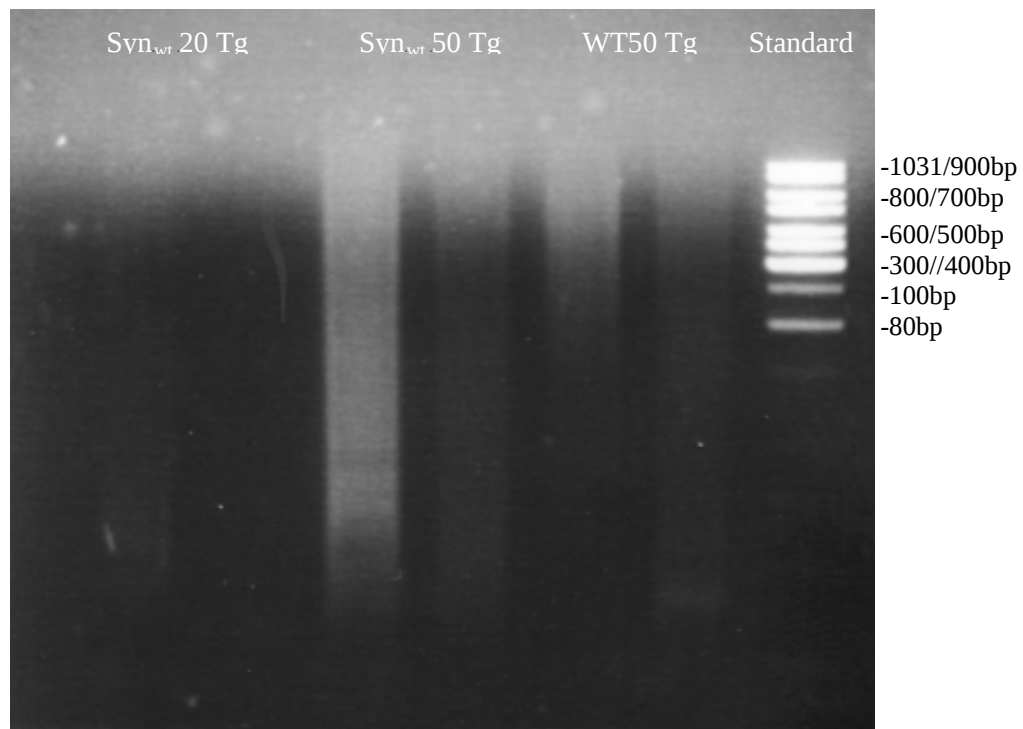


Abbildung 3.5 Gelfoto der ccDNA-Synthese für die Proben Gehirn Syn_{wt} 20 Tage, Syn_{wt} 50 Tage und WT 50 Tage. Als *Primer* wurde der Biotin-*OligodT* T7I-Primer verwendet. Syn_{wt}: Synuclein_{wt} WT:Wildtyp

Die reverse Transkription wurde mit den Amino-allyl-dUTP unter Verwendung des Biotin-*OligodT* T7I-Primers durchgeführt. Die cRNA wurde anschließend durch Hydrolyse abgebaut. Dann wurde die ccDNA gefällt und in 50µl H₂O aufgenommen.

Die Proben wurden zweifach auf das 1% Agarose-Gel aufgetragen und eine Stunde bei 100mV elektrophoretisch aufgetrennt. Der Standard ist im *Southern-Blot* nicht zu erkennen, weil er nicht biotinyliert ist. Er ist aber bei der Elektrophorese mit aufgetragen worden und auf dem zugehörigen Gelfoto (Abbildung 3.5) zu sehen, so dass die Länge der synthetisierten ccDNA abgeschätzt werden kann. Der sich daran anschließende *Southern-Blot* wurde über Nacht durchgeführt, getrocknet und UV-fixiert. Detektiert wurde die ccDNA mit Avidin-gekoppelter Alkalischer Phosphatase, die spezifisch das durch den Primer inkorporierte Biotin erkennt. Beim Beladen des Agarose-Gels ist in der zweiten Bahn von links offensichtlich das Probenmaterial aus der Geltasche diffundiert, bevor die Elektrophorese gestartet wurde. Daher konnte hier nach dem *Blot* keine ccDNA detektiert werden.

In Abbildung 3.5 ist das zu dem *Southern-Blot* gehörige Gelfoto dargestellt. Die Auftrennung erfolgte wie oben beschrieben. Der Standard (*GeneRuler* 100bp DNA-Ladder) zeigt, dass die ccDNA eine Länge von unter 80bp bis zu 1500bp hatte.

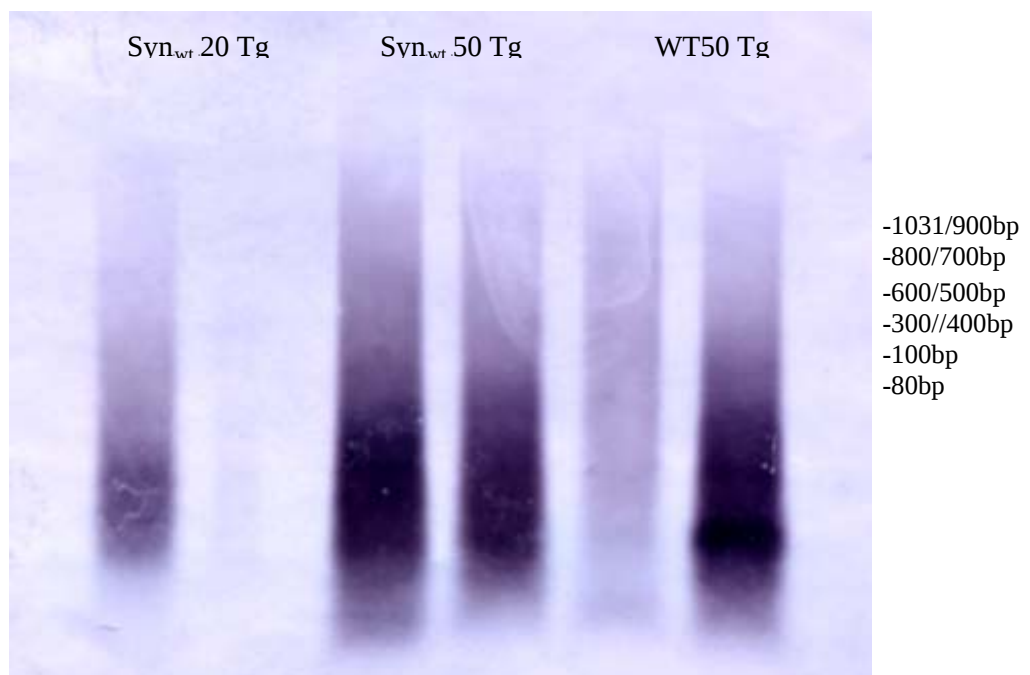


Abbildung 3.6 *Southern-Blot* der ccDNA-Synthese für die Proben Gehirn Syn_{wt} 20 Tage, Syn_{wt} 50 Tage und WT 50 Tage. Der *Southern-Blot* wurde über Nacht durchgeführt. Ein deutlicher „Schmier“ zeigt die transferierte ccDNA an. Syn_{wt}: Synuclein_{wt}, WT: Wildtyp

3.5 Dopaminerge Zellen mit GFP-Expression

Die Abbildungen 3.7 bis 3.13 zeigen Aufnahmen GFP exprimierender dopaminerger Zellen im Nervensystem von Larven und adulten *Drosophila melanogaster*. Die Expression des GFP wurde durch das GAL4/UAS-System in die dopaminergen Zellen dirigiert. Es wurden Larven im L2- und L3-Stadium, das Gehirn und das thorakale Verbundganglion von adulten Tieren präpariert.

Die Larven wurden zunächst aus den Aufzuchtgläsern entnommen und für ca. 30min in *Drosophila*-Ringer überführt, um das Aufzuchtmedium abzuwaschen. Dann wurde das Nervensystem in isotonischen Zellkulturmedium L15 durch Auseinanderziehen der Larven herauspräpariert. Es zeigte sich, dass dabei sehr vorsichtig vorgegangen werden mußte, um das Gewebe nicht zu beschädigen, da sonst die GFP exprimierenden Zellen zerstört werden könnten. Nach der Präparation wurden die Gewebe in Zellkulturmedium L15 auf Objektträger überführt, ausgerichtet und mit einem Deckglas überdeckt und durch Auftragen von Lack seitlich verschlossen.

Die so vorbereiteten Präparate wurden zunächst unter Fluoreszenzlicht auf GFP-Fluoreszenz kontrolliert und, sofern die Lage und Fluoreszenz geeignet erschienen, mit dem konfokalen Laserscanning-Mikroskop Aufnahmen gemacht (gescannt).

Beim Durchfokussieren mit dem konfokalen Fokus durch die Präparate zeigte sich, dass deren Höhe zwischen 50µm (L2-Larve) und 100µm (adultes Gehirn) lag. Entsprechend wurde die Höhe der zu scannenden Stapel eingestellt und die Anzahl der zu erzeugenden Stapelbilder festgelegt. Es wurden in der Regel 1µm dicke Stapelbilder gemacht, die 2-bis 4-fach gescannt wurden. Daraus ergab sich, dass bis zu 100 Stapelbilder gemacht wurden. Anschließend an das Scannen wurde der Bilderstapel mit Hilfe des zugehörigen Computerprogramms übereinander gelegt und zu einem Bild verbunden.

3.5.1 Larvalstadien

Im Nervensystem des L2-Larvenstadiums (Abbildung 3.7) wurde das GFP stark in einzelnen Zellen bzw. Zellgruppen an den Außenseiten der Gehirnhemisphären exprimiert. Es ergeben sich zwei ringförmige Strukturen, die sich quasi um die Hemisphären legen. Im frontalen Bereich finden sich, links und rechts der Mittellinie zwei größere Zellen bzw. Zellgruppen, die starke GFP-Fluoreszenz zeigen. Im ventralen Ganglion finden sich caudal ebenfalls zwei stark fluoreszierende Zellen, links und rechts der Mittellinie gelegen. Außerdem finden sich etwas schwächer fluoreszierende Zellen in den Gehirnhemisphären und lateral des Ventralganglions.

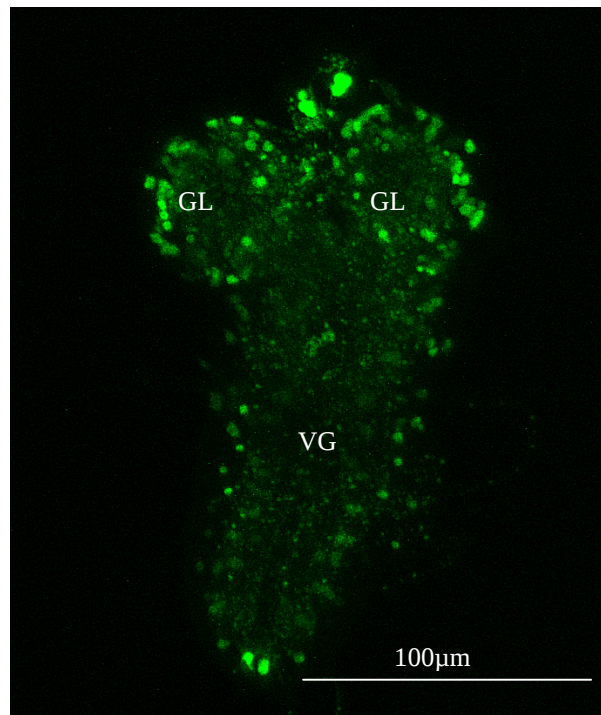


Abbildung 3.7 GFP fluoreszierende dopaminerge Neuronen im Nervensystem von *Drosophila melanogaster* L2 Larve nach Kreuzung der DDC-GAL4-Linie mit der UAS-GFP-Linie. GL: Gehirn Loben; VG: Ventralganglion

In Abbildung 3.8 ist das Nervensystem einer L3-Larve nach Kreuzung der DDC-GAL4-Linie mit der UAS-GFP-Linie abgebildet. GFP fluoreszierende Neurone finden sich lateral, am Rand der Gehirnhemisphären, die mit ihren Axonen stark in die Mitte der Hemisphären verzweigen. Auch hier legen sich die dopaminergen Neurone ringförmig um die Hemisphären, in Abbildung 3.8 links zu sehen. Frontal und dem Ventralganglion zugewandt zeigen jeweils einzelne Zellen bzw. Zellgruppen links und rechts der Mittellinie, mit starken Verzweigungen in die Mitte des Gehirns bzw. nach lateral. Es kommt zu einer starken Ansammlung von Zellen im frontalen Bereich median der Gehirnloben.

Im Ventralganglion sind jeweils zwei lateral gelegene Reihen GFP fluoreszierender Neurone zu erkennen, die sich segmental anordnen. Die mehr nach median gelegene Reihe scheint sich dabei nach caudal, der mehr lateral gelegenen Reihe anzunähern, was auf der rechten Seite gut zu erkennen ist. Im vorderen Bereich liegen die Neurone einzeln, während sich im caudalen Bereich jeweils zwei Neurone gruppieren.

Die median gelegenen Zellen sind segmental durch stark leuchtende Axone miteinander Verbunden. Die lateral gelegenen Neurone schließen sich diesen mit schwächer leuchtenden Axonen an. Schwach leuchtende Axonzüge ziehen sich von caudal nach cranial bis in die Gehirnhemisphären. Am caudalen Ende sind etwas stärker leuchtende Axone der Abdominalnerven zu erkennen.

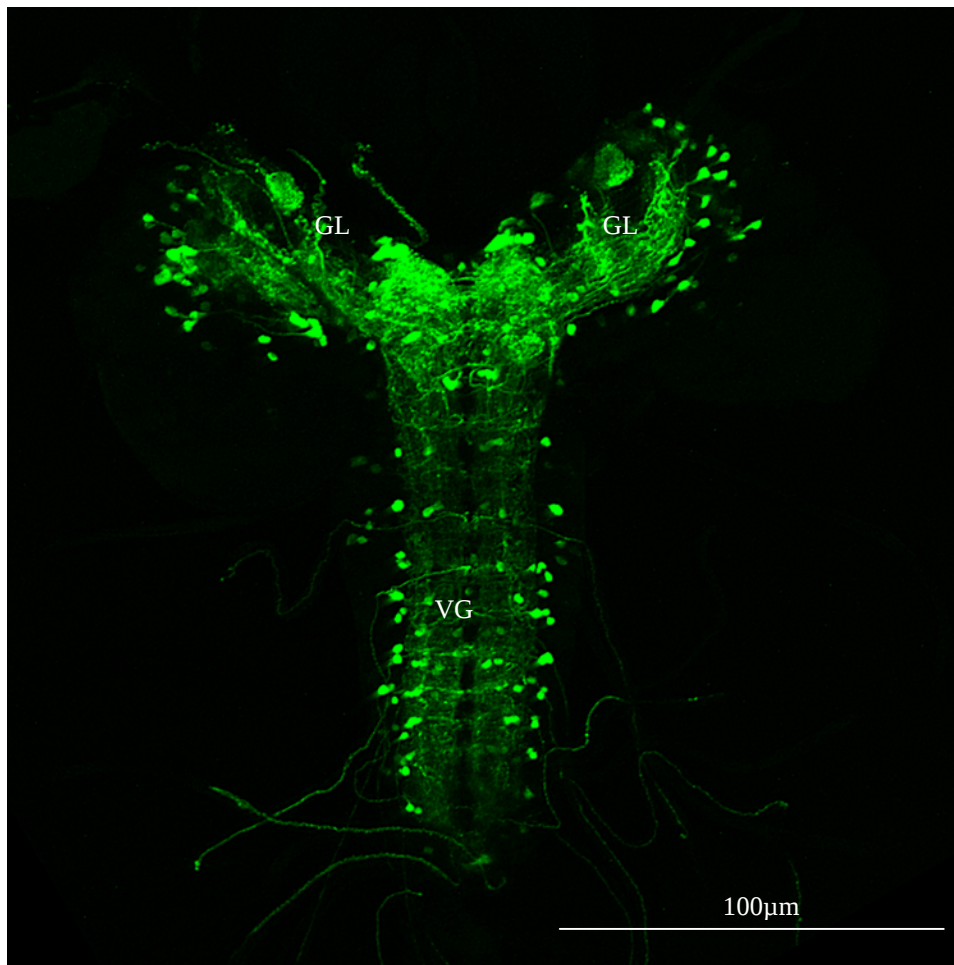


Abbildung 3.8 GFP fluoreszierende dopaminerge Neuronen im Nervensystem von *Drosophila melanogaster* L3 Larve nach der Kreuzung der DDC-GAL4-Linie mit der UAS-GFP-Linie. GL: Gehirn Loben; VG: Ventralganglion.

3.5.2 Das adulte Gehirn und 2D-Rekonstruktion

In der Abbildung 3.9 ist das Gehirn einer adulten *Drosophila melanogaster* mit GFP exprimierenden dopaminergen Neuronen zu sehen. Die größten Gruppen dopaminergere Zellen finden sich im Protocerebrum, die Gruppen sind trapezförmig angeordnet. Zwei größere Gruppen finden sich links und rechts der Mittellinie zentral im Protocerebrum. Kleinere Zellgruppen finden sich im lateralen Protocerebrum. Sie sind in der Abbildung in Richtung des Subösophagialganglions gerückt. Genau in der Mittellinie ist eine Zelle im Bereich des Subösophagialganglions zu erkennen.

Lateral finden sich stark leuchtende Zellen oder Zellgruppen, die sich entlang der *Medulla* aufreihen. Sie stehen mit dem medialen Protocerebrum über schwach leuchtende Axone in Verbindung. Vereinzelt Zellen finden sich frontal im Bereich der Antennalloben. Links und rechts ist jeweils ein Axon zu erkennen, das aus dem Bereich der *Medulla* in Richtung der *Lamina* zieht.

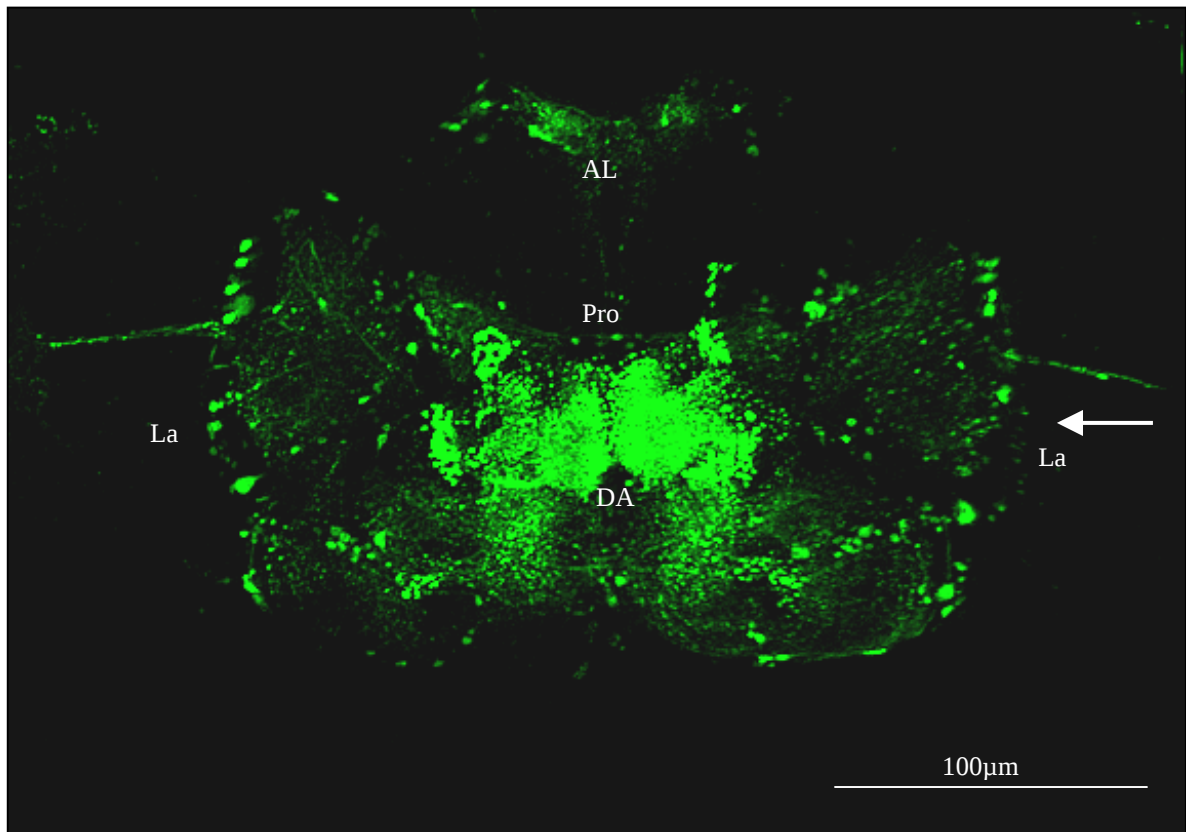


Abbildung 3.9 GFP exprimierende dopaminerge Neurone im Gehirn von *Drosophila melanogaster* nach der Kreuzung der DDC-GAL4-Linie mit der UAS-GFP-Linie, von dorsal gesehen. Größere Gruppen von dopaminergen Zellen liegen im Protocerebrum. Vereinzelte Zellen liegen am Rand der *Lamina*. AL: Antennalloben; Pro: Protocerebrum; DA: Dopaminerge Zellen; La: *Lamina*

In Abbildung 3.10 ist die Frontalansicht des Gehirns von *Drosophila melanogaster* mit GFP fluoreszierenden Zellen zu sehen. Die Frontalansicht wurde computergestützt aus dem, zu Abbildung 3.9 gehörenden Bilderstapel rekonstruiert. Sie wurde auf Höhe der in Abbildung 3.9 mit einem weißen Pfeil bezeichneten Ebene durchgeführt. Zu erkennen sind die im medialen Protocerebrum liegenden Zellgruppen, die sich von dorsal nach ventral durch das Gehirn ziehen.

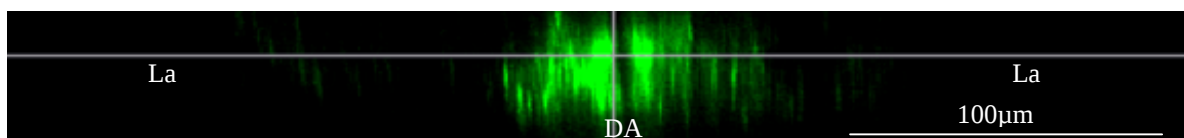


Abbildung 3.10 Frontalansicht des Gehirns von *Drosophila melanogaster*. Computergestützte 2D-Rekonstruktion des zu Abbildung 3.9 gehörigen Bilderstapels.. Der weiße Pfeil in Abbildung 3.10 deutet die Schnittebene an. DA: Dopaminerge Zellen; La: *Lamina*

3.5.3 Zeichnung vom adulten Gehirn

In Abbildung 3.11 ist die Lage der dopaminergen Zellen im Gehirn von *Drosophila melanogaster* zeichnerisch dargestellt. Die dopaminergen Zellen liegen, in größeren Gruppen im Protocerebrum links und rechts der Mittellinie. Vereinzelt Zellen finden sich im Bereich der Antenalloben. Eine aus einzelnen Zellen bestehende Gruppe liegt im Subösophagialganglion.

Auf Höhe der *Medulla* reihen sich einzelne Zellen auf, allerdings nicht so deutlich wie in Abbildung 3.9. Einzelne Axone ziehen von der *Medulla* zentripetal in Richtung der *Lamina* (rechter optischer *Lobus*). Über die *Lamina* des rechten optischen *Lobus* ist fein verteilt GFP-Expression zu erkennen, die sich deutlich vom Hintergrund abhebt. Hier scheint eine dünne Schicht kleiner GFP exprimierender Zellen zu liegen.

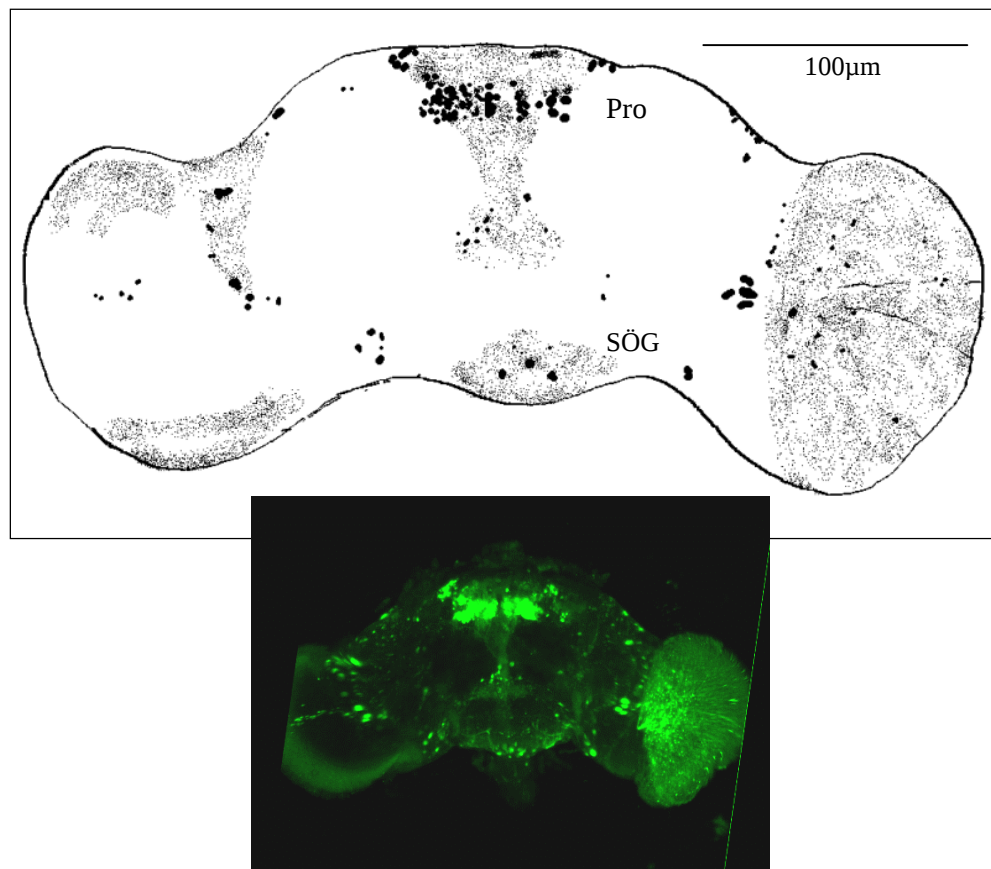


Abbildung 3.11 Zeichnerische Darstellung dopaminerge Neurone im Gehirn einer adulten *Drosophila melanogaster* von dorsal. Die Zeichnung wurde nach der unteren Abbildung erstellt. Dopaminerge Zellen sind als schwarze Punkte dargestellt. Außerdem verteilt sich GFP diffus über den rechten optischen *Lobus*, Teile des Protocerebrums und das Subösophagialganglion. Pro: Protocerebrum; SÖG: Subösophagialganglion.

3.5.4 Thorakales Verbundganglion

In Abbildung 3.12 ist die Lateralansicht des thorakalen Verbundganglions mit GFP fluoreszierenden Zellen zu sehen. Einzelne dopaminerge Zellen bzw. Zellgruppen liegen im Bereich der prothorakalen und mesothorakalen Neuromere. Sie sind in dieser Ansicht nach links gerückt. Weitere größere Zellgruppen liegen im caudalen Bereich des metathorakalen Neuromers und in dem Abschnitt, der den abdominalen Neuromere zugerechnet werden kann.

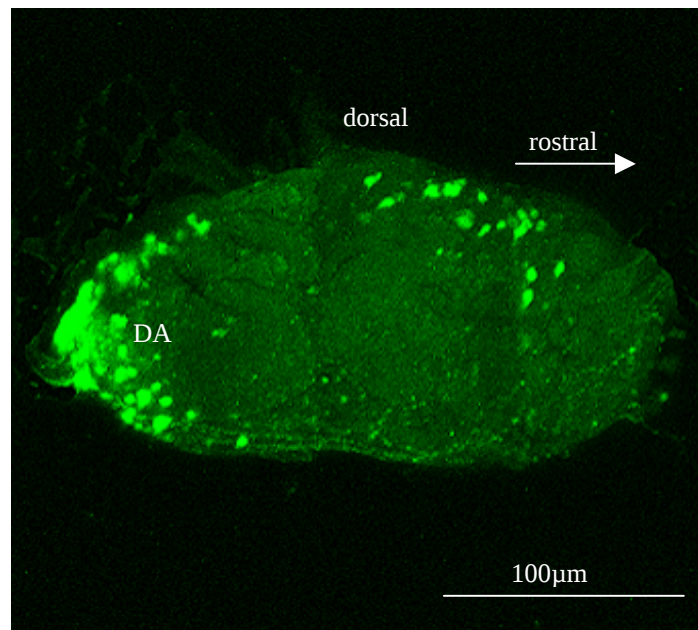


Abbildung 3.12 Lateralansicht des thorakalen Verbundganglions mit GFP fluoreszierenden dopaminergen Zellen. DA: Dopaminerge Zellen

Durch die Wahl der DDC-GAL4 Treiberlinie war gewährleistet, dass ausschließlich dopaminerge Neurone das GFP exprimierten. Es zeigt sich, dass dopaminerge Neurone sowohl in den Larvalstadien, als auch in den adulten Tieren vorhanden sind. In jedem Fall zeigen die dopaminergen Neurone eine distinkte Verteilung, die sich bei allen Präparationen wiederfinden ließen.

Interessant ist die Verschiebung dopaminerge Neurone im Gehirn, von lateral in den Larvalstadien, nach median in den Adultstadien. Auch im ventralen Ganglion gibt es eine Verschiebung der dopaminergen Neurone von lateral in den Larvalstadien, nach medial im adulten Tier.

GFP fluoreszierende Neurone ziehen im Gehirn von adulten Tieren von lateral nach median. In den Larvalstadien lassen sich die Axone dopaminerge Zellen, die segmental durch das Ventralganglion ziehen visualisieren.

3.6 Antikörpernachweis des Synucleins

Die Expression des Synuclein mit dem GAL4/UAS-System wurde durch einen immunhistochemischen Nachweis überprüft. Köpfe von Synuclein_{wt}-exprimierenden *Drosophila melanogaster* wurden zu den Untersuchungszeitpunkten (10/20/30 Tage usw.) in OCT eingebettet und bei -25°C mit Hilfe eines *Kryotoms* geschnitten. Es handelte sich um 12µm dicke Frontalschnitte. Nach dem Vorfixieren mit Paraformaldehyd und dem Blockieren erfolgte die Inkubation mit dem Anti-Synuclein_{wt}-Antikörper und dem sekundären, mit Alkalische-Phosphatase gekoppelten Antikörper. Die anschließende Färbereaktion dauerte 1,5 Stunden. Zur Kontrolle wurden Schnitte von Köpfen des gleich alten Wildtyps mit den gleichen Antikörpern inkubiert und der Färbereaktion unterzogen.

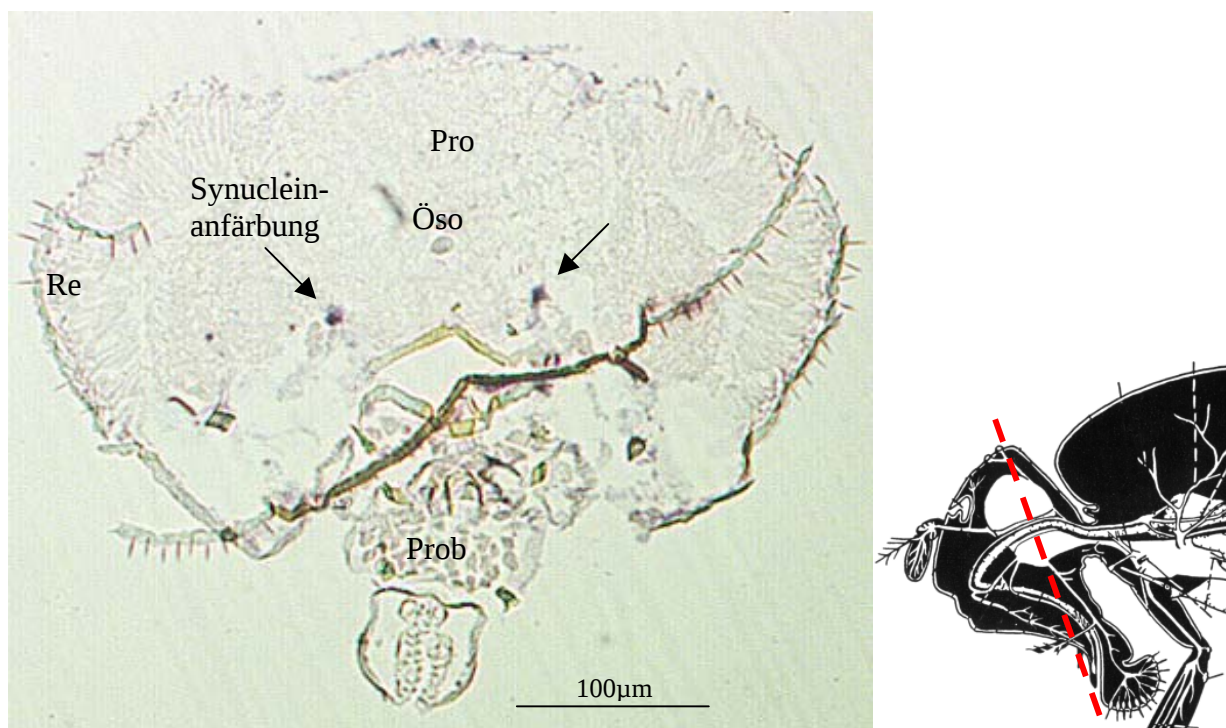


Abbildung 3.13 Bild links: Immunhistochemischer Nachweis des Synuclein_{wt} im Gehirn von *Drosophila melanogaster*, 50 Tage alt. 12µm Schnitt auf Höhe der Proboscis. Der Nachweis erfolgte mit Anti-Synuclein_{wt} Antikörpern. Die Färbereaktion dauerte 1,5 Stunden. Die angefärbten Stellen sind mit schwarzen Pfeilen gekennzeichnet. Figur rechts: Darstellung der Schnittebene (rot gestrichelt). Verändert nach Demerc (1950). La: *Lamina*; Öso: Ösophagus; Pro: Protocerebrum; Prob: Proboscis; Re: Retina.

Abbildung 3.13 zeigt den Frontalschnitt durch den Kopf einer Synuclein_{wt}-exprimierenden *Drosophila melanogaster* (50 Tage alt), auf Höhe der Proboscis. Gut zu erkennen sind die kreisförmig angefärbten Stellen, an denen sich die Anti-Synuclein_{wt} Antikörper angelagert haben (schwarze Pfeile). Sie liegen links und rechts unterhalb der Durchtrittsstelle des Ösophagus im Protocerebrum. Vereinzelt angefärbte Punkte am oberen Rand des Kopfes werden als unspezifisch angesehen.

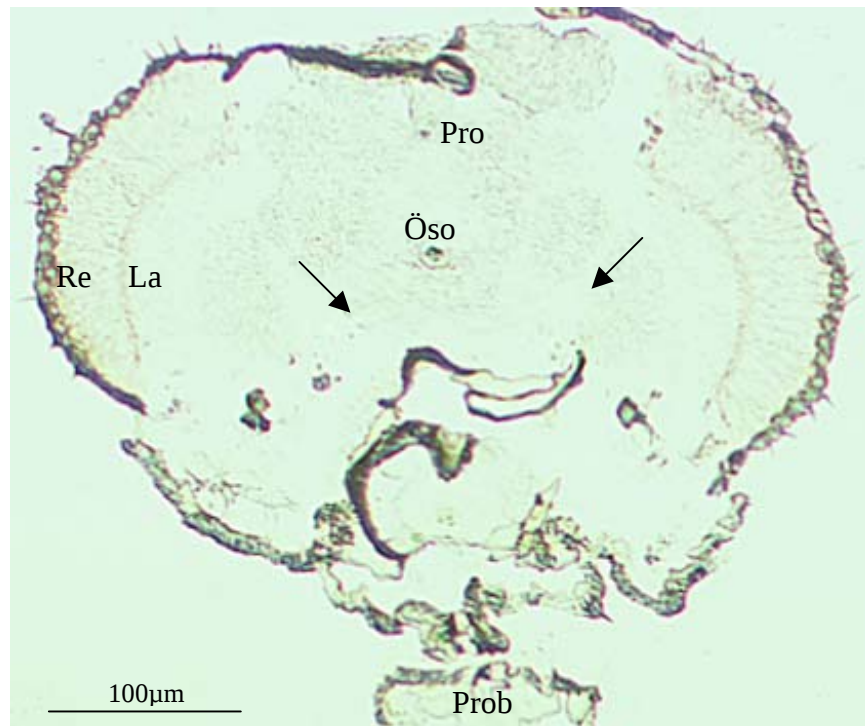


Abbildung 3.14 Kontrolle des immunhistochemischer Nachweis des Synuclein_{wt} im Gehirn von *Drosophila melanogaster*. 12µm Schnitt auf Höhe der Proboscis durch den Kopf einer 50 Tage alten Wildtyp *Drosophila melanogaster*. Nach Inkubation mit den Antikörpern und Färbereaktion zeigen sich keine Anfärbungen wie in Abbildung 3.14 (Markiert mit schwarzen Pfeilen). La: Lamina; Öso: Ösophagus; Pro: Protocerebrum.

In Abbildung 3.14 ist die Kontrolle des immunhistochemischen Nachweis des Synuclein_{wt} zu sehen. Es handelte sich dabei um einen 12µm Schnitt durch den Kopf einer Wildtyp *Drosophila melanogaster*. Die in Abbildung 3.13 mit schwarzen Pfeilen markierten Anfärbungen sind hier nicht zu sehen.

Die Vorfixierung mit Paraformaldehyd war unerlässlich, da bei den ersten Versuchen, ohne Vorfixierung sehr viele Schnitte bei den Blockierungs- und Waschschritten von den Objektträgern verloren gingen. Die Schnitte durften auch nicht zu dick sein, da die Eindringtiefe der Antikörper bei höchstens 5-10µm liegt. Die abschließende Färbereaktion wurde zeitlich in kurzen Abständen im Mikroskop kontrolliert, um ein Überfärben der Schnitte zu vermeiden. Leider ließ sich ein Einklappen der Cuticula nicht immer vermeiden, so dass der Schnitt manchmal zum Teil überdeckt ist.

In der Abbildung 3.15 ist ein weiteres Beispiel für den Vergleich Synuclein_{wt} exprimierender *Drosophila melanogaster* mit der Kontrollgruppe Wildtyp (beide 50 Tage alt). Die Schnittebene ist gegenüber obigen Abbildungen etwas verschoben (siehe schematische Abbildung rechts).

Die kreisförmigen Anfärbungen links und rechts unterhalb der Durchtrittsstelle des Ösophagus sind durch schwarze Pfeile gekennzeichnet.

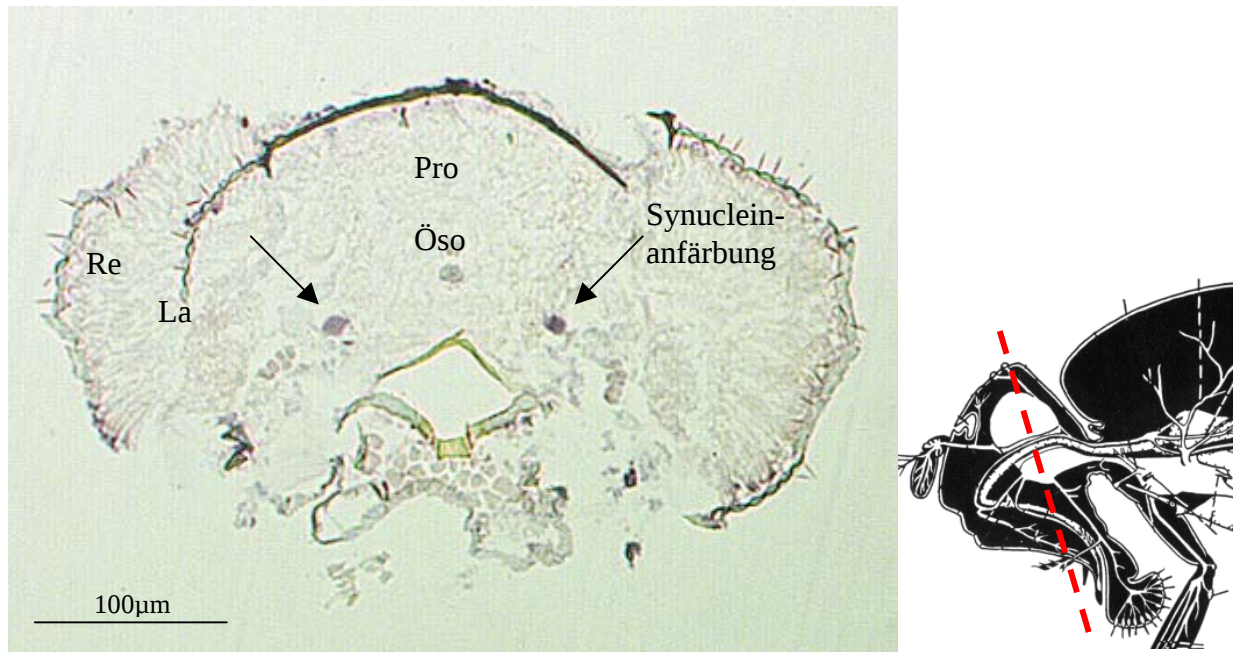


Abbildung 3.15 Bild links: Immunhistochemischer Nachweis des Synuclein_{wt} im Gehirn von *Drosophila melanogaster*, 50 Tage alt. 12µm Schnitt auf Höhe der Proboscis. Der Nachweis erfolgte mit Anti-Synuclein_{wt} Antikörpern. Die Färbereaktion dauerte 1 Stunde. Die angefärbten Stellen sind mit schwarzen Pfeilen gekennzeichnet. Figur rechts: Darstellung der Schnittebene (rot gestrichelt). Verändert nach Demerec (1950). La: Lamina; Öso: Ösophagus; Pro: Protocerebrum; Re: Retina.

In Abbildung 3.16 ist die Kontrolle des immunhistochemischen Nachweis des Synuclein gezeigt. Als Kontrolle dienen 50 Tage alte WT *Drosophila melanogaster*. Die Anfärbungen aus Abbildung 3.15 (schwarze Pfeile) sind hier nicht vorhanden.

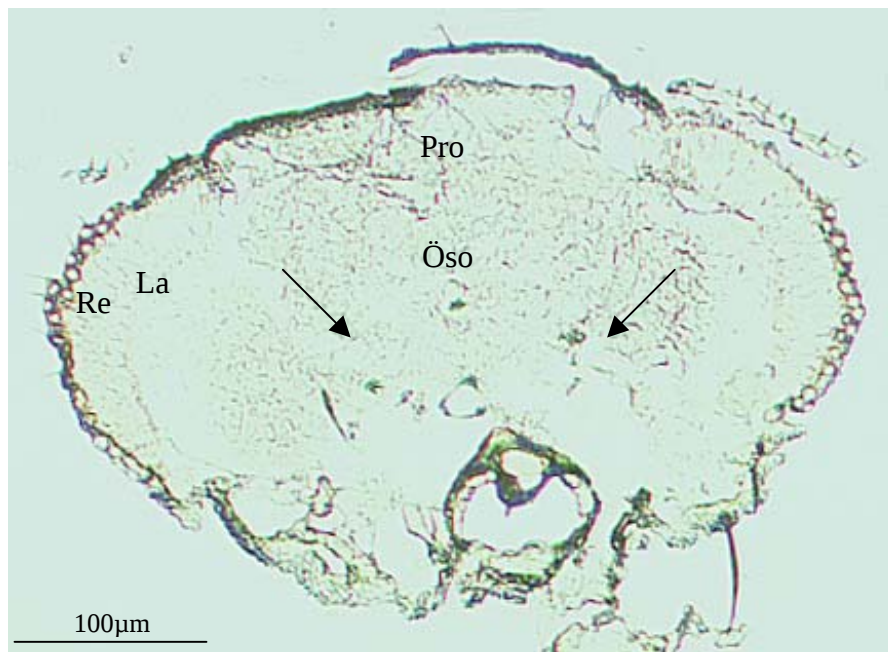


Abbildung 3.16 Kontrolle des immunhistochemischer Nachweis des Synuclein_{wt} im Gehirn von *Drosophila melanogaster*. 12µm Schnitt auf Höhe der Proboscis durch den Kopf einer 50 Tage alten Wildtyp *Drosophila melanogaster*. Nach Inkubation mit den Antikörpern und Färbereaktion zeigen sich keine Anfärbungen wie in Abbildung 3.15 (Markiert mit schwarzen Pfeilen). La: Lamina; Öso: Ösophagus; Pro: Protocerebrum; Re: Retina

3.7 Ergebnis der Verhaltensversuche

3.7.1 Ergebnis der Laufaktivität

Im folgenden sind die Ergebnisse zu den Verhaltensversuchen (Laufaktivität) mit den durch das GAL4-UAS-System erzeugten *Drosophila melanogaster* im Vergleich mit dem Wildtyp aufgeführt. Die Versuche wurden jeweils 5 mal pro Altersstufe (10-60 Tage) mit den gleichen Tieren wiederholt. Sie wurden zur Dokumentation gefilmt. Die Ergebnisse sind tabellarisch aufgetragen. Für die graphische Darstellung wurde der Prozentwert der nach oben gelaufenen Tiere errechnet. Für die statistische Auswertung der Versuche wurde der Quotient errechnet.

Tabelle 3.2 Darstellung der Ergebnisse aus den Verhaltensversuchen zur Laufaktivität der Synuclein exprimierenden Tiere im zeitlichen Verlauf. Die obere Zeile gibt den Versuchszeitpunkt und in Klammern die Anzahl der getesteten Tiere an. In der linken Spalte sind die Anzahl der Tiere oben, der Mittelwert, der Prozentwert, der Prozent Mittelwert, die Standardabweichung und der Quotient mit seinem Mittelwert aufgetragen. V: Versuch.

		WT 10Tg(23)	WT 20Tg(20)	WT 30Tg(20)	WT 40Tg(24)	WT 50Tg(21)	WT 60Tg(18)
Anzahl Tiere oben	V1	23	20	18	24	21	17
	V2	23	20	18	23	21	18
	V3	23	20	18	24	21	16
	V4	23	20	18	24	21	17
	V5	23	20	18	24	21	18
Mittelwert		23	20	18	23,8	21	17,2
Prozent	V1	100	100	90	100	100	94,4
	V2	100	100	90	95,8	100	100
	V3	100	100	90	100	100	88,8
	V4	100	100	90	100	100	94,4
	V5	100	100	90	100	100	100
Prozent Mittelwert		100	100	90	99	100	95,5
Standardabweichung		0	0	0	1,87	0	4,68
Quotient	V1	1	1	0,9	1	1	0,94
	V2	1	1	0,9	0,95	1	1
	V3	1	1	0,9	1	1	0,89
	V4	1	1	0,9	1	1	0,94
	V5	1	1	0,9	1	1	1
Quotient Mittelwert		1	1	0,9	0,99	1	0,954

Es zeigt sich, dass die Tiere aus der Kontrollgruppe Wildtyp (Tabelle 3.2) bis zum Ende der Versuchsreihe fast immer zu 100% (Prozent Mittelwert) nach oben gelaufen sind, mit einem kleinen Einbruch nach 30 Tagen. Außerdem sind nach 60 Tagen nur noch 95% der Tiere nach oben gelaufen. Die Standardabweichung für den Prozentwert ist für die Zeitpunkte 10, 20, 30 und 50 Tage gleich Null, aber auch für die Zeitpunkte 40 und 60 Tage gering.

Tabelle 3.3 Darstellung der Ergebnisse aus den Verhaltensversuchen zur Laufaktivität der Synuclein_{wt} exprimierenden Tiere im zeitlichen Verlauf. Die obere Zeile gibt den Versuchszeitpunkt und in Klammern die Anzahl der getesteten Tiere an. In der linken Spalte sind die Anzahl der Tiere oben, der Mittelwert, der Prozentwert, der Prozent Mittelwert, die Standardabweichung und der Quotient mit seinem Mittelwert aufgetragen. V: Versuch.

	Syn _{wt} 10Tg (18)	Syn _{wt} 20Tg (15)	Syn _{wt} 30Tg (35)	Syn _{wt} 40Tg (21)	Syn _{wt} 50Tg (23)	Syn _{wt} 60Tg (18)
Anzahl Tiere oben: V1	17	11	25	13	6	7
V2	18	11	26	13	11	9
V3	17	10	27	15	11	12
V4	17	10	30	15	9	11
V5	17	10	29	16	10	12
Mittelwert	17,2	10,4	27,4	14,4	9,4	9,75
Prozent V1	94,4	73,3	71,4	61,9	26	38,8
V2	100	73,3	74,2	61,9	47,8	50
V3	94,4	66,6	77,1	71,4	47,8	66,6
V4	94,4	66,6	85,7	71,4	39,1	61,1
V5	94,4	66,6	82,8	76,1	43,4	66,6
Prozent Mittelwert	95,52	69,28	78,24	68,54	40,82	56,62
Standardabweichung	2,50	3,66	5,93	6,35	9,03	12,04
Quotient V1	0,94	0,73	0,71	0,62	0,26	0,39
V2	1	0,73	0,74	0,62	0,48	0,5
V3	0,94	0,67	0,77	0,71	0,48	0,67
V4	0,94	0,67	0,86	0,71	0,39	0,61
V5	0,94	0,67	0,83	0,76	0,43	0,67
Quotient Mittelwert	0,952	0,694	0,782	0,684	0,408	0,568

Die Tiere aus der Versuchsgruppe (Tabelle 3.3), die das Synuclein_{wt} in den dopaminergen Zellen exprimieren, laufen nur zu Beginn der Untersuchung, nach 10 Tagen, zu 95% nach oben. Mit zunehmendem Lebensalter sinkt der prozentuale Anteil bis auf 40% (50Tage) ab, um danach wieder etwas anzusteigen (56% nach 60 Tagen). Beobachtet wurde, dass die Tiere, welche am Boden des Glases verbleiben, zwar versuchen heraufzulaufen, dies aber aufgrund gestörter Koordination nicht schaffen. Die Standardabweichung ist bis zum Versuchstag 40 gering, um danach bis zum Ende der Versuchsreihe etwas anzusteigen.

Die Tiere aus der Versuchsgruppe, die das mutierte Synuclein_{A30P} exprimieren (Tabelle 3.4) laufen zwar nach 10 Tagen zu 100% nach oben, die Laufaktivität nimmt dann aber bis zum Alter von 30 Tagen bis auf 40% ab, um dann noch einmal bis zum Alter von 45 Tagen auf 77% der untersuchten Tiere zuzunehmen. Die Standardabweichung schwankt zwischen Null und 11%.

Obwohl für alle zu vergleichenden Gruppen (Synuclein_{wt}, Synuclein_{A30P} und Wildtyp) mit einer gleichen Anzahl von Tieren begonnen wurde, hatten in der Versuchsgruppe Synuclein_{A30P} nach 45 Tagen keine Tiere mehr überlebt.

Tabelle 3.4 Darstellung der Ergebnisse aus den Verhaltensversuchen zur Laufaktivität der Synuclein_{A30P} exprimierenden Tiere im zeitlichen Verlauf. Die obere Zeile gibt den Versuchszeitpunkt und in Klammern die Anzahl der getesteten Tiere an. In der linken Spalte ist die Anzahl der Tiere oben, der Mittelwert, der Prozentwert, der Prozent Mittelwert, die Standardabweichung und der Quotient mit seinem Mittelwert aufgetragen. V: Versuch.

		A30P 10Tg (20)	A30P 20Tg (24)	A30P 30Tg (18)	A30P 45Tg (18)
Anzahl Tiere oben	V1	20	17	5	14
	V2	20	21	9	13
	V3	20	22	7	15
	V4	20	22	10	14
	V5	20	23	9	14
Mittelwert		20	21	8	14
Prozent	V1	100	70,8	27,7	77,7
	V2	100	87,5	50	72,2
	V3	100	91,6	38,8	83,3
	V4	100	91,6	55,5	77,7
	V5	100	95,8	50	77,7
Prozent		100	87,46	44,4	77,72
Standardabweichung		0	9,76	11,13	3,92
Quotient	V1	1	0,7	0,28	0,78
	V2	1	0,87	0,5	0,72
	V3	1	0,92	0,87	0,83
	V4	1	0,92	0,56	0,78
	V5	1	0,96	0,5	0,78
Quotient Mittelwert		1	0,874	0,542	0,778

Die Ergebnisse zur Untersuchung der Laufaktivität sind in Diagramm 3.1 dargestellt. Die Laufaktivität der Wildtyp Kontrollgruppe ist über den gesamten Untersuchungszeitraum nahezu 100%, während sie bei den beiden Synuclein exprimierenden Gruppen abnimmt.

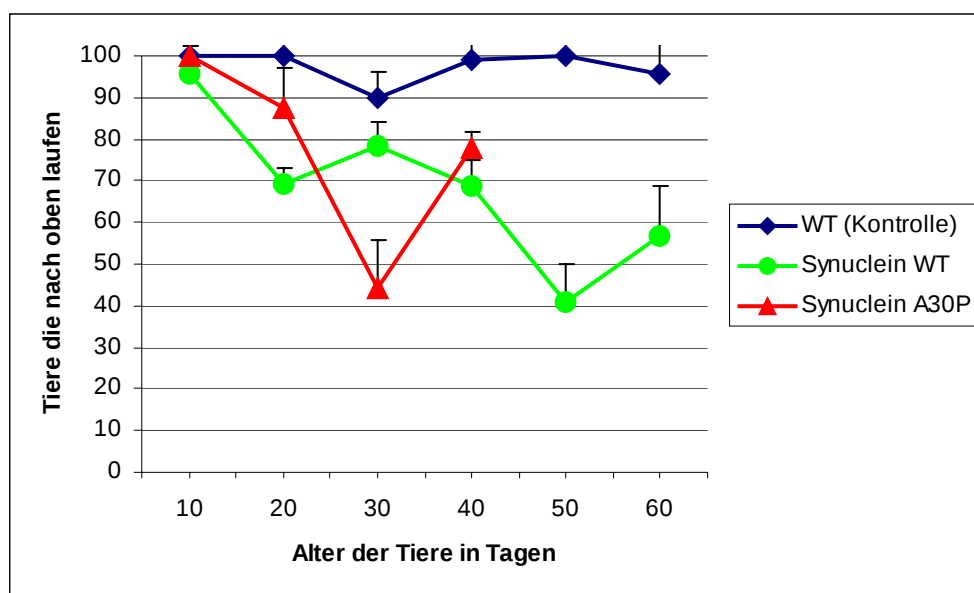


Diagramm 3.1 Darstellung zur Untersuchung der Laufaktivität der Synuclein exprimierenden *Drosophila melanogaster* (grüne und rote Linie) und der Kontrollgruppe (blaue Linie). Die Laufaktivität der Synuclein exprimierenden Tiere nimmt mit zunehmenden Lebensalter ab, während sie in der Kontrollgruppe nahezu gleich bleibt.

Signifikanztest

Die statistische Auswertung erfolgte mit dem Statistikprogramm *SigmaStat*. Als Ausgangswerte wurden die Mittelwerte der Quotienten eingegeben. Die Werte sind Normalverteilt mit $P: 0,093$. Der durchgeführte F-Test ergab, dass es einen signifikanten Unterschied gibt zwischen den Mittelwerten der zu vergleichenden Gruppen. Um die Gruppen zu ermitteln, die sich signifikant von den anderen unterscheiden wurde ein paarweiser mehrfach Vergleich nach Tukey durchgeführt (ANOVA *on Ranks*). Es ergab sich, dass die Kontrollgruppe sowohl von der Synuclein exprimierenden Gruppe Synuclein_{wt}, als auch von der Gruppe Mutante A30P signifikant unterscheidet, aber die beiden Gruppen Synuclein_{wt} und die Synuclein Mutante A30P sich nicht signifikant voneinander unterscheiden.

3.7.2 Ergebnis der Ruheaktivität

Zur Messung der Ruheaktivität wurden die gleichen Tiere aus der Untersuchung der Laufaktivität benutzt. Sie verblieben für 10min in Ruhe in dem Beobachtungsglas und wurden dann für einen Zeitraum von 90s beobachtet und gefilmt. Gezählt wurde, wie viele Tiere sich im Beobachtungszeitraum von dem Punkt, an dem sie sich zu Anfang aufgehalten haben, wegbewegt haben. Die Ergebnisse sind tabellarisch und graphisch aufgetragen (Tabelle 3.5; Diagramm 3.2). Im Gegensatz zur Untersuchung der Laufaktivität werden hier nicht nur die Koordinationsstörungen untersucht, sondern der Antrieb bzw, das Initiieren von Bewegungen.

Tabelle 3.5 Darstellung der Versuche zur Ruheaktivität der Synuclein exprimierenden *Drosophila melanogaster* und der Kontrollgruppe. In der oberen Zeile ist das Lebensalter in Tagen angegeben. In den Spalten ist die Anzahl der Tiere aus den einzelnen Versuchsgruppen angegeben, die sich im Beobachtungszeitraum (90s) bewegt haben und die Anzahl der getesteten Tiere in Klammern. Darunter ist jeweils die Prozentzahl angegeben.

	10 Tage	20 Tage	30 Tage	40 Tage	50 Tage	60 Tage
Wildtyp (Kontrolle)	23 (23)	20 (20)	18 (20)	22 (24)	21 (21)	17 (18)
Prozentsatz	100	100	90	92	100	94
Synuclein_{wt}	5 (18)	8 (15)	10 (35)	9 (21)	5 (23)	4 (18)
Prozentsatz	28	53	29	43	22	22
Synuclein_{A30P}	19 (20)	19 (24)	6 (18)	8 (18)		
Prozentsatz	95	79	33	44		

In der Kontrollgruppe Wildtyp bewegen sich während des Beobachtungszeitraums (90s) in allen Altersstufen zwischen 90% und 100% der beobachteten Tiere. Es ergibt sich keine besondere Tendenz, denn auch nach 50 Tagen haben sich 100% der Tiere bewegt. Bei den Synuclein_{wt} exprimierenden Tieren ist der Prozentsatz der Tiere, die sich ohne einen ersichtlichen Anlass im Glas bewegen von Beginn der Untersuchung (10 Tage) an, niedrig.

Tendenziell wird der Prozentsatz der Tiere die sich bewegen immer geringer. Allerdings gibt es hier einen Einbruch in dieser Tendenz bei 20 und 40 Tagen. Für die Synuclein_{A30P} exprimierende Linie ergibt sich die deutliche Tendenz, dass sich die Tiere immer weniger bewegen, mit einem Aufschwung nach 45 Tagen. Da die Versuche jeweils nur einmal durchgeführt wurden, wurde keine Standardabweichung berechnet bzw. kein Signifikanztest durchgeführt.

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass sich sowohl bei der Untersuchung der Laufaktivität, als auch der Ruheaktivität eine negative Tendenz bezüglich der Koordination von Bewegungen (Laufaktivität) als auch dem Antrieb sich zu bewegen (Ruheaktivität) für die Synuclein exprimierenden Tiere ergibt.

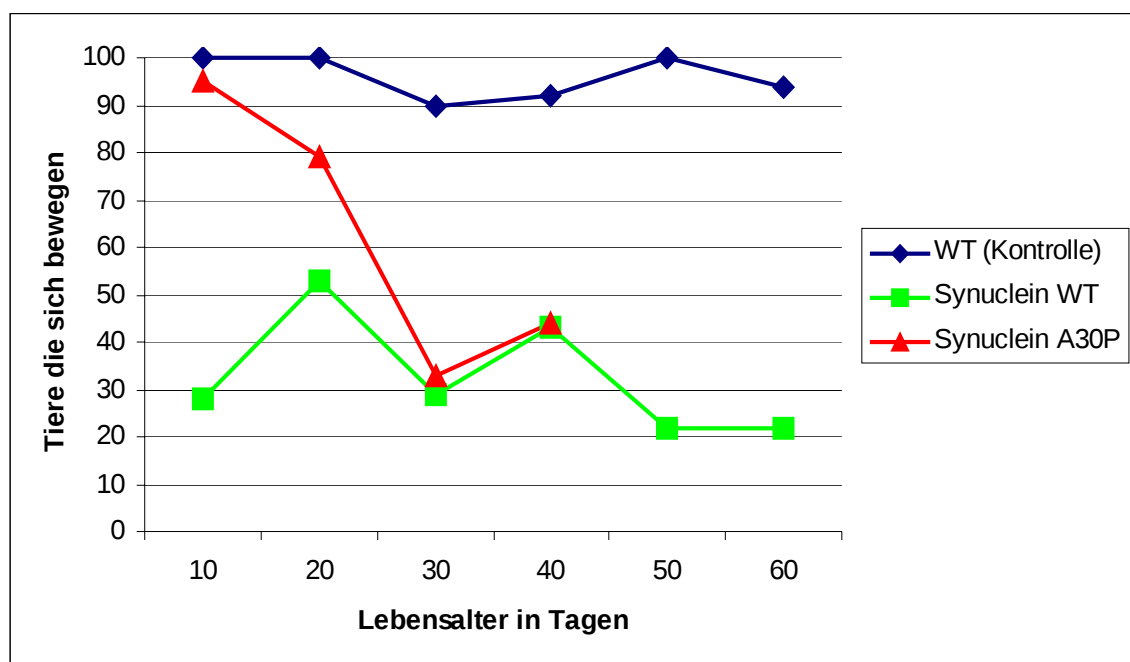


Diagramm 3.2 Darstellung zur Untersuchung der Ruheaktivität der Synuclein exprimierenden *Drosophila melanogaster* (grüne und rote Balken) und der Kontrollgruppe (blaue Balken). Die Ruheaktivität der Synuclein exprimierenden Tiere nimmt mit steigendem Lebensalter ab, während sie in der Kontrollgruppe nahezu konstant bleibt.

3.8 Überprüfung der Hybridisierungen

3.8.1 cDNA-Micorarrays

Im Verlauf dieser Arbeit wurden insgesamt 50 Hybridisierungen mit fluoreszenzmarkierter Proben-ccDNA vorgenommen, davon 25 auf dem *Canada-12k-Drosophila-Microarray*. Die anderen 25 Hybridisierungen wurden auf dem *Canada-7k-Drosophila-Microarray* oder dem „*Selfmade-Signaltransduktions-Microarray*“ durchgeführt. Der weitaus größte Teil der Hybridisierungen diente dem Optimieren des methodischen Vorgehens. Schließlich konnte auf 21 *Canada-12k-Drosophila-Microarrays* eine Hybridisierung vorgenommen werden. Von diesen 21 Arrays wurden 7 (Tabelle 3.6) zur Auswertung herangezogen. Um an einem Beispiel für das gesicherte Daten vorliegen zu zeigen, dass sich das in dieser Arbeit gewählte Vorgehen

soweit etablieren lässt, dass verlässliche Daten gewonnen werden können wurde der Vergleich zwischen Retina Wildtyp und Lamina Wildtyp durchgeführt.

Die Hybridisierung von Probenmaterial aus dopaminergen Zellen soll zum einen zeigen, dass mit dem GAL4/UAS-System eine ausreichende Zahl GFP-exprimierender Zellen durch FACS (Durchflusszytometrie) isoliert werden kann, um Expressionsmusteranalysen durchführen zu können. Zum anderen soll ein Überblick über das Genexpressionsmuster dopaminerger Zellen gewonnen werden.

Zum Vergleich Synuclein exprimierender *Drosophila melanogaster* mit der Kontrollgruppe wurden Hybridisierungen mit Probenmaterial durchgeführt, das aus 20, 50 und 60 Tage alten Gehirnen von Synuclein_{wt} exprimierenden und dem als Kontrollgruppe dienenden Wildtyp gewonnen wurde. Hinzu kommt ein Vergleich, zwischen Probenmaterial dass aus 45 Tage alten Gehirnen der Synuclein_{A30P} exprimierenden Tiere und der Kontrollgruppe isoliert wurde. Zur Absicherung dieses Vergleichs wurde mit Probenmaterial aus 60 Tage alten Synuclein_{wt} exprimierenden Tieren und der Kontrollgruppe ein sogenannter *Dye-Flip* durchgeführt. Das heißt zur Hybridisierung wurden ccDNA eingesetzt, bei der die Farben der Fluoreszenzmoleküle gegenüber dem vorhergehenden Versuch ausgetauscht wurden.

Tabelle 3.6 Die für die Untersuchungen verwendeten *Canada-12k-Drosophila-Microarrays*. Aufgeführt sind die *Arraynummern*, die auf diesen cDNA-*Microarrays* hybridisierten Proben und die für die jeweiligen Proben verwendeten Fluoreszenzfarbstoffe.

Arraynummer	Vergleich	Fluoreszenzmoleküle
12926910	Retina Wildtyp gegen Lamina Wildtyp	Alexa Dye 555
		Alexa Dye 647
12926912 12926912	GFP-DDc-Zellen	Alexa Dye 647
		Alexa Dye 647
12926906	Synuclein _{wt} G 20Tg gegen Wildtyp G 20T	Alexa Dye 555
		Alexa Dye 647
12926907	Synuclein _{wt} G 50Tg gegen Wildtyp G 50Tg	Alexa Dye 555
		Alexa Dye 647
12926953	Synuclein _{wt} G 60Tg gegen Wildtyp G 60Tg	Alexa Dye 647
		Alexa Dye 555
12885165	Synuclein _{wt} G 60Tg gegen Wildtyp G 60T Dye-Flip	Alexa Dye 555
		Alexa Dye 647
12917951	Synuclein _{A30P} 45Tg gegen Wildtyp G 50Tg	Alexa Dye 555
		Alexa Dye 647

Die mRNA wurde aus den zu vergleichenden Gewebe isoliert, in eine Einzelstrang-cDNA umgeschrieben und durch PCR amplifiziert. Aus der amplifizierten cDNA wurde mit Hilfe der SP6-Polymerase eine cRNA synthetisiert und aus dieser wiederum eine ccDNA die mit Fluoreszenzfarbstoffen markiert wurde. Für das spätere Auslesen der hybridisierten cDNA-

Microarrays erwies es sich als vorteilhaft, die Zeit für den Markierungsschritt bis auf 4 Stunden auszudehnen, da so maximale Intensitäten erzielt werden konnten.

Nach dem Reinigen und Füllen der Markierungsreaktion wurde das Präzipitat mit Wasser und dem Hybridisierungspuffer (DIG *EasyHyb*) aufgenommen. Die Hybridisierung erfolgte bei 37°C für 16 Stunden. Die Waschschrte wurden bei 55°C durchgeführt. Wichtig dabei war das häufige Bewegen der Glasgefäße, um eine mögliche Verunreinigung der Arrays mit nicht inkorporierten Farbstoffmolekülen zu minimieren.

Beispielhaft für eine Hybridisierung wird in Abbildung 3.17 das cDNA-Microarray 12926910 (*Canada-12k-Drosophila-Microarray*) abgebildet.

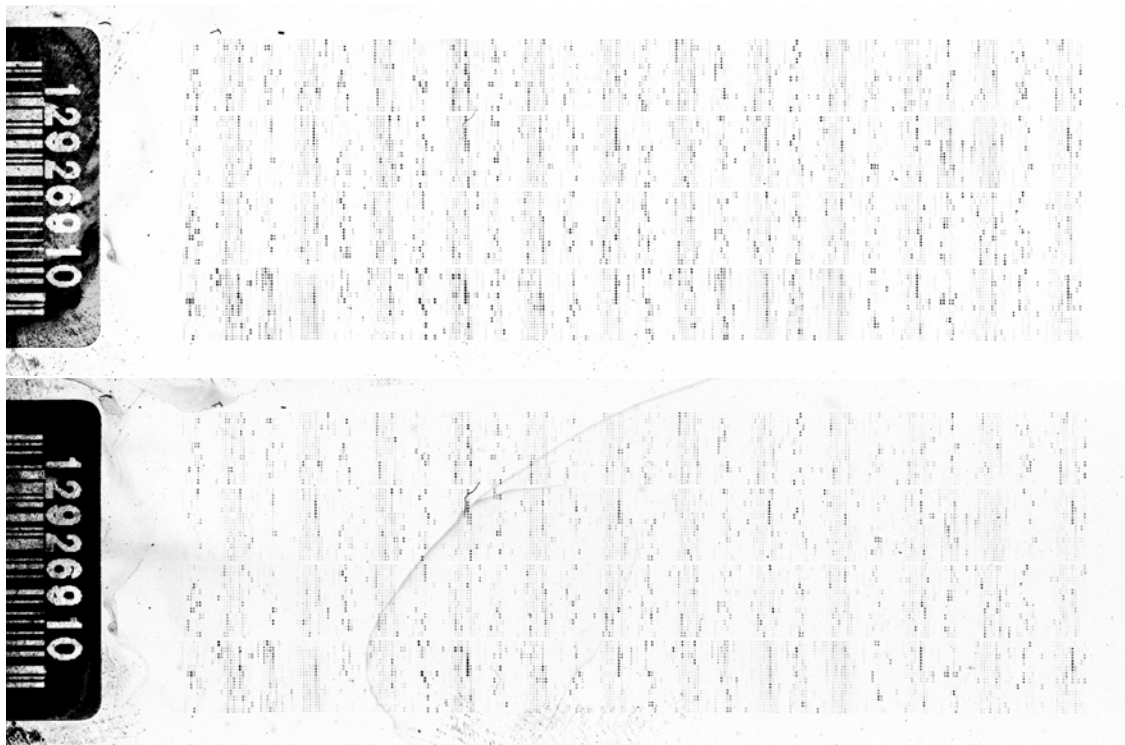


Abbildung 3.17 Array 12926910 hybridisiert mit Proben aus Retina Wildtyp (oben) markiert mit Alexa Fluor 555 und Lamina Wildtyp (unten) markiert mit Alexa Fluor 647. Die Arrays wurden aufgenommen am 16.9.04 mit dem Array-Scanner GMS 418 von Genetic MicroSystemsInc. Die Aufnahme erfolgt in 65536 Farbstufen mit einer 16bit Auflösung. Das erzeugte Bild hat eine Dimension von 2,2 x 6,81cm mit einer Pixelgröße von 0,01 x 0,01 mm Die Darstellung erfolgt in Graustufen.

Das cDNA-Microarray wurde mit Proben die aus Retina Wildtyp und Lamina Wildtyp hybridisiert. Die Darstellung erfolgt in Graustufen, da nur die Intensitäten, welche zu den einzelnen Punkten gehören, für die Auswertung von Interesse sind, nicht aber deren Farbe. Dieses cDNA-Microarray zeigt für beide Fluoreszenzfarbstoffe eine nahezu gleiche Intensität (Abbildung 3.17). Ein Hintergrund, verursacht durch Staub, ausgefallene Salze oder nicht inkorporierte Farbstoffmoleküle ist kaum vorhanden. Kleine Verunreinigungen, wie der schwache Strich auf dem unten dargestellten Array, beeinträchtigen die Auswertung nicht, da sie durch die Intensitäten der hybridisierten Punkte überdeckt werden. Die auf den cDNA-

Microarrays angebrachten Strichcodes dienen der automatisierten Auswertung und Wiedererkennung.

3.8.2 Der Korrelationsplot

Der Korrelationsplot (Abbildung 3.18) gehört zum *Array* 12926951 (nicht gezeigt). Die in dem Korrelationsplot aufgetragenen Punkte repräsentieren die Intensitätswerte der auf dem *Array* hybridisierten Punkte.

Der Korrelationsplot gibt einem zum einen Auskunft über die Verteilung der Intensitätswerte der einzelnen Hybridisierungsereignisse auf dem Arrays und zum anderen über das Verhältnis der beiden Intensitätswerte die einem Punkt auf dem Array zugeordnet werden. In dem Beispiel-*Array* liegt die maximale Intensität die einem Punkt (in Abbildung 3.18, grün eingekreist) zugeordnet werden kann bei 100 für das zum Vergleich herangezogene sogenannte *Client-Array* (y-Achse) und bei ca. 50 für das dem Vergleichs dienende sogenannte *Master-Array* (x-Achse). Das Verhältnis der Intensitäten hat also den Faktor von ca. 0,5. Dies wird aber von dem Computerprogramm durch die Normalisierung kompensiert, so dass die Intensitäten vergleichbar bleiben.

Je weiter ein Punkt von der gedachten Winkelhalbierenden entfernt ist, desto höher ist seine Intensität entweder auf dem *Master-Array*, oder auf dem *Client-Array*. Diese Punkte werden als differentiell angesehen. Die berechnete Ratio ist dann, entweder $<0,5$ oder >2 .

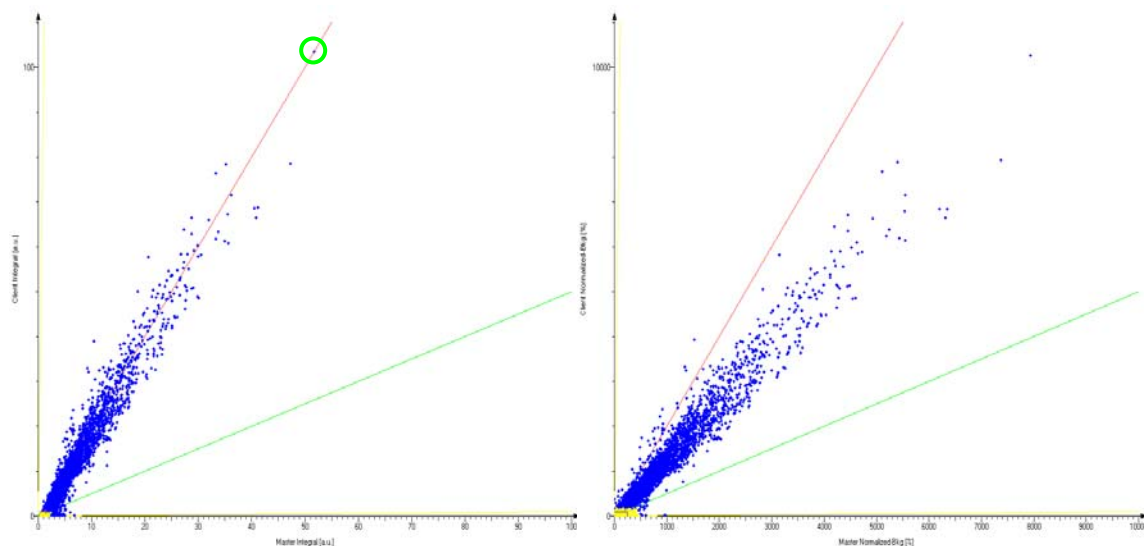


Abbildung 3.18 Korrelationsplot zum Vergleich der Wildtyp Retina gegen die Wildtyp Lamina (Array 12926951). Vor und nach der Normalisierung. Auf der x-Achse ist die Intensität der Hybridisierungen für Wildtyp (Master-Array) gegen Synuclein_{A30P} 45Tage (Client-Array; y-Achse) aufgetragen. Der Hauptteil der Hybridisierungen hat Intensitäten von 20 und darunter. Durch die grüne bzw. rote Linie sind die Hybridisierungen abgegrenzt, die nach Berechnung der Ratio als differentiell angesehen werden.

3.8.3 Dye-Flip

Zum Nachweis der Reproduzierbarkeit der Hybridisierungen wurde mit Probenmaterial das aus 60 Tage alten Wildtypgehirnen und aus 60 Tage alten Synuclein_{wt} Gehirnen isoliert wurde, ein sogenannter *Dye-Flip* (Farbwechsel) durchgeführt. Dabei wurden die synthetisierten ccDNA der gleichen Probe einmal mit dem Fluoreszenzfarbstoff Cy3 und ein anderes mal mit dem Fluoreszenzfarbstoff Cy5 markiert und jeweils mit der zu vergleichenden Probe auf *Arrays* hybridisiert.

Die Versuche wurden unter gleichen Bedingungen für die Synthese der ccDNA, die Markierung, die Hybridisierung und die Waschschrte durchgeführt. Die Synthese der ccDNA, zum Einbau der Amino-Allyl modifizierten dUTP wurde über 2 Stunden bei 42°C durchgeführt, mit anschließender Hydrolyse der cRNA. Die ccDNA wurde für 4 Stunden mit den Fluoreszenzfarbstoffen bei Raumtemperatur markiert.

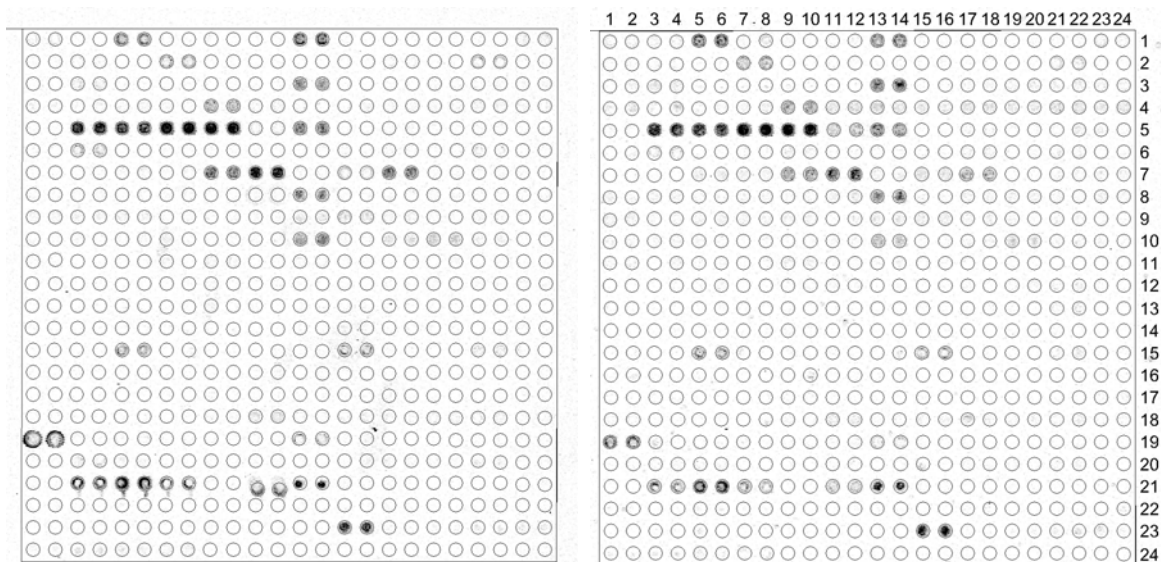


Abbildung 3.19 Darstellung eines Ausschnitts aus dem *Dye-Flip* für die *Arrays* 128851 (links) und 12917953 (rechts). Beide cDNA-Microarrays wurden mit Proben aus 60 Tage alten Wildtyp Gehirnen hybridisiert. In 128851 wurde die ccDNA mit dem Fluoreszenzfarbstoff Cy3 markiert in 12917953 mit Cy5. Beide Hybridisierungen zeigen trotz unterschiedlicher Farbstoffmarkierung ein gleiches Hybridisierungsmuster mit annähernd gleichen Intensitäten für die Hybridisierungsergebnisse.

Nach dem Reinigen und Füllen wurde das Material in Hybridisierungspuffer aufgenommen und für 16 Stunden bei 37°C hybridisiert. Die cDNA-Microarrays wurden 3 mal mit SSC bei 53°C gewaschen und mit dem ArrayWoRx® Multi-Format Reader ausgelesen.

Auf beiden *Arrays* (Abbildung 3.20) ergaben sich unter gleichen Randbedingungen eine Anzahl von ca. 4100 Hybridisierungsergebnissen. Die Auszählung von 1000 Hybridisierungsergebnissen ergab eine Übereinstimmung von 95,3%.

Die Ausschnitte aus beiden cDNA-Microarrays (Abbildung 3.19) zeigen zum einen das gleiche Hybridisierungsmuster und zum anderen für die Hybridisierungsergebnisse eine annähernd gleiche Intensität. Das gleiche Ergebnis ergibt sich nicht nur aus der Abbildung, sondern auch

aus der Tabelle der gemessenen Intensitäten (Tabelle 3.7). Auch hier ergeben sich für gleiche Hybridisierungsereignisse nahezu identische Ratios. Es konnte also gezeigt werden dass zwei unterschiedliche Versuchsansätze annähernd das gleiche Ergebnis haben, was für die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse von großer Bedeutung war.

Tabelle 3.7 Vergleich der Ratios zwischen den *Arrays* 1288512 und 12917953. Aufgeführt ist die Positionsinformation (*Label*), der Name der Gene und die Ratio. Für gleiche Positionen auf dem *Array* ergeben sich in zwei verschiedenen Versuchen gleiche Ratios für gleiche Proben.

	<i>Array</i> 128851		<i>Array</i> 12917953	
<i>Label</i>	Name	Ratio	Name	Ratio
4-5,1	CG4817	0,2	CG4817	0,2
4-5,2	CG4817	0,2	CG4817	0,2
4-5,3	CG11142	16,4	CG11142	14,9
4-5,4	CG11142	16,3	CG11142	13,9
4-5,5	CG13603	13,8	CG13603	12,5
4-5,6	CG13603	12,7	CG13603	11,6
4-5,7	CG11315	29	CG11315	23,1
4-5,8	CG11315	27,9	CG11315	24,3
4-5,9	CG9538	22,5	CG9538	19,8
4-5,10	CG9538	23,8	CG9538	18,7
4-5,11	CG6164	1	CG6164	1,2
4-5,12	CG6164	0,9	CG6164	1,1
4-5,13	LYS_con10	8,4	LYS_con10	7,8
4-5,14	LYS_con10	8,5	LYS_con10	6
4-5,15	RPL32	0,1	RPL32	0,1
4-5,16	RPL32	0,1	RPL32	0,1
4-5,17	CG10241	0,3	CG10241	0,3
4-5,18	CG10241	0,3	CG10241	0,3
4-5,19	CG32064	0,2	CG32064	0,2
4-5,20	CG32064	0,2	CG32064	0,2
4-5,21	CG3174	0,2	CG3174	0,3
4-5,22	CG3174	0,3	CG3174	0,7
4-5,23	CG18374	0,1	CG18374	0,4
4-5,24	CG18374	0,2	CG18374	0,2

3.8.4 Überprüfung der Vorgehensweise

Der Vergleich der Retina Wildtyp mit der Lamina Wildtyp diente dazu zu überprüfen, ob die in dieser Arbeit, abweichend vom *Canada-12k-Drosophila-Microarray* Standardprotokoll, gewählte Vorgehensweise geeignet ist, differentielle Genexpression nachzuweisen. Dazu wurden Proben aus Geweben, wie Retina und Lamina, für die schon viele Datenbankeinträge vorhanden sind und die schon durch Untersuchungen in ihrem Expressionsort (Retina) bestätigt sind zur Hybridisierung gebracht. Die Hybridisierungen wurden unter den gleichen Bedingungen durchgeführt, wie sie für die weiteren Untersuchungen auf dem *Canada-12k-Drosophila-Microarray* galten. Diese Auswertungen wurden mit den bestehenden Datenbankeinträgen verglichen, um zu zeigen, dass Experiment und Datenbanken kohärent

sind. Für diesen Vergleich wurden differentiell in der Retina exprimierte Gene untersucht. Als differentiell exprimiert wurden Gene angesehen, deren Ratio unter 0,5 war.

Tabelle 3.8 In Tabelle 3.8 wird das Ergebnis des Vergleichs zwischen der Retina Wildtyp und der Lamina Wildtyp gezeigt. Es werden die differentiell in der Retina gefundenen Gene dargestellt. Aufgeführt sind die Koordinaten auf dem *Canada-12k-Drosophila-Microarray* (Label), die CG Nummer bzw. RH oder RE Nummer, die Ratio des Vergleichs der Hybridisierungen, der Name und eine kurze Beschreibung der Funktionen bzw. wenn das Gen nicht bekannt war möglicher Homologien zu bekannten Genen (grau hinterlegt).

	Label	CG-Nummer	Ratio	Name	Funktionen
1	12-16,6	RH01044	0,04		Homologien zu Rh2 CG16740; ninaE CG4550; Rh6 CG5192
2	18-17,24	CG8472	0,31	Calmodulin	Bindet Calcium Ionen, inaktiviert Metarhodopsin
3	21-20,12	CG3189	0,41	Dpit47	Interagiert mit der DNA-Polymerase
4	28-17,11	CG15342	0,34	Stardust	Guanylate Kinase Aktivität
5	31-17,1	CG5962	0,01	Arrestin2	Bindet an Metarhodopsin
6	35-2,18	CG3694	0,05	G protein γ 30A	GTPase Aktivität in Zusammenhang mit Phototransduktion
7	35-7,14	CG7109	0,44	Microtubule star	R7 Zellentwicklung; Serine/Threonine Protein Phosphatase Aktivität
8	44-16,19	CG8663	0,36	Nervana 3	
9	46-14,23	RE50740	0,04		Homologien zu pit CG6375
10	46-18,24	CG32158	0,45		Adenylat Cyclase Aktivität
11	47-2,10	CG11081	0,03	Plexin A;	Transmembran-Rezeptor Protein-Tyrosine-Kinase Aktivität
12	48-3,10	CG1822	0,18	bifocal	Protein-Phosphatase 1 Aktivität

Bei dem Vergleich der als differentiell erkannten Gene mit der Datenbank www.flybase.bio.indiana.edu zeigt sich, dass sie in direktem bzw. indirektem Zusammenhang stehen mit der Photorezeption, oder in Photorezeptorzellen lokalisiert wurden (Tabelle 3.8). So hat der Klon RH01044 Homologien zum Gen ninaE (Rhodopsin) welches wiederum in der Rezeptorzelle R7, aber auch in anderen Rezeptorzellen nachgewiesen werden konnte. Ebenso wie das Gen CG1822, das in der Rezeptorzelle R8 gefunden wurde. Das Gen 8472 (Calmodulin) bindet an Metarhodopsin und ist daher eindeutig den Photorezeptorzellen in der Retina zuzuordnen, genauso wie das Gen CG5962 (Arrestin2). Auch das Gen 3694 (G protein γ 30A) hat eine GTPase-Funktion, die mit Phototransduktion in Verbindung gebracht wird. Andere Gene, wie CG15432 (Stardust) oder CG7109 lassen sich durch ihre Rolle, die sie bei der Entwicklung der Photorezeptorzellen haben, der Retina zuordnen.

In diesem Vergleich konnte gezeigt werden, dass das in dieser Untersuchung gewählte vorgehen geeignet war, differentielle Genexpression nachzuweisen.

3.9 FACS-Analyse dopaminerger Zellen

3.9.1 Scatter-Plot und Hybridisierung

Mit Hilfe des GAL4/UAS-Systems wurden *Drosophila melanogaster* gekreuzt, die GFP in ihren dopaminergen Zellen synthetisierten und somit mittels der Durchflusszytometrie (FACS-Analyse) sortiert werden konnten. Es sollte gezeigt werden, ob aus den sortierten Zellen ausreichend mRNA isoliert werden konnte, um Hybridisierungen auf dem *Canada-12k-Drosophila-Microarray* durchführen zu können. Außerdem sollte ein Überblick über das Genexpressionsmuster der dopaminergen Zellen im Gehirn von *Drosophila melanogaster* gewonnen werden.

Nach dem Kreuzen wurde aus adulten Tieren das Gehirn präpariert und unter Fluoreszenzanregung mit dem Mikroskop kontrolliert, ob GFP-fluoreszierende Zellen im Präparat zu sehen waren. Wenn die Kreuzung erfolgreich war, wurden 20-25 Gehirne präpariert und in L15-Zellkulturmedium einem Verdau aus Collagenase/Dispase unterzogen. Nach dem Verdau wurden die Gehirne in L15 trituriert, um die Zellen zu dissoziieren. Das Trituieren erfolgte in absteigender Reihenfolge mit 100µl, 10µl Pipettenspitzen und zum Schluss mit ausgezogenen Pasteur Glaspipettenspitzen. Die Dissoziation wurde im Mikroskop kontrolliert. Falls die Dissoziation ausreichend war, wurden die Zellen mittels FACS sortiert. GFP fluoreszierende Zellen werden dabei im Durchflusszytometer detektiert, elektrisch geladen und mit einem elektrischen Feld aus einem Durchfluss gesammelt.

Vor dem Beginn der FACS-Analyse wurde ein sogenannter Scatter-Plot (Abbildung 3.20) erstellt. Er gibt Auskunft über die Größe und Fluoreszenz der dissoziierten Zellen. Hier wurde auch die auszusortierende Zellpopulation ausgewählt. Durch dieses Vorgehen war gewährleistet, dass die Zellen weder zu groß noch zu klein waren, und das ausschließlich fluoreszierende Zellen aussortiert wurden. Von den insgesamt 2.000.000 sortierten Zellen wurden ca. 3% als GFP-leuchtend erkannt und aussortiert.

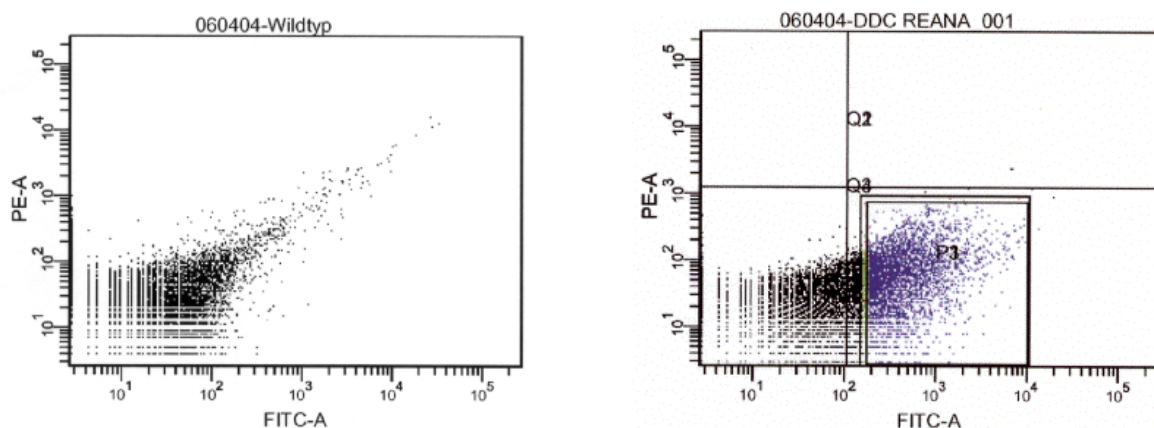


Abbildung 3.20 Scatter Plot FACS-Analyse. Auf der x-Achse ist die Stärke der Fluoreszenz dargestellt (FITC-A), auf der y-Achse der Durchmesser der Zellen (PE-A). Rechts ist die Analyse von Nervenzellen aus *Drosophila melanogaster* Wildtyp zu sehen, links die Auswahl der zu sortierenden GFP-leuchtenden Zellpopulation aus der GAL4/UAS-Linie. Das Fenster P3 wählt die Zellen mit einer relevanten Fluoreszenz aus.

Zur Bestimmung der für die Analyse relevanten Fluoreszenz wurden zuvor Nervenzellen aus *Drosophila melanogaster* Wildtyp analysiert. Für die Analyse der GFP fluoreszierender Zellen aus der GAL4/UAS-Linie wurden nur solche Zellen ausgewählt, deren Fluoreszenz oberhalb der Emission der Wildtyp Tiere lag (Abbildung 3.20, rechts). Es handelt sich bei dieser Emission der Nervenzellen aus dem Wildtyp, um eine Autofluoreszenz, deren Stärke unterhalb der Fluoreszenz des GFP liegt.

Die sortierten Zellen wurden auf Eis gelagert, lysiert und die mRNA isoliert. Mit der isolierten mRNA wurde wie im Material und Methoden Teil beschrieben verfahren und Hybridisierungen auf dem *Canada-12k-Drosophila-Microarray* durchgeführt.

Es zeigte sich, dass mit der FACS-Analyse eine ausreichende Menge GFP fluoreszierender, dopaminerger Zellen sortiert werden konnte, um mit der daraus isolierten mRNA zu verwertbaren Ergebnissen bei Hybridisierungen zu kommen. Wie Abbildung 3.21 zeigt, konnte aus den sortierten Zellen soviel mRNA isoliert werden, dass nach den folgenden Arbeitsschritten verwertbare Hybridisierungen auf dem Array 12926912 durchgeführt werden konnte.

Es zeigte sich, dass mit den aussortierten Zellen genügend mRNA isoliert werden konnte, um Hybridisierungen auf dem cDNA-Microarray vornehmen zu können. Auf den cDNA Microarrays 12926912 und 12926912 wurden jeweils ca. 5700 Hybridisierungsereignisse detektiert. Diesen Hybridisierungsereignissen wurden jeweils ca. 2600 Gene bzw. Klone zugeordnet.

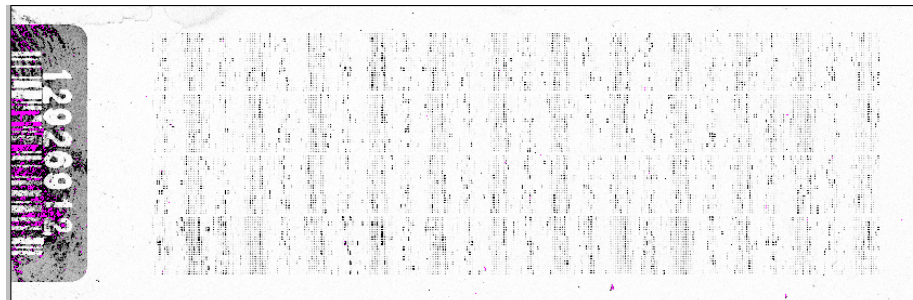


Abbildung 3.21 Hybridisierung auf dem Array 12926912 mit der Proben, die aus FACS sortierten dopaminergen Zellen nach mRNA Isolierung und den folgenden Arbeitsschritten durchgeführt wurde. Es ist eine große Zahl an deutlich zu erkennenden Hybridisierungsereignissen zu erkennen.

3.9.2 Relevante Gene für dopaminerge Zellen

Um zu überprüfen, ob die sortierte Zellfraktion auch tatsächlich dopaminerge Zellen enthielt, wurden aus der Datenbank *FlyBase* (www.flybase.bio.indiana.edu) dopaminrelevante Gene zur Kontrolle ermittelt (Tabelle 3.9). Diese Gene mussten zumindest teilweise auf den Arrays als Hybridisierungsereignisse zu detektieren sein. Es handelt sich dabei um die Dopaminrezeptoren D1, D2, D2R, den Dopamintransporter und die dem

Dopaminmetabolismus dienenden Enzyme Dopamin-Decarboxylase, Dopamin- β -Hydroxylase, Dopamin-N-Acetyltransferase und Tyramin- β -Hydroxylase.

Tabelle 3.9 Auswahl der Gene, die spezifisch für dopaminerge Zellen sind. Aufgeführt sind die CG Nummer, das Kürzel, der Name und eine kurze Beschreibung der molekularen Funktion bzw. des biologischen Prozesses, an dem sie beteiligt sind.

Symbol	Kürzel	Name	Molekulare Funktion	Biologischer Prozess
Btau\BtetaH	Btau\DBH	Dopamin- β -Hydroxylase		
CG9569	D2R	Dopamin 2-like Rezeptor	Dopaminrezeptor Aktivität wie D2	Dopaminrezeptor Signalkaskade
CG8380	DAT	Dopamin-transporter	Dopamintransporter	Neurotransmittertransport
CG3318	Dat	Dopamin N-Acetyltransferase	Aralkylamine N-acetyltransferase Aktivität	Dopaminkatabolismus
CG9652	DopR	Dopaminrezeptor	Dopaminrezeptor Aktivität D1	Dopaminrezeptor Signalkaskade
CG18741	DopR2	Dopaminrezeptor 2	Dopaminrezeptor Aktivität D2	Dopaminrezeptor Signalkaskade
CG1543	Tbh	Tyramin- β -Hydroxylase	Dopamin - β -Monooxygenase	Katecholaminmetabolismus
CG10697	Ddc	Dopamin-Decarboxylase	Aromatische-L-Amino-säure-Decarboxylase Aktivität	Dopaminsynthese aus Tyrosin

Zwei dieser Gene waren auf dem *Canada-12k-Drosophila-Microarray* nicht vorhanden (Btau/CG1543). Für die Gene, die auf dem *Canada-12k-Drosophila-Microarray* vorhanden waren, konnte eine Expression in den dopaminergen Zellen, mit der Ausnahme des Dopaminrezeptors D1 nachgewiesen werden.

Die Intensitäten der Hybridisierung mit Probenmaterial aus dopaminergen Zellen auf dem *Canada-12k-Drosophila-Microarray* sind in der Tabelle 3.10 aufgeführt. Besonders die Intensitäten für die Dopamin-Acetyltransferase sind relativ hoch.

Bei den Genen, die zur Kontrolle der FACS sortierten Zellen dienten fiel auf, dass auf beiden mit den gleichen Proben hybridisierten Arrays die Dopaminrezeptoren D2 und D2R als exprimiert nachgewiesen wurden (Abbildung 3.22). Dies bedeutet, dass sie von den dopaminergen Zellen selbst exprimiert werden.

Tabelle 3.10 Intensitäten der beiden hybridisierten Arrays für die ausgewählten Gene. Aufgeführt sind die Koordinaten auf dem Array (Label), die CGNummer, das Kürzel, die gemessenen Intensitäten dieser Punkte und der Name des entsprechenden Enzyms bzw. Rezeptors

Label	CG	Kürzel	Intensität 12926912	Intensität 12926915	Name
5-9,1	CG10697	Ddc	58,7	104,9	Dopamin-Decarboxylase
5-9,2	CG10697	Ddc	53,3	107,6	Dopamin-Decarboxylase
9-4,11	CG3318	Dat	1219,3	752,9	Dopamin N-Acetyltransferase
9-4,12	CG3318	Dat	1235,6	800,1	Dopamin N-Acetyltransferase
10-17,15	CG18741	DopR2	29,4	28	Dopaminrezeptor 2
10-17,16	CG18741	DopR2	30,3	24,2	Dopaminrezeptor 2
24-16,15	CG9569	D2R	63,4	90,2	Dopamin 2-like Rezeptor
24-16,16	CG9569	D2R	58,3	73,8	Dopamin 2-like Rezeptor
29-7,3	CG8380	DAT	65,6	98,7	Dopamintransporter
29-7,4	CG8380	DAT	61	80,8	Dopamintransporter
38-23,5	CG9652	DopR	2,2	3,8	Dopaminrezeptor
38-23,6	CG9652	DopR	5,1	6,3	Dopaminrezeptor

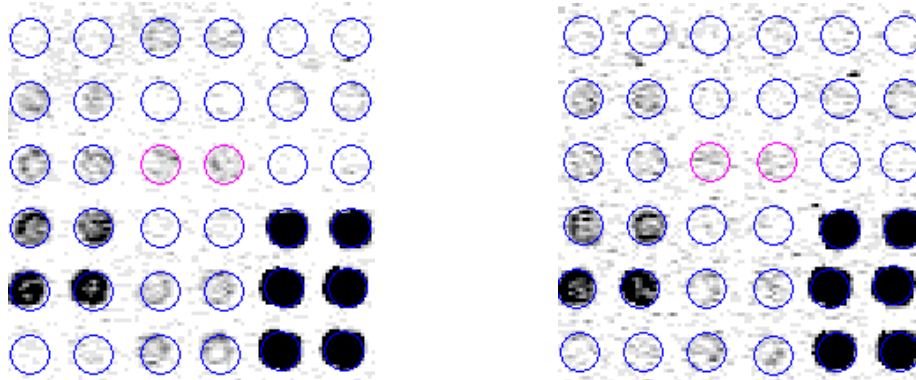


Abbildung 3.22 Ausschnitte aus den Arrays 12926912 und 12926915. Hybridisierungen auf den Koordinaten 10-17,15 und 10-17,16 (lila). Hybridisiert mit Proben aus den FACS-sortierten Zellen. An diesen Koordinaten ist der Klon CG18741 D2-Rezeptor lokalisiert.

3.9.3 Arrayauswertung dopaminergischer Zellen

Nach der Recherche in der Datenbank www.fatigo.bioinfo.cnio.es konnten 1357 Genen einem biologischen Prozess zugeordnet werden, an dem sie beteiligt sind. 1293 Gene waren nicht in der Datenbank verzeichnet und 220 Gene konnten in der gewählten Rechercheebene nicht zugeordnet werden. Zum Vergleich wird die Verteilung aller Gene, die auf dem *Canada-12k-Drosophila-Microarray* vorhanden sind herangezogen. Der weitaus größte Anteil der Gene, die bei der Analyse FACS sortierter Zellen gefunden wurden, gehört zur Gruppe der Gene, die an physiologischen Prozessen beteiligt sind. Dazu gehören Gene, die den Metabolismus, die

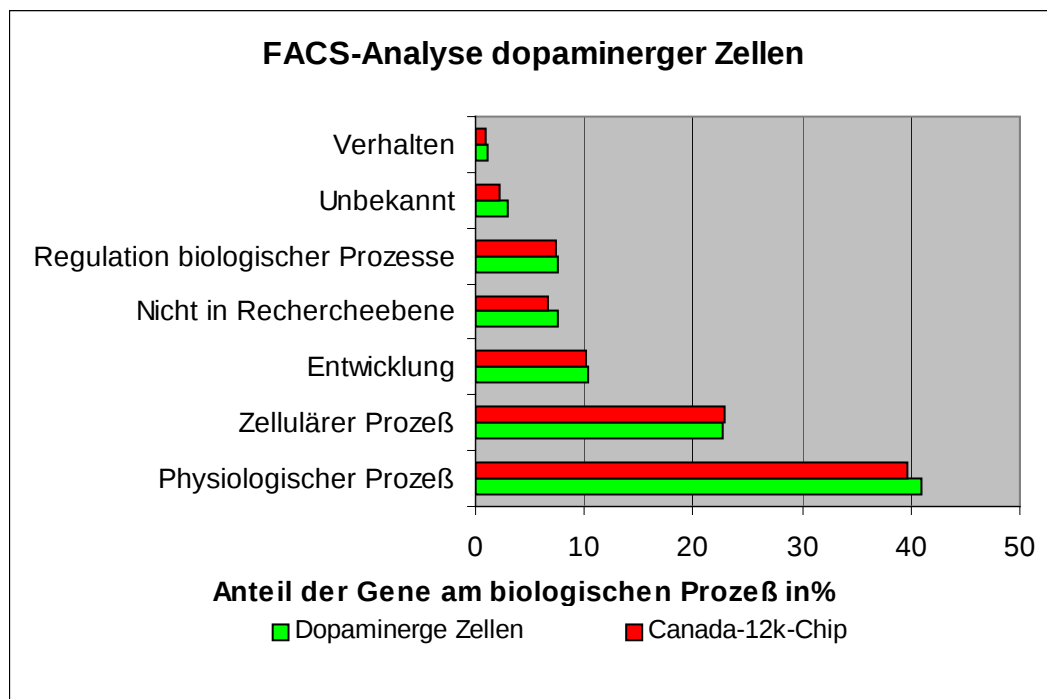


Diagramm 3.3 Darstellung der Verteilung der in dopaminergen Zellen exprimierten Gene in Bezug auf die biologischen Prozesse, denen sie nach *Gene Ontology* zuzuordnen sind. Die Summe der Prozentzahlen ist nicht gleich 100%, da nicht alle abgefragten Gene in den Datenbanken zuzuordnen waren.

Homöostase oder die Regulation physiologischer Prozesse betreffen. Die zweitgrößte Gruppe bilden Gene, die zellulären Prozessen zuzuordnen sind, wie Zellkommunikation, Membranfusion oder Regulation zellulärer Prozesse. Als drittgrößte Gruppe finden sich Gene, die sich Entwicklungsprozessen zuordnen lassen, wie Zellentwicklung, Wachstum oder Alterungsprozesse (Diagramm 3.3). In beiden Diagrammen sind zusätzlich noch die Verteilungen der Gene auf dem gesamten *Canada-12k-Microarray* dargestellt.

Nach der Recherche bezüglich der molekularen Funktion konnten 1434 Gene einer molekularen Funktion zugeordnet werden. 1293 Gene waren nicht in der Datenbank verzeichnet und 143 Gene konnten in der gewählten Rechercheebene nicht zugeordnet werden (Diagramm 3.4).

Bei der Abfrage der molekularen Funktion ergibt sich, dass die größten Gruppen der exprimierten Gene in dopaminergen Zellen katalytische Aktivität und Bindungsaktivität haben. Unter katalytischer Aktivität werden in der verwendeten Datenbank 43 verschiedene Prozesse verstanden, u.A. Hydrolase-Funktion, Ligase-Funktionen oder Oxidoreduktase Aktivität. Unter Bindung werden Funktionen wie Peptidbindung, Neurotransmitterbindung oder Proteinbindung zugeordnet. Interessant sind auch die gefundenen Funktionen, wie

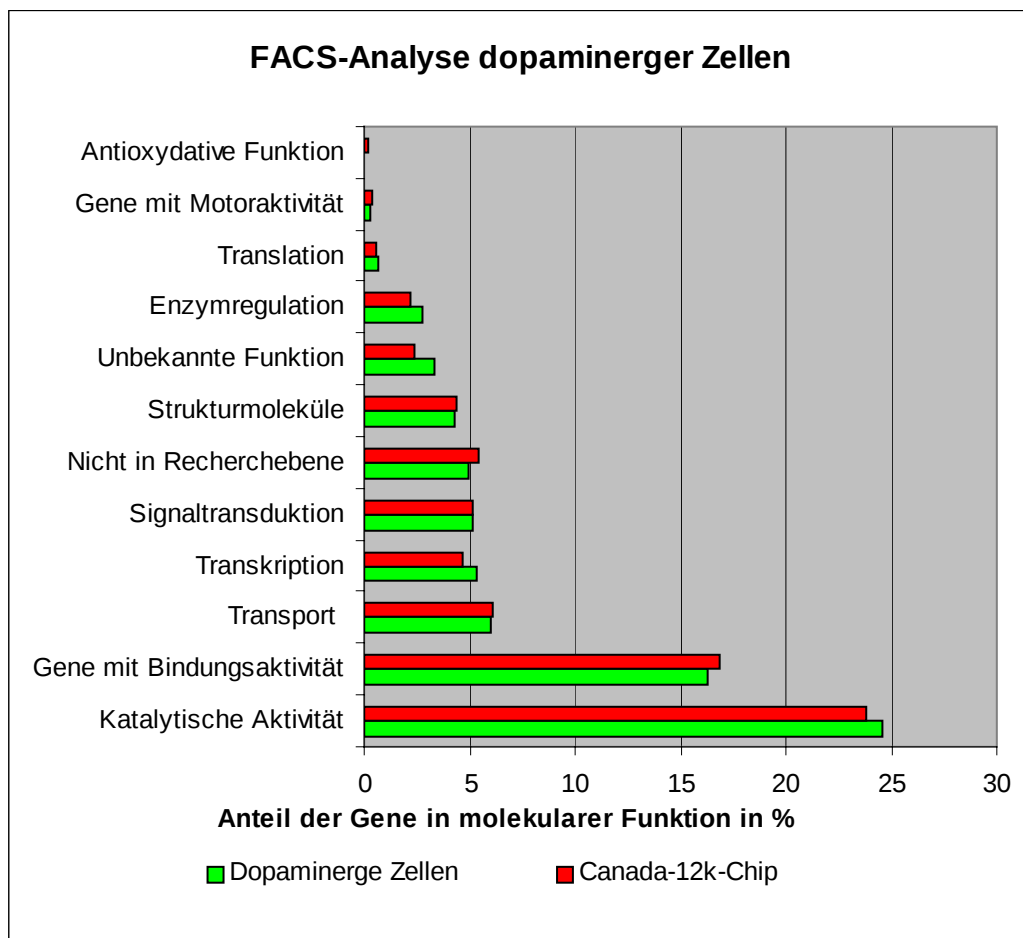


Diagramm 3.4 Darstellung der Verteilung der in dopaminergen Zellen exprimierten Gene in Bezug auf die molekularen Funktionen, denen sie nach der Datenbank Gene Ontology zuzuordnen sind. Die Summe der Prozentzahlen ist nicht gleich 100%, da nicht alle abgefragten Gene in den Datenbanken zuzuordnen waren

Signaltransduktion oder antioxidative Funktionen. Der Vergleich der in den dopaminergen Zellen gefundenen Gene mit allen Genen, die auf dem *Canada-12k-Drosophila-Microarray* vertreten sind zeigt, dass sie einen Querschnitt aller Gene darstellen.

3.10 Vergleich Synuclein exprimierende *Drosophila* gegen Wildtyp

Zum Vergleich der Genexpressionsmuster Synuclein exprimierender *Drosophila melanogaster* mit dem Wildtyp, wurde die DDcGAL4-Treiberlinie mit der Synuclein_{wt}-Effektorlinie oder der Synuclein_{A30P}-Effektorlinie gekreuzt. Die Filialgeneration F1 exprimierte das Synuclein selektiv in den dopaminergen Zellen des Gehirns und des thorakalen Verbundganglions von *Drosophila melanogaster*. Zum Vergleich diente der *Drosophila melanogaster* Wildtyp. Die Tiere wurden im Abstand von 10 Tagen eingefroren, die Gehirne präpariert und die mRNA isoliert. Die mRNA diente zur Synthese von geeigneten Proben, welche auf dem *Canada-12k-Drosophila-Microarray* hybridisiert wurden. Die Hybridisierung bzw. der Vergleich erfolgte immer paarweise zwischen den Proben aus dem Gehirn Synuclein exprimierender Tiere und des Wildtyps zu gleichen Altersstufen. Für den Vergleich wurden 4 Arrays zur Auswertung herangezogen. Die anderen Arrays waren auf Grund zu starker Hintergrundfluoreszenz oder Verunreinigung nicht verwertbar. Die größte Anzahl stärker exprimierter Gene wurde in der Kontrollgruppe Wildtyp gefunden und zwar mit steigender Tendenz, je älter die Vergleichsgruppen waren (Diagramm 3.5). Die Anzahl der in den Synuclein exprimierenden *Drosophila melanogaster* stärker exprimierten Gene, nahmen im Zeitverlauf ab.

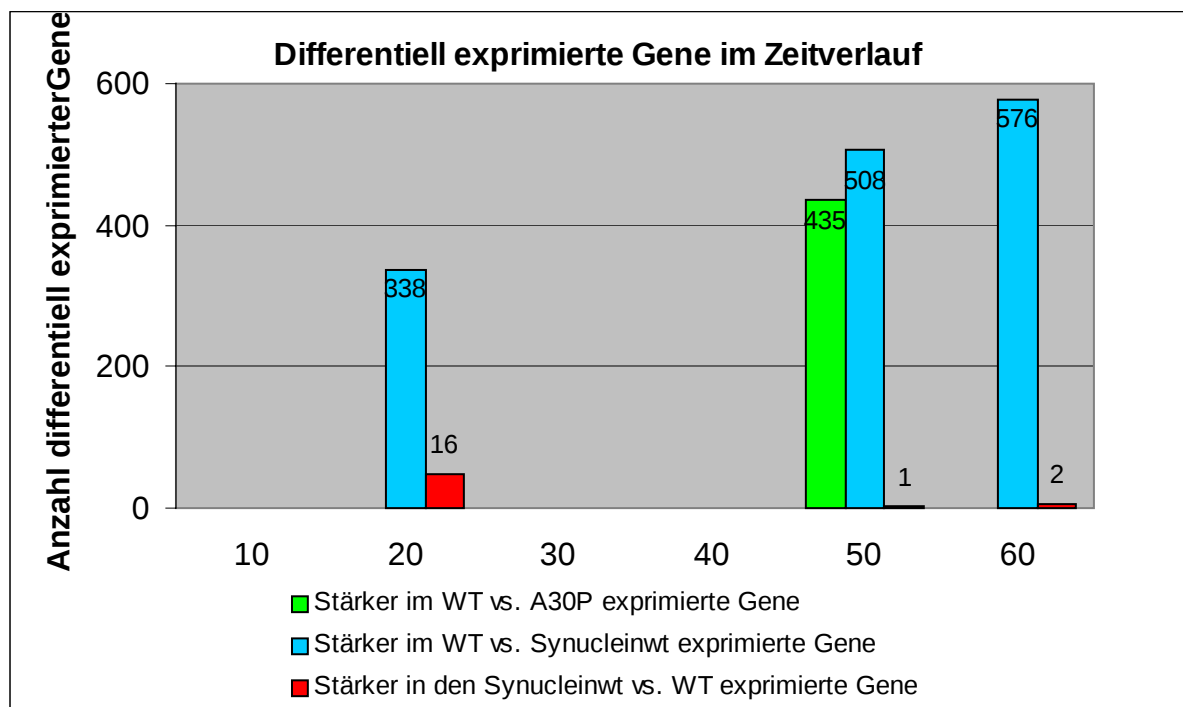


Diagramm 3.5 Anzahl (y-Achse) der differenziell exprimierten Gene im Zeitverlauf (x-Achse) der Untersuchung. Stärker im WT exprimierte Gene, verglichen mit Synuclein_{wt} (blau) und Synuclein_{A30P} (grün). Stärker in Synuclein_{wt} exprimierte Gene, verglichen mit dem Wildtyp (rot), aus Gründen der Darstellung dreifach überhöht.

3.10.1 Stärker in Synuclein exprimierenden Fliegen exprimierte Gene

Im Vergleich zwischen den Synuclein_{wt} exprimierenden *Drosophila melanogaster* mit der Kontrollgruppe Wildtyp, wurden zu allen Untersuchungszeitpunkten wenige stärker exprimierte Gene bei den Synuclein exprimierenden Tieren gefunden.

Am Untersuchungszeitpunkt Tag 20 waren es 16 Gene (Tabelle 3.11), am Untersuchungszeitpunkt Tag 50 war es ein Gen (Tabelle 3.12) und am Zeitpunkt Tag 60 waren es zwei Gene (Tabelle 3.13). Bei der Betrachtung der Ratios fällt auf, dass diese Gene hier wesentlich stärker differentiell exprimiert sind, als die stärker exprimierten Gene im umgekehrten Vergleich. Als differentiell exprimiert wurden Gene angesehen, deren Ratio größer als 3 war.

Von den am Zeitpunkt 20 Tage, als stärker exprimierte erkannten Genen, waren in Bezug auf die biologischen Prozesse denen sie zugeordnet werden können 56% an physiologischen Prozessen, 12% an biologischen und zellulären Prozessen und 6% an Entwicklungsprozessen beteiligt. Für 12% finden sich auf der gewählten Rechercheebene keine Einträge. Die Zuordnung zu molekularen Funktionen ergibt, dass 43% katalytische Aktivität, 18% Transport Aktivität, 12% Transkriptions- und 6% Bindungs-Aktivität haben.

Tabelle 3.11 Gene die im Vergleich von Synuclein_{wt} exprimierenden *Drosophila melanogaster* mit dem Wildtyp differentiell in den Synuclein exprimierenden Tieren am Untersuchungszeitpunkt 20 Tage gefunden wurden. Aufgeführt sind die Koordinaten auf dem *Canada-12k-Drosophila-Microarray*, die CG-Nummer, die Ratio, der Kurzname und eine Kurzbeschreibung der Funktion.

	Label	CG-Nummer	Ratio	Name	Molekulare Funktion/Biologischer Prozess
1.	33-18,18	AT05157	3,86		
2.	44-1,6	CG6948	3,72	Clc	Neurotransmittertransport; Intracellulärer Proteintransport; Neurotransmitter-Exozytose; rezeptorvermittelte Endozytose; Vesikelverpackung
3.	44-19,20	CG1537	16,61		
4.	45-8,14	CG6296	29,55		Phospholipase A1-Aktivität; Lipidmetabolismus
5.	45-9,19	CG1438	34,42	Cyp4c3	Elektronentransporter-Aktivität; Oxidoreduktase-Aktivität; Monooxygenase-Aktivität; Elektronentransport
6.	45-9,21	CG5191	8,4		Hydrolase; NO-Metabolismus
7.	45-9,24	CG18476	6,99		Transkriptionsfaktor
8.	45-12,2	CG13598	13,62	sba	
9.	45-13,8	CG1304	27,95		Serinendopeptidase; Proteolyse; Peptidolyse
10.	45-19,20	CG11739	100		Kationentransport
11.	45-21,11	CG8360	7,94		Cytidindesaminase
12.	45-21,14	LP03977	19,8		
13.	45-22,19	CG17301	3,12		Peptidase; Ubiquitin abhängiger Proteinkatabolismus
14.	46-11,7	CG6016	40,33		Phospholipidmetabolismus
15.	46-21,5	CG18389	15,22	Eip93F	Transkriptionsfaktor; autophagischer Zelltod; Autophagie; Induction von Apoptose durch Hormone; Phagozytose
16.	46-22,9	CG40188	10,97		

Unter den 16 gefundenen Genen finden sich u.A. das Gen CG18389 (Eip93F), das im Zusammenhang mit der Induktion von Apoptose und autophagischem Zelltod beschrieben wurde und das Gen CG6948 (Clc) für das Funktionen wie Neurotransmitter-Exozytose und

Vesikelverpackung gefunden wurden. Ebenso wie das Gen CG17301, das in Zusammenhang mit ubiquitinabhängigen Proteinkatabolismus steht.

Für den Vergleich zwischen den Synuclein_{wt} exprimierenden *Drosophila melanogaster* und dem Wildtyp am Zeitpunkt Tag 50 wurde das Gen CG11081 (plexA) stärker in den Synuclein_{wt} exprimierenden exprimiert gefunden. PlexinA ist ein Gen, das an der Zielfindung von Axonen während der Entwicklung und eine Rezeptor-Tyrosin-Kinase.

Tabelle 3.12 Das Gen welches im Vergleich von Synuclein_{wt} exprimierenden *Drosophila melanogaster* mit dem Wildtyp differentiell in den Synuclein exprimierenden Tieren am Untersuchungszeitpunkt Tag 50 gefunden wurden. Aufgeführt sind die Koordinaten auf dem *Canada-12k-Drosophila-Microarray*, die CG-Nummer, die Ratio, der Kurzname und eine Kurzbeschreibung der Funktion.

	Label	CG Nummer	Ratio	Name	Molekularer Prozess/Biologische Funktion
1.	47-2,9	CG11081	33,30	plexA	Transmembran Rezeptor Tyrosin Kinase, Peptidase

Zum Zeitpunkt 60 Tage wurden die Gene CG5640 und CG6365 stärker in den Synuclein_{wt} exprimierenden Tieren exprimiert gefunden. Das Gen CG5640 hat eine negativ regulatorische Funktion auf die Transkription und das Gen CG6365 steht in Zusammenhang mit der Zielführung von Axonen während der Entwicklung.

Tabelle 3.13 Die Gen, welche im Vergleich von Synuclein_{wt} exprimierenden *Drosophila melanogaster* mit dem Wildtyp differentiell in den Synuclein_{wt} exprimierenden Tieren am Untersuchungszeitpunkt 60 Tage gefunden wurden. Aufgeführt sind die Koordinaten auf dem *Canada-12k-Drosophila-Microarray*, die CG-Nummer, die Ratio, der Kurzname und eine Kurzbeschreibung der Funktion.

	Label	CG Nummer	Ratio	Name	Molekulare Funktion/Biologischer Prozess
1.	8-17,9	RH47344	1,59	beatIIIc	Zielführung von Axonen
		CG6365			
2.	30-3,9	CG5640	2,44		Transkriptionsfaktor-Aktivität

Für den Vergleich zwischen den Synuclein_{A30P} exprimierenden *Drosophila melanogaster* und der Kontrollgruppe Wildtyp wurden am Zeitpunkt 45 Tage keine differentiellen Gene gefunden.

3.10.2 Stärker im Wildtyp exprimierte Gene

Am Zeitpunkt 20 Tage fanden sich im Vergleich des Wildtyps Gehirn gegen Synuclein_{wt} exprimierende Tiere, 338 Gene die stärker im Wildtyp exprimiert waren. Im Vergleich der 50 Tage alten Wildtyp Tiere mit Synuclein_{wt} exprimierenden Tieren fanden sich 508 stärker im WT exprimierte Gene. Für den Vergleich der 60 Tage alten Wildtyp Tiere mit Synuclein_{wt} exprimierenden Tieren fanden sich 576 differentiell exprimierte Gene (Diagramm 3.5). Von den zu allen Zeitpunkten differentiell exprimierten Genen für diesen Vergleich gibt es eine Gruppe von 37 Genen, die in allen Altersstufen differentiell exprimiert wurden. Für den Vergleich des Wildtyps Gehirn gegen Synuclein_{A30P} exprimierende *Drosophila melanogaster*

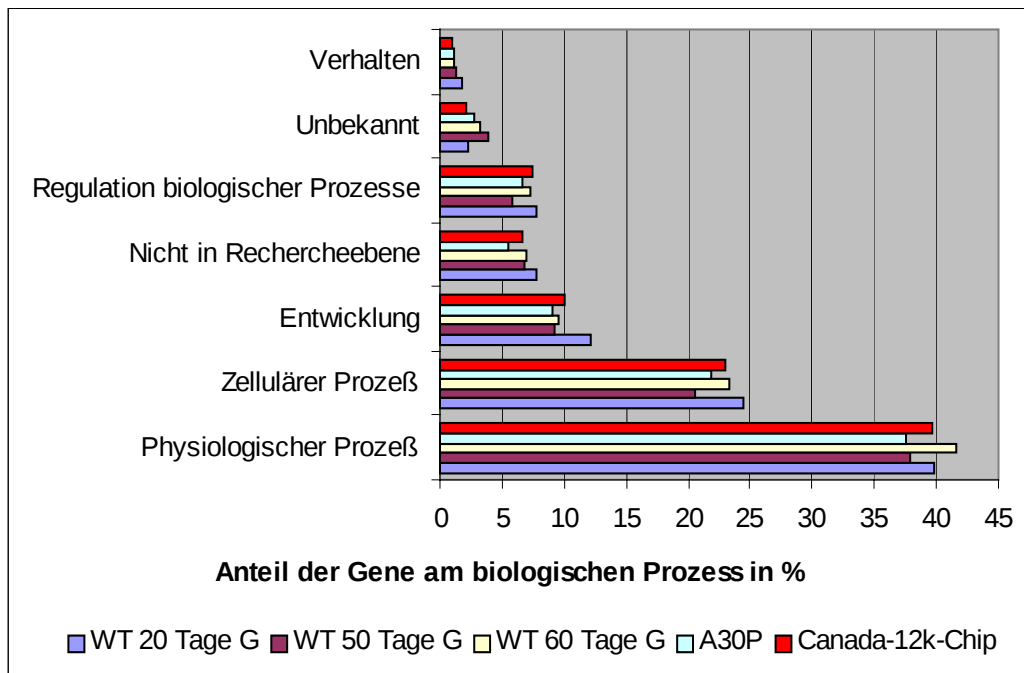


Diagramm 3.6 Darstellung der Verteilung der im Wildtyp *Drosophila melanogaster* differentiell exprimierten Gene in Bezug auf die biologischen Prozesse, denen sie nach *Gene Ontology* zuzuordnen sind. Zusätzlich ist die Verteilung der Gene auf dem ganzen *Canada-12k-Microarray* aufgetragen. Die Summe der Prozentzahlen ist nicht gleich 100%, da nicht alle abgefragten Gene in den Datenbanken zuzuordnen waren.

fanden zum Zeitpunkt 45 Tage 435 Gene, die differentiell im Wildtyp exprimiert waren.

Da die Anzahl der im Wildtyp *Drosophila melanogaster* differentiell exprimierten Gene sehr hoch ist, werden sie im Anhang aufgeführt.

Für keines der Gene, die im Vergleich Wildtyp gegen Synuclein exprimierende Tiere als differentiell für den Wildtyp erkannt wurden, konnte eine 100%ig exklusive Expression im Wildtyp gezeigt werden. Es handelt sich, unter den für die Ermittlung der Ratios als Ausschlusskriterien gewählten Randbedingungen lediglich um eine graduierte differentielle Genexpression. Diese graduell, differentiell exprimierten Gene konnten aber, unter der Voraussetzung, dass bei allen Arbeitsschritten die gleichen Randbedingungen vorlagen, nicht außer Acht gelassen werden. Es fällt auf, dass die Anzahl der differentiell exprimierten Gene mit steigendem Alter zunimmt. Anders stellt sich die Situation für den umgekehrten Vergleich differentiell exprimierter Gene bei den Synuclein exprimierenden *Drosophila melanogaster* dar. Hier sind zum einen für alle Versuchszeitpunkte relativ wenig Gene differentiell exprimiert, und zum anderen sind diese Gene exklusiv oder nahezu exklusiv in den Synuclein exprimierenden Tieren vorhanden.

Die Auswertung der zu den verschiedenen Zeitpunkten exprimierten Gene bezüglich ihrer Einteilung in biologische Prozesse ergibt, dass für die einzelnen Zeitpunkte aus der Anzahl der in die Datenbank eingegebenen Gene zwischen 42% und 47% einem biologischen Prozess zugeordnet werden konnten, zwischen 6% und 8% waren unbekannt und zwischen 43% und

47% hatten keinen Eintrag in der Gene-Ontology-Datenbank. Von den Genen, die zugeordnet werden konnten wurden ca. 40% einem physiologischen Prozess und 20% bis 24% zellulären Prozessen zugeordnet. Die anderen Gene wurden unter den Kategorien Entwicklung, Regulation biologischer Prozesse und Verhalten eingeordnet. Interessant ist hier, das über den gesamten Untersuchungszeitraum die Zuordnung der differentiell exprimierten Gene zu den einzelnen Gruppen biologischer Prozesse nahezu konstant bleibt, obwohl sich ihre Anzahl, von 20 Tage alten Tieren bis zu 60 Tage alten Tieren um 238 Gene erhöht. Für die molekularen Funktionen der differentiell exprimierten Gene wurde ebenfalls eine Datenbankabfrage durchgeführt. Auch für die Auswertung der zu den verschiedenen Zeitpunkten exprimierten Gene bezüglich ihrer Einteilung zu molekularen Funktionen ergibt

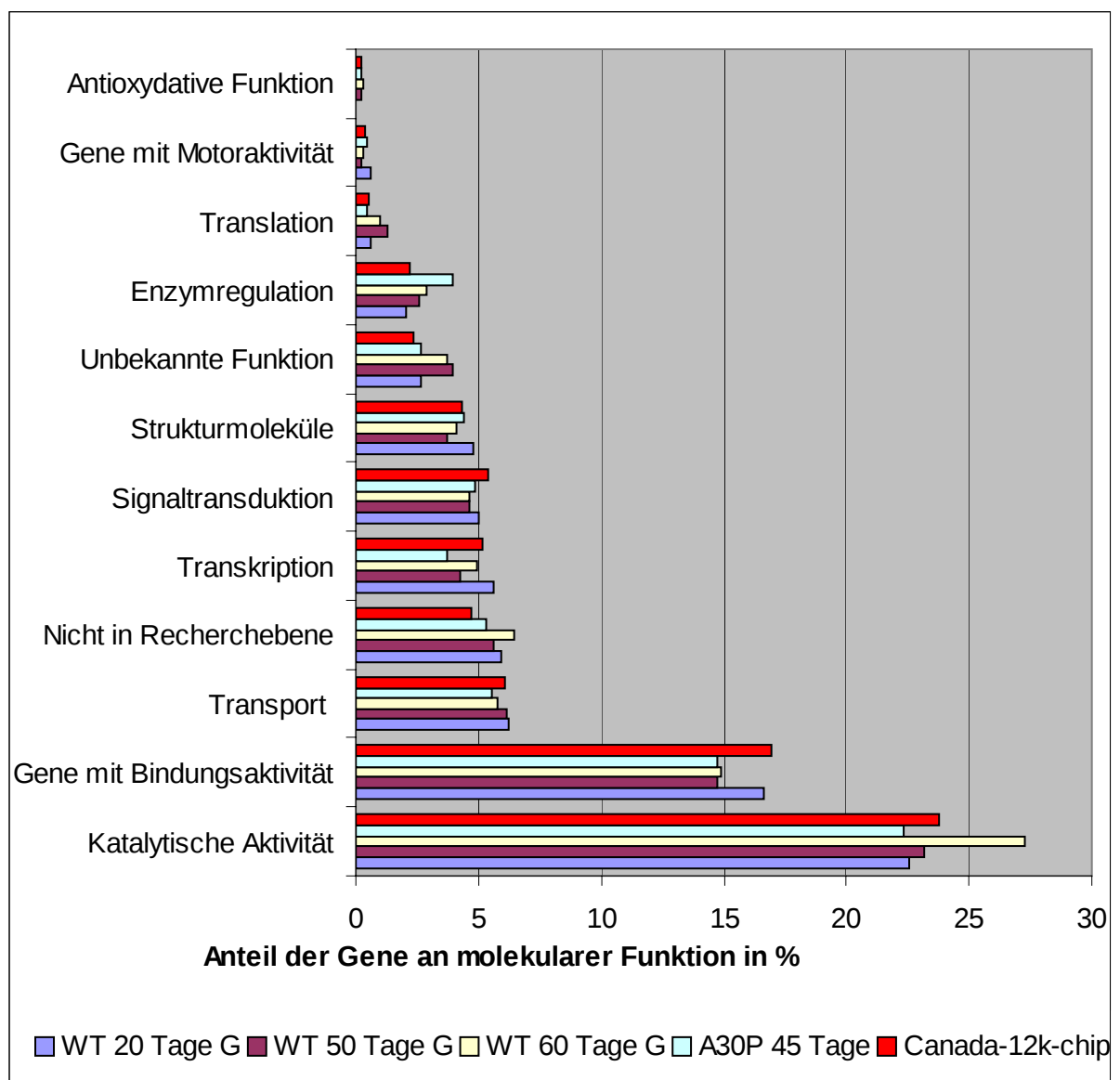


Diagramm 3.7 Darstellung der Verteilung der im Wildtyp *Drosophila melanogaster* differentiell exprimierten Gene in Bezug auf die molekularen Funktionen, denen sie nach Gene Ontology zuzuordnen sind. Zusätzlich ist die Verteilung der Gene auf dem ganzen *Canada-12k-Microarray* aufgetragen. Die Summe der Prozentzahlen ist nicht gleich 100%, da nicht alle abgefragten Gene in den Datenbanken zuzuordnen waren.

sich, dass für die einzelnen Zeitpunkte, aus der Anzahl der in die Datenbank eingegebenen Genen zwischen 42% und 47% eine molekulare Funktion zugeordnet werden konnten, zwischen 6% und 8% waren unbekannt und zwischen 43% und 47% hatten keinen Eintrag in der *Gene-Ontology*-Datenbank.

Bezüglich der Verteilung innerhalb der molekularen Funktionen, denen sich die im Wildtyp *Drosophila melanogaster* gefundenen Gene zuordnen lassen, haben in allen Altersstufen die meisten Gene katalytische Funktionen (zwischen 20 und 25%). Gefolgt wird diese Gruppe von Genen mit Bindungsaktivität (um die 15%). Die anderen Gene, mit Funktionen bezüglich Transport, Transkription, Signaltransduktion, Strukturmolekül Aktivität oder Enzymregulation haben einen Anteil von ca. 5%. Wie auch bei den biologischen Prozessen bleibt die Verteilung bezüglich der molekularen Funktion über den Untersuchungszeitraum gleich. Interessant ist bei diesem Vergleich, dass nach 50 und 60 Tagen Gene denen antioxidative Funktionen zugeordnet werden auftauchen.

Ein Vergleich der differentiell im Wildtyp nach 60 Tagen exprimierten Gene mit den in den dopaminergen Zellen (nach FACS-Analyse) exprimierten Genen zeigt, dass 98% der differentiellen im Wildtyp exprimierten Zellen in der Menge der Gene liegen, die auch in den dopaminergen Zellen exprimiert wird.

3.10.3 Im Wildtyp stärker exprimierte Gene an allen Untersuchungszeitpunkten

Es wurden 37 Gene gefunden, die an allen drei Untersuchungszeitpunkten stärker im Wildtyp exprimiert waren. Diese Gene sind gesondert aufgeführt.

Die hier gefundenen Gene sind bezüglich der biologischen Prozesse an denen sie beteiligt sind, zu 30% an physiologischen Prozessen, zu 20% an zellulären Prozessen und zu jeweils 10% an Entwicklungsvorgängen und regulatorischen Prozessen beteiligt.

Die Abfrage der Datenbank ergibt, dass jeweils 15% dieser Gene bei der Zuordnung zu molekularen Funktionen entweder katalytische oder Bindungsfunktion, 10% haben Signaltransduktionsfunktion, und 5% üben jeweils regulatorische Funktion auf die Transkription oder andere Enzyme aus. 2,5% haben Strukturmolekülfunktion und Transportfunktion. Den anderen Genen konnte keine Funktion zugeordnet werden.

Diese Gene sind also schon ab Beginn der Untersuchung aus dem Genexpressionsmuster der Synucleinwt exprimierenden verschwunden. Es fällt auf, dass es sich hierbei zum Teil um Gene handelt, deren Genprodukte Funktionen haben, wie antioxidativen Aktivität CG8905 oder Proteolyse CG11459.

Tabelle 3.14 Gene die im Vergleich von Synuclein exprimierenden *Drosophila melanogaster* mit dem Wildtyp zu allen Untersuchungszeitpunkten gemeinsam, stärker im Wildtyp exprimiert wurden. Aufgeführt sind die Koordinaten auf dem *Canada-12k-Drosophila-Microarray*, die CG Nummer, der Kurzname und die biologischen Funktionen bzw. Molekularen Prozesse, an denen sie beteiligt sind.

	Label	CG-Nummer	Name	Biologische Funktion/Molekularer Prozess
1.	3-21,11	LP06778 CG5232	Sas	Kohlenhydratmetabolismus, Temperaturregulation, Kälteantwort, Glycolisierung
2.	4-21,11	CG9917		
3.	6-22,12	CG31733	ms(2)35Ci	
4.	7-1,22	CG1838	myoglianin	Wachstumsfaktor-Aktivität, Zell-Zell-Kommunikation, Transmembranrezeptor, Serin/Threonin-Kinase
5.	7-4,9	CG8905	Sod2	Antioxydative-Aktivität, Superoxid dismutase-Aktivität, Determination der Lebensspanne, Entfernung von Radikalen
6.	7-7,19	CG8326		
7.	7-9,22	CG6518	inaC	Diacylglycerol aktivierte Phospholipid-Proteinkinase C, Rezeptorprotein, Serin/Threonin-Kinase, Calcium vermittelte Signalübertragung, Intrazelluläre Signalkaskade, Nervenimpulsübertragung
8.	8-1,24	CG9553	chic	Actinbindung, Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate- Bindung, Actinpolymerisation und/oder depolymerisation
9.	8-4,11	CG11459		NOT Cathepsin L Aktivität; Proteolyse, Peptidolyse
10.	8-7,23	CG5940	CycA	Kinaseaktivator-Aktivität, Zellwachstum oder Reperatur, Mitose, Entwicklung des peripheren Nervensystems
11.	11-4,10	CG3699		Oxidoreduktase-Aktivität
12.	12-4,20	CG4968		
13.	13-5,15	CG9796		
14.	13-20,13	GH14137 CG15316		
15.	14-20,11	CG10343		
16.	17-20,10	CG31090		Kationtransporter-Aktivität, Aminosäuremetabolismus
17.	18-11,1	CG11329		
18.	20-20,6	CG2457	inaF	Kalziumkanal-Regulator-Aktivität, Rhodopsin vermittelte Signalkaskade
19.	20-20,8	CG1857	nec	Serinendopeptidaseinhibitor, Toll-Signalkaskade, Proteolyse, Peptidolyse
20.	22-20,23	GM3184 CG15763		
21.	23-20,8	CG7570	hale	
22.	27-18,11	CG11710		Transkriptionsfaktor-Aktivität, Kernrezeptor-Aktivität
23.	28-4,18	CG7891		GTP-Bindung, G-Protein gekoppelte Signalkaskade, Intrazellulärer Proteintransport, Regulation der Exocytose
24.	31-4,16	CG10233		
25.	32-8,3	CG6422		
26.	32-21,6	CG15219		
27.	33-7,24	CG2982		
28.	36-9,10	CG1597		Glycolisierung
29.	36-12,22	CG11971		Transkriptionsfaktor
30.	38-3,17	CG9611		RAS Protein Signalkaskade
31.	39-9,20	CG8669	crc	Transkriptionsfaktor, Protein-Heterodimerisation
32.	40-14,17	CG5510		Intrazellulärer Proteintransport
33.	43-5,1	CG9021		
34.	43-22,10	CG9173		
35.	47-17,17	CG7322		Oxidoreduktase-Aktivität, Lipidmetabolismus
36.	47-22,11	CG33187		
37.	48-5,16	CG8436		

3.10.4 Ausgewählte, stärker exprimierte Gene im Wildtyp

Im folgenden werden tabellarisch aus der großen Anzahl der stärker im Wildtyp exprimierten Gene verschiedene Gruppen ausgewählt die in Zusammenhang stehen könnten mit neurodegenerativen bzw. neuroprotektiven Prozessen. Dazu gehören Gene die in Zusammenhang stehen mit Apoptose, Proteinkatabolismus, Ubiquitinylierung, Neurotransmittertransport-und Metabolismus, Lokomotion, Signaltransduktion und Transkriptionskontrolle (Transkriptionsfaktoren). Die Einteilung wurde mit Hilfe der Datenbank *FatiGO* (www.fatigo.bioinfo.cnio) aus der Menge der differentiellen herausgefiltert. Einige Gene sind doppelt vertreten, weil sie mehreren biologischen Prozessen oder molekularen Funktionen zugeordnet werden. Die Gene sind mit ihrer CG-Nummer, ihrem Kürzel und einer kurzen Funktionsbeschreibung aufgeführt. Der Übersicht halber sind sie in aufsteigender Reihenfolge nach ihrer CG-Nummer sortiert. Die farbige Markierung und in Klammern gesetzte Zahlen in der Spalte CG-Nummer geben an zu welchen Zeitpunkten sie als differentiell exprimiert erkannt wurden.

3.10.5 Tabellarische Auflistung der ausgewählten Gene im WT

Mit rot hinterlegte Felder zeigen an, dass differentiell exprimierte Gene zu den Zeitpunkten 20, 50 und 60 Tagen gefunden wurden. Mit grün hinterlegte Felder zeigen, dass diese Gene zu den Zeitpunkten 20 und 50 Tage als differentiell exprimiert gefunden wurden. Blau hinterlegte Felder zeigen an, dass diese Gene zu den Zeitpunkten 50 und 60 Tage differentiell exprimiert wurden und gelbe Felder zeigen an, dass diese Gene zu den Zeitpunkten 20 und 60 Tage differentiell exprimiert wurde. Mit einem Stern sind zusätzlich die Gene gekennzeichnet, die in Vergleich Wildtyp gegen die SynucleinA30P exprimierenden Tiere als differentiell gefunden wurden. Eine zwei in Klammern (2) gibt an das diese Gene nur zum Zeitpunkt 50 Tage differentiell im Wildtyp gefunden werden. Eine drei in Klammern (3) zeigt dies für den Zeitpunkt nach 60 Tagen an. Diese Codierungen werden im Kopf der Tabellen nicht wieder mit aufgeführt.

Tabelle 3.15 Stärker im WT exprimierte Gene die in Verbindung mit antioxydativer Funktion stehen, aus dem Vergleich Wildtyp *Drosophila melanogaster* mit Synuclein exprimierenden Tieren. Aufgeführt sind die CG Nummer , das Symbol und die molekularen Prozesse bzw. biologischen Funktionen an den sie beteiligt sind.

CG-Nummer	Symbol	Molekulare Funktion und biologische Prozesse an denen sie beteiligt sind
CG12002		
CG2151 *	Trxr-1	Antioxydative Wirkung; NOT Glutathionreduktase; Glutathionreduktase; Oxidoreduktase, Lebenserwartung
CG5826	Prx5037	Antioxydative Wirkung; Immunabwehr; ROS Metabolismus

Tabelle 3.16 Stärker im WT exprimierte Gene die in Verbindung mit Apoptose stehen, aus dem Vergleich Wildtyp *Drosophila melanogaster* mit Synuclein exprimierenden Tieren. Aufgeführt sind die CG Nummer, das Symbol und die molekularen Prozesse bzw. biologischen Funktionen an den sie beteiligt sind.

CG-Nummer	Symbol	Molekulare Funktionen und biologische Prozesse an denen sie beteiligt sind
CG13425 (3)		
CG1548	cathD	Apoptose; Proteolyse/Peptidolyse
CG1643 (3)		Apoptose
CG1658		
CG17019 (3)		bindet Zinkionen; negative Regulation der Apoptose; Proteinubiquitinierung;
CG2151 (3) *	Trxr-1	Antioxydative Wirkung; NOT Glutathionreduktase; Lebenserwartung
CG3260	Zfrp8	Elektronen Transporter; bindet an Eisenionen; Apoptose; Transkriptionsregulation
CG3979 *	Indy	Transport im Citratzyklus; Lebenserwartung
CG4006 *	Akt1	Proteinkinase Serin/Threonin; Rezeptorproteinkinase; anti-Apoptose; Protein Phosphorylierung; Protein-Kern Import
CG4091		Zelltod
CG7859		
CG9769		Translationsfaktor; Zelltod

Tabelle 3.17 Stärker im WT exprimierte Gene die in Verbindung mit Proteinmetabolismus stehen, aus dem Vergleich Wildtyp *Drosophila melanogaster* mit Synuclein exprimierenden Tieren. Aufgeführt sind die CG Nummer, das Symbol und die molekularen Prozesse bzw. biologischen Funktionen an den sie beteiligt sind.

CG-Nummer	Symbol	Molekulare Funktionen und biologische Prozesse an denen sie beteiligt sind
CG10161 (3) *	eIF-3p66	Translationsfaktor
CG10484 (3) *	Dox-A2	Proteolyse/Peptidolyse
CG10578	DnaJ-1	Proteinfaltung; Immunabwehr; Hitzeschockantwort; Stressantwort
CG10593 (3)	Acer	bindet Zinkionen; Proteolyse/Peptidolyse
CG1098 (3)		Rezeptorproteinkinase; Proteinkinase Serin/Threonin; Intrazelluläre Signalkaskade; Protein Phosphorylierung
CG11070 (3) *		Immunabwehr; Proteinubiquitinierung; Stressantwort; Ubiquitin abhängiger Proteinkatabolismus
CG11851		Proteinglycolisierung
CG11981 (3) *	Prosβ3	Endopeptidase; Proteolyse; Ubiquitin abhängiger Proteinkatabolismus
CG12101 (3)	Hsp60	'de novo' Proteinfaltung; Proteinfaltung; Proteinzielsteuerung Hitzeschockantwort; Stressantwort
CG12217 (3)	PpV	Dephosphorylierung
CG12261 (3)	mRpS22	Proteinbiosynthese
CG1242	Hsp83	Immunabwehr; Proteinfaltung; Schlaf/Wachrhythmus Hitzeschockantwort
CG13095		Proteolyse/Peptidolyse
CG1332 *		Proteinzielsteuerung
CG13340 (3)		Proteolyse/Peptidolyse
CG1340		Bindet RNA; Translationsfaktor
CG13425 (3)		
CG1381 (3)		Proteinmetabolismus
CG1404	ran	Proteinzielsteuerung; Signaltransduktion
CG14642 (3)		Proteolyse/Peptidolyse
CG14941 (3) *	esc	Transkriptionsfaktor; N-Methyltransferase (H3-K27 specific); Oberflächenrezeptor Signaltransduktion; Genkontrolle; Histonmethylierung; Transkriptionsregulation
CG1518 (3) *		Proteinglycolisierung
CG1519 (3)	Prosα7	Proteolyse/Peptidolyse; Ubiquitin abhängiger Proteinkatabolismus
CG1548	cathD	Zelltod; Proteolyse/Peptidolyse
CG15862 (3)	Pka-R2	Rezeptorproteinkinase; Verhalten Tagesrhythmus; Bewegungsrhythmus; Protein Phosphorylierung; Signaltransduktion
CG1597		Proteinglycolisierung
CG1625 (3)		Proteintransport; Proteinzielsteuerung

CG-Nummer	Symbol	Molekulare Funktionen und biologische Prozesse an denen sie beteiligt sind
CG1658		
CG16705 (3)		Monooxygenase; Proteolyse/Peptidolyse
CG16996 (3)		Proteolyse/Peptidolyse
CG17012		Proteolyse/Peptidolyse
CG17030		Ubiquitinkonjugierung; Proteinmetabolismus; Proteinmodifizierung
CG1725 (3)*	dlg1	Guanylat Kinase; assymetrische Proteinlokalisierung; Proteinlokalisierung; Zellproliferation
CG1743	Gs2	Glutamatmetabolismus
CG1773 (3)		Proteolyse/Peptidolyse
CG18069 (3)	CaMKII	bindet Calmodulin; Rezeptorproteinkinase; Proteinkinase Kurzzeitverhalten; Lernen und Erinnerung; Protein Phosphorylierung; synaptische Übertragung
CG18495 (3)	Prosalpha6	Proteolyse/Peptidolyse Ubiquitin abhängig
CG18558		Proteinglycolisierung; Proteinmetabolismus; Proteinmodifizierung
CG1857	nec	Immunabwehr; Proteolyse/Peptidolyse; Proteolyse/Peptidolyse
CG18585 (3)		Metallopeptidase; Proteinmetabolismus; Proteolyse/Peptidolyse
CG1866		
CG2028 (3)	CkIalpha	Rezeptorproteinkinase; Proteinkinase Serin/Threonin; DNA Reparatur; Intrazelluläre Signalkaskade; Protein Phosphorylierung; Proteolyse/Peptidolyse
CG2905	Nipped-A	Transkriptionsfaktor; Rezeptorproteinkinase; DNA Reparatur
CG2976 (3) *		
CG30090		Proteinmetabolismus; Proteolyse/Peptidolyse
CG3016 (3)		Deubiquitinierung; Proteolyse/Peptidolyse ubiquitinabhängiger Proteinkatabolismus
CG3025 (3)	mof	Bindet RNA; Transkriptionsfaktor; N-acetyltransferase Dosis Kompensierung; Histonacetylierung; Transkriptionsregulation
CG3066 (3) *		Monooxygenase; Immunabwehr; Proteolyse/Peptidolyse
CG3074		Proteinmetabolismus; Proteolyse/Peptidolyse
CG32019	bt	Rezeptorproteinkinase; Proteinkinase Serin/Threonin; Proteinmetabolismus; Proteinmodifizierung; Signaltransduktion
CG31343 (3)		bindet Zinkionen; Proteolyse/Peptidolyse
CG31795 (3) *	ia2	transmembran Rezeptorprotein
CG32019 (3)	bt	Rezeptorproteinkinase; Proteinkinase Serin/Threonin; Protein Phosphorylierung; Proteinmetabolismus; Proteinmodifizierung; Signaltransduktion
CG32744		Proteinmetabolismus; Proteolyse/Peptidolyse
CG33106	mask	assymetrische Proteinlokalisierung; Zellproliferation; Proteinzielsteuerung
CG3594 (3)	Eap	Bindet RNA
CG3692 (3)*	CalpC	bindet Calmodulin; Proteolyse/Peptidolyse
CG3862 (3)		Proteinmetabolismus; Proteolyse/Peptidolyse
CG3959 (3)	pelo	
CG4006 *	Akt1	Proteinkinase Serin/Threonin; Rezeptorproteinkinase; anti-Apoptose; Protein Phosphorylierung; Protein-Kern Import
CG4012 (3)	gek	ATP binding; diacylglycerol binding; Proteinkinase Serin/Threonin; Rezeptorproteinkinase; Intrazelluläre Signalkaskade; Protein Phosphorylierung
CG4207 (3)	bonsai	Proteinbiosynthese
CG4265 (3)	Uch	Ubiquitinabhängige Proteolyse/Peptidolyse
CG40293		
CG4429	Rbp2	Bindet RNA; Translationsfaktor
CG4542		
CG4721		Proteolyse/Peptidolyse
CG4821	Tequila	Proteolyse/Peptidolyse
CG5119 *	pAbp	Bindet RNA; Translationsfaktor
CG5191 (3)		NO Stoffwechsel
CG5232	Sas	
CG5434 (3)		7S Bindet RNA; Translationsfaktor
CG5650 (3)	Pp1-87B	Lernen und Erinnerung; Lokomotion; Neurogenese
CG5841 (3)		Rezeptor; bindet Zinkionen; Zellproliferation; Proteinmetabolismus; Proteinmodifizierung; Proteinubiquitinierung
CG5855	cni	Gurkenrezeptor; Proteinlokalisierung

CG-Nummer	Symbol	Molekulare Funktionen und biologische Prozesse an denen sie beteiligt sind
CG5987		Proteinmetabolismus; Proteinmodifizierung
CG6007 (3)	gatA	
CG6238 (3)	ssh	MAPKKK KasKade
CG6409		
CG6486		Peroxisomzielsteuerung
CG6518 *	inaC	Proteinkinase C; Rezeptorproteinkinase; Proteinkinase Serin/Threonin; Intrazelluläre Signalkaskade; Protein Phosphorylierung; Transmission /Nervenimpuls
CG7048 (3)		Proteinfaltung;
CG7081 (3)		ubiquitin-protein ligase activity; bindet Zinkionen; peroxisome organization and biogenesis; Proteinubiquitinierung
CG7094 (3) *		Rezeptorproteinkinase; Intrazelluläre Signalkaskade; Protein Phosphorylierung
CG7220		Ubiquitinkonjugierung; Proteinmodifizierung; Proteolyse/Peptidolyse
CG7436 (3) *	Nmt	
CG7815 (3) *	ran-like	Proteinzielsteuerung; Vesikeltransport
CG8057 (3)		Rezeptorproteinkinase; Protein Phosphorylierung
CG8226	Tom7	
CG8351 (3) *		Protein Phosphorylierung; Proteinfaltung
CG8358 (3)		bindet Zinkionen; Proteolyse/Peptidolyse; Signaltransduktion
CG8485 (3)		ATP binding; SAP kinase activity; Proteinkinase Serin/Threonin; Protein Phosphorylierung
CG8494 (3)		Ubiquitinabhängiger Proteinkatabolismus
CG8542 (3)	Hsc70-5	Immunabwehr; Proteinfaltung; Hitzeschockantwort
CG8636 (3)		Bindet RNA; Translationsfaktor
CG8669	crc	Transkriptionsfaktor; Proteinheterodimerisation; Transkriptionsregulation
CG8885 (3)		Oxidoreduktase; Kupferchaperon; Elektronen transport; oxidative phosphorylation
CG9054 (3)	Ddx1	Helikase
CG9334	Spn3	Proteolyse/Peptidolyse
CG9347 (3) *	ninaB	Monooxygenase; visuelle Wahrnehmung
CG9455		Proteolyse/Peptidolyse
CG9769		Zelltod; Translationsfaktor
CG9934 (3) *		Immunabwehr; Proteinubiquitinierung; Stressantwort
CG9946 (3)	eIF-2alpha	GTP binding; tBindet RNA; translation initiation factor activity; formation of translation initiation ternary complex; translational initiation

Tabelle 3.18 Stärker im WT' exprimierte Gene die in Verbindung mit Ubiquitinierung stehen, aus dem Vergleich Wildtyp *Drosophila melanogaster* mit Synuclein exprimierenden Tieren. Aufgeführt sind die CG Nummer , das Symbol und die molekularen Prozesse bzw. biologischen Funktionen an den sie beteiligt sind.

CG-Nummer	Symbol	Molekulare Funktionen und biologische Prozesse an denen sie beteiligt sind
CG17030		Ubiquitinkonjugierung; Proteinmetabolismus; Proteinmodifizierung
CG7220		Ubiquitinkonjugierung; Proteinmodifizierung; Proteolyse/Peptidolyse

Tabelle 3.19 Stärker im WT' exprimierte Gene die in Verbindung mit Neurotransmittertransport- und Metabolismus stehen, aus dem Vergleich Wildtyp *Drosophila melanogaster* mit Synuclein exprimierenden Tieren. Aufgeführt sind die CG Nummer , das Symbol und die molekularen Prozesse bzw. biologischen Funktionen an den sie beteiligt sind.

CG-Nummer	Symbol	Molekulare Funktionen und biologische Prozesse an denen sie beteiligt sind
CG7708		Acetylcholinmetabolismus
CG3318 (3) *	Dat	Aralkylamine N-acetyltransferase Verhalten; Dopamin/Octopamin/Serotoninmetabolismus; Pigmentierung; Schlaf-Wachrhythmus

Tabelle 3.20 Stärker im WT exprimierte Gene die in Verbindung mit Lokomotion stehen, aus dem Vergleich Wildtyp *Drosophila melanogaster* mit Synuclein exprimierenden Tieren. Aufgeführt sind die CG Nummer, das Symbol und die molekularen Prozesse bzw. biologischen Funktionen an den sie beteiligt sind.

CG-Nummer	Symbol	Molekulare Funktionen und biologische Prozesse an denen sie beteiligt sind
CG15862 (3)	Pka-R2	Rezeptorproteinkinase cAMPabhängig, Verhalten; Tagesrhythmus; Bewegungsrhythmus; Signaltransduktion
CG1912 (3)	Gycalpa99B	G-Protein gekoppelte Rezeptorprotein; NO vermittelte Signaltransduktion; positive Phototaxis
CG3139 (3)	syt	Kalzium vermittelte Phospholipidbindung; Kalziumbindung; Exozytose; Proteintransport; lokomotorisches Verhalten; Neurotransmittersekretion; Vesikeltransport (Exocytose/Endocytose)
CG3772 *	cry	G-Protein gekoppelter Photorezeptor; G-Protein gekoppelte Rezeptorprotein; Tagesrhythmus; gravitactic Verhalten
CG5650 (3)	Pp1-87B	protein serine/threonine phosphatase activity; protein phosphatase type 1 activity; Lokomotion; Verhalten; Lernen und Erinnerung; Neurogenese; olfaktorisches Lernen
CG9908 (3)	disco	Transkriptionsfaktor; bindet Zinkionen; Gehirnentwicklung; Tagesrhythmus; Bewegungsrhythmus

Tabelle 3.21 Stärker im WT exprimierte Gene mit Signaltransduktions-Aktivität, aus dem Vergleich Wildtyp *Drosophila melanogaster* mit Synuclein exprimierenden Tieren. Aufgeführt sind die CG Nummer, das Symbol und die molekularen Prozesse bzw. biologischen Funktionen an den sie beteiligt sind.

CG-Nummer	Symbol	Molekulare Funktionen und biologische Prozesse an denen sie beteiligt sind
CG10481		G-Protein gekoppelte Rezeptor Aktivität; Signaltransduktion
CG10531		Zellkommunikation; Signal transduction
CG1098 (3)		Rezeptorproteinkinase; Intrazelluläre Signalkaskade; Protein Phosphorylierung
CG11063 (3)		Kernrezeptor Aktivität; bindet an Thyroidrezeptor; Transkriptionsfaktor; bindet Zinkionen; Signaltransduktion
CG11348	nAcRbeta-64B	Nicotinischer Acetylcholinrezeptor; Signalübertragung/Synapse
CG11546 (3)	l(2)02045	Regulierung G-Protein gekoppelter Rezeptoren
CG11710		Kernrezeptor Aktivität; Transkriptionsregulation
CG15862 (3)	Pka-R2	Rezeptorproteinkinase; Tagesrhythmus; Bewegungsrhythmus; Protein Phosphorylierung; Signaltransduktion
CG1658		
CG1659	unc-119	Rezeptor; visuelle Perzeption
CG1725 (3) *	dlg1	Guanylat Kinase; asymmetrische Proteinlokalisierung; basale Proteinlokalisierung; Zellproliferation
CG18069 (3)	CaMKII	bindet Calmodulin; Rezeptorproteinkinase; Proteinkinase Serin/Threonin; Kalzium/Calmodulin Signalkaskade; Kurzzeitverhalten; Lernen und Erinnerung; synaptische Übertragung
CG18249 (3)		Rezeptor; Immunabwehr; Signaltransduktion
CG2028 (3)	CkIalpha	Rezeptorproteinkinase; Proteinkinase Serin/Threonin; protein kinase activity; DNA Reperatur
CG2061 (3) *		G-Protein gekoppelter Rezeptor
CG2736 (3) *		Rezeptor; Immunabwehr
CG2905	Nipped-A	Transkriptionsfaktor; Rezeptorproteinkinase; DNA Reperatur; Protein Phosphorylierung; Transkriptionsregulation
CG31163 (3)		SH3/SH2 Adapter
CG31795 (3) *	ia2	transmembran Rezeptorprotein
CG32019	bt	Rezeptorproteinkinase; Proteinkinase Serin/Threonin; Proteinmetabolismus; Proteinmodifizierung; Signaltransduktion
CG32262 (3)		Rezeptor
CG32560 (3)		receptor binding; G-Protein gekoppelte Rezeptorprotein MAPKKK Kaskade; Ras Protein; Signaltransduktion
CG33106	mask	asymmetrische Proteinlokalisierung; Zellproliferation; transmembrane Rezeptorprotein
CG3772 *	cry	G-Protein gekoppelter Fotorezeptor; DNA Reperatur; G-Protein gekoppelte Rezeptorprotein Tagesrhythmus; gravitactic Verhalten
CG3814		N-methyl-D-aspartate Glutamate Rezeptor Aktivität;
CG4006 *	Akt1	Proteinkinase Serin/Threonin; Rezeptorproteinkinase; Protein Phosphorylierung; Protein-Kern Import

CG4012 (3)	gek	Bindet Diacylglycerol; Proteinkinase Serin/Threonin; Rezeptorproteinkinase; Intrazelluläre Signalkaskade
CG40293		
CG5232 (2)	Sas	Proteinglycolisierung
CG5248 (3) *	loco	G-Protein gekoppelte Rezeptorprotein
CG5841 (3)		Rezeptor; Zellproliferation; Proteinmetabolismus; Proteinmodifizierung; Proteinubiquitinierung
CG5855	cni	Gurkenrezeptor; Intrazelluläre Signalkaskade; Proteinlokalisierung
CG5888 (3) *		transmembrane Rezeptor Aktivität
CG6486		Peroxisomsteuerung
CG6518 *	inaC	Diacylglycerolbindung Proteinkinase C; Rezeptorproteinkinase; Transmission /Nervenimpuls
CG7094 (3) *		Rezeptorproteinkinase; Intrazelluläre Signalkaskade
CG8057 (3)		Rezeptorproteinkinase
CG8485 (3)		Proteinkinase Serin/Threonin; Protein Phosphorylierung
CG8622		
CG8639	Cirl	G-Protein gekoppelte Rezeptor Aktivität; Neurotransmittersekretion; Vesikeltransport
CG9345 (3) *	Adgf-C	Wachstumsfaktor
CG9496	Tsp29Fb	Signaltransduktion
CG9611		Ras Protein Signaltransduktion

Tabelle 3.22 Stärker im WT exprimierte Gene mit Transkriptionsfaktor-Aktivität aus dem Vergleich Wildtyp *Drosophila melanogaster* mit Synuclein exprimierenden Tieren. Aufgeführt sind die CGNummer, das Symbol und die molekularen Prozesse bzw. biologischen Funktionen an den sie beteiligt sind.

CG-Nummer	Symbol	Molekulare Funktionen und biologische Prozesse an denen sie beteiligt sind
CG10267		Transkriptionsfaktor; bindet Zinkionen;
CG10269	D19A	Transkriptionsfaktor; Metallopeptidase; bindet Zinkionen; Zellproliferation; Proteolyse/Peptidolyse
CG1057	Trap18	RNA-Polymerase Transkriptionsfaktor; Transkriptionsregulation
CG10327	TBPH	Bindet RNA; Transkriptionsfaktor; Spliceosom;
CG10447		Transkriptionsfaktor; Transkriptionsregulation
CG10959		Transkriptionsfaktor; bindet Zinkionen; Zellproliferation; Transkriptionsregulation
CG11063 (3)		Kernrezeptor Aktivität; bindet an Thyroidrezeptor; bindet Zinkionen; Transkriptionsregulation, Signaltransduktion;
CG11502 (2)*	svp	Kernrezeptor Aktivität; Rezeptor Aktivität; Transkriptionsfaktor; Steroidhormon Rezeptor Aktivität; Entwicklung des Nervensystems; Signalübertragung/Synapse; Phototaxis; Signaltransduktion
CG11172	NFAT	RNA-Polymerase Transkriptionsfaktor; Immunabwehr; Zytokine/Chemokine Signalübertragung Transkriptionsregulation
CG11710		Kernrezeptor Aktivität; Transkriptionsregulation
CG11798	chn	Transkriptionsfaktor; bindet Zinkionen; Neurogenese;
CG12399 (2)	Mad	Transkriptionsfaktor;; transforming growth factor beta receptor, pathway-specific cytoplasmic mediator activity; Zellkommunikation; Intrazelluläre Signalkaskade; Transkriptionsregulation
CG12653	btd	RNA-Polymerase Transkriptionsfaktor; bindet Zinkionen; Transkriptionsregulation
CG14802		RNA-Polymerase II Funktion;
CG14938	crol	RNA-Polymerase Transkriptionsfaktor; bindet Zinkionen; Zellproliferation; homoiothermy; Transkriptionsregulation
CG14941 (3)*	esc	DNA binding; Transkriptionsfaktor; N-Methyltransferase (H3-K27 specific); Signaltransduktion; Genkontrolle; Histonmethylierung; Transkriptionsregulation
CG15436		Transkriptionsfaktor; bindet Zinkionen; Zellproliferation; Transkriptionsregulation
CG1602 (3)		Transkriptionsfaktor; bindet Zinkionen; Zellproliferation; Transkriptionsregulation
CG1710 *	Hcf	Transkriptionsfaktor; transcription coactivator activity; Zellproliferation;
CG17183 (3) *	Trap25	RNA-Polymerase II Funktion; Transkriptionsregulation
CG1793	Arc70	Transkriptionsfaktor; RNA-Polymerase II Funktion
CG18124 (2)	mTTF	Transkriptionsende
CG18476 (2)		Transkriptionsfaktor; bindet Zinkionen; Transkriptionsregulation
CG1965 (3) *		Transkriptionsfaktor; Transkriptionsregulation
CG2670 (3)	Taf7	Transkriptionsfaktor; Transkriptionsregulation Transkriptionsregulation,

CG-Nummer	Symbol	Molekulare Funktionen und biologische Prozesse an denen sie beteiligt sind
CG2905	Nipped-A	Transkriptionsfaktor; Rezeptorproteinkinase; DNA Reparatur; Protein Phosphorylierung; Transkriptionsregulation
CG30011	gem	Transkriptionsfaktor; Immunabwehr; Transkriptionsregulation;
CG3025 (3)	mof	Bindet RNA; N-acetyltransferase (H4-K16); Dosis Kompensierung; Histonacetylierung;; peptidyl-lysine acetylation; Transkriptionsregulation
CG3069 (2)	Taf10b	RNA-Polymerase Transkriptionsfaktor; Transkriptionsfaktor
CG31160		Transkriptionsfaktor; Transkriptionsregulation Transmission /Nervenimpuls;
CG32601 *		Transkriptionsfaktor; Transkriptionsregulation,
CG32767		Transkriptionsfaktor; bindet Zinkionen; Zellproliferation;
CG3497	Su(H)	RNA-Polymerase Transkriptionsfaktor; Transkriptionsrepressor; Transporter; Notch Signal; laterale Inhibition; negative Transkriptionsregulation
CG3654 *		DNA binding; Transkriptionsfaktor;Neurogenese; Transkriptionsregulation
CG3851	odd	RNA-Polymerase Transkriptionsfaktor; bindet Zinkionen; Zellproliferation; Transkriptionsregulation
CG4143	mbf1	bindet Methyl-CpG; Entwicklung des Nervensystems; Transkriptionsregulation
CG4424 (3)		Transkriptionsfaktor; bindet Zinkionen; Transkriptionsregulation
CG4936 (3) *		Transkriptionsfaktor; bindet Zinkionen; Zellproliferation
CG5748	Hsf	RNA-Polymerase Transkriptionsfaktor; Immunabwehr; Transkriptionsregulation, Hitzeschockantwort
CG6246 (2)	nub	Transkriptionsfaktor; RNA-Polymerase Transkriptionsfaktor
CG6500	Bx	Transkriptionsfaktor; bindet Zinkionen; Zellproliferation; Neurogenese;
CG6686 (3)		Transkriptionsfaktor
CG6755 (3)		Transkriptionsfaktor/Elongation
CG6792		Transkriptionsfaktor; bindet Zinkionen; Zellproliferation;
CG7562 (2)	Trf	RNA-Polymerase Transkriptionsfaktor; Transkriptionsregulation
CG7583	CtBP	Oxidoreduktase, L-serine Biosynthese; negative Transkriptionsregulation
CG7734	shn	RNA-Polymerase Transkriptionsfaktor; Transkriptionsfaktor;; bindet Zinkionen; Zellproliferation; negative Transkriptionsregulation
CG7803 *	z	Transkriptionsfaktor; positive Transkriptionsregulation,
CG7818 (2)		mRNA (2'-O-methyladenosine-N6-)-Methyltransferase Transkriptionsfaktor;
CG7859		
CG7957	Trap80	RNA-Polymerase II Funktion; Transkriptionsregulation
CG8208	MBD-like	bindet Methyl-CpG; Transkriptionsfaktor
CG8669	crc	Transkriptionsfaktor; Proteinheterodimerisation
CG9908 (3)	disco	Transkriptionsfaktor; bindet Zinkionen; Tagesrhythmus; Bewegungsrhythmus

4.0 Diskussion

4.1 Aspekte der Vorgehensweise und Methoden

4.1.1 Vorgehen bis zur ccDNA-Synthese

Eine der wesentlichen Voraussetzungen für diese Arbeit war die Verfügbarkeit einer reproduzierbaren, nicht-kontaminierten Präparation. Dieses kann durch die elektronenmikroskopischen Aufnahmen des Gehirns von *Drosophila melanogaster* gezeigt werden (Abbildung 3.1). *Lamina* und die Teile des Ösophagus wurden bei der Präparation entfernt. Dies ist eine notwendige Voraussetzung für den weiteren Fortgang der Untersuchung, um eine möglichst saubere Isolierung der gesuchten mRNA-Population dieses Gewebes zu gewährleisten.

Die aus den gefriergetrockneten Gehirnen gewonnenen, geringen RNA-Mengen genügen, um sowohl mRNA als auch, davon ausgehend, ausreichende Mengen cDNA zu synthetisieren. Außerdem konnte gezeigt werden, dass die PCR in der exponentiellen Phase der Amplifikation gestoppt wurde, was eine notwendige Bedingung war, um das Verhältnis von niedrig und hoch exprimierten Transkripten nicht zu verschieben. Unter den gegebenen Randbedingungen wurde nur soviel doppelsträngige cDNA amplifiziert, dass in den dokumentierten Auftrennungen einzelner Proben distinkte Banden zu erkennen sind (Abbildung 3.2). Hoch- und niedrig exprimierte Transkripte sind also nur so stark amplifiziert worden, dass sie nach der PCR auch noch in ihrem vorherigen Verhältnis zueinander standen. Mit den Amplifikaten aus der PCR konnte eine hohe Ausbeute an cRNA synthetisiert werden wie die Ergebnisse der photometrischen Quantifizierung zeigen. Die mRNA Ausbeute war in jedem Fall so hoch, dass mit der gewonnenen Menge mehrfach Aminoallyl-modifizierte ccDNA revers transkribiert werden konnte. Die folgende ccDNA-Synthese erbrachte wiederum eine ausreichende Menge ccDNA, die erfolgreich in einem Southern-Blot detektiert wurde (Abbildung 3.6). Durch das dazugehörige Gelfoto wird zusätzlich dokumentiert, dass die Länge der Syntheseprodukte im Bereich zwischen 1000bp und 100bp war. Da die Länge der mRNA normalerweise zwischen 200bp und 10000bp liegt, wirkt sich eine Umsetzung der mRNA in voller Länge ungünstig auf die Detektion kurzer mRNAs aus. Der eingeschränkte Größenbereich wirkt sich daher hier günstig auf die Detektion kurzer mRNA aus, ohne dass längere mRNA unterdrückt werden. Das gleiche gilt für niedrig und hoch transkribierte Gene, die, wie gezeigt, in ihrem relativen Mengenverhältnis zueinander erhalten bleiben. Die synthetisierte und markierte ccDNA konnte erfolgreich zur Hybridisierung eingesetzt werden.

4.1.2 Hybridisierungen auf den *Canada-12k-Drosophila-Microarrays*

Von den 21 auf *Canada-12k-Drosophila-Microarray* erfolgreich durchgeführten Hybridisierungen diente ein Teil der Optimierung des experimentellen Vorgehens. Abweichend von den zum

Canada-12k-Drosophila-Microarray gehörenden Protokoll wurde in dieser Untersuchung die isolierte mRNA-Population in mehreren Schritten umgeschrieben, um die Probenmenge zu vervielfachen und eine Amino-allyl modifizierte ccDNA zu synthetisieren. Die Abweichung besteht darin, dass nach dem Standardprotokoll die isolierte mRNA in einem Schritt in Amino-allyl modifizierte ccDNA umgeschrieben wird. Es findet also kein Verstärkungsschritt statt.

Es wurden mehrere Vorversuche durchgeführt, um die Hybridisierungen unter den veränderten Randbedingungen zu optimieren. Das Ergebnis einer Hybridisierung ist in Abbildung 3.17 gezeigt. Die Fluoreszenz ist für die zu vergleichenden Proben gleich stark, es gibt keine Hintergrundfluoreszenz oder störende Verschmutzungen. Die Methode der ccDNA-Synthese konnte optimiert werden und führte zu auswertbaren Hybridisierungen.

4.1.3 Normalisierung und Korrelationsplot

Der für den Vergleich zwischen Wildtyp gegen Synuclein_{A30P} 45Tage gezeigte Korrelationsplot, stellt die Intensitäten, die für die zu vergleichenden Proben gemessen wurden mit ihrem Hybridisierungsort (Punkt) in einen Zusammenhang (Abbildung 3.18). Die für beide Farbstoffe gemessene Intensität wird auf den Achsenabschnitten abgetragen und korreliert. Es wurde eine Normalisierung durchgeführt. Die linke Seite der Abbildung zeigt die Situation vor der Normalisierung, die rechte Seite nach der Normalisierung. Während sich die Intensitäten zunächst um den Faktor 0,5 unterschieden, und sehr viele Hybridisierungsereignisse als differentiell angesehen würden (sie liegen links der roten Linie) ändert sich die Situation nach der Normalisierung. Die Werte werden durch die Normalisierung einander angeglichen und sind dann so aufbereitet (wenige Werte liegen links der roten Linie), dass die Hybridisierungen verglichen und die Ratio berechnet werden kann. Es kann also gezeigt werden, wie sich kleinere Unterschiede der Intensitäten ausgleichen lassen und damit sinnvolle Vergleiche durchführen liessen.

4.1.4 Farbaustausch (*Dye-Flip*)

Um die Reproduzierbarkeit der Untersuchungen zu belegen, wird für gleiche Proben, die zur Hybridisierung auf zwei verschiedenen Arrays eingesetzt wird, ein sogenannter *Dye-Flip* durchgeführt. Es soll gezeigt werden, dass die bei dieser Untersuchung gewählten Methoden und Vorgehensweisen zu gleichen Ergebnissen für gleiche Proben führen. Für den *Dye-Flip* wurde die Probe, die aus dem Wildtyp-Gehirn 60 Tage isoliert wurde, jeweils mit den beiden Fluoreszenzfarbstoffen gekoppelt und zur Hybridisierung gebracht.

Die Abbildung 3.19 zeigt identische Hybridisierungsmuster für beide Proben die auf den Arrays 12917953 und 128851 hybridisiert wurden. Auch die in der Tabelle 3.7 aufgeführten

Intensitäten sind nahezu identisch. Kleinere Unterschiede lassen sich durch die etwas unterschiedlichen Randbedingungen, bei der Kopplung der Farbstoffe oder den Hybridisierungen erklären. So ist z.B. die Raumtemperatur nicht immer konstant gleich und kann sich etwas auf das Ergebnis der Kopplung der Fluoreszenzfarbstoffe auswirken. Das Hybridisierungsmuster und die gemessenen Intensitäten bleiben aber bei zwei verschiedenen Hybridisierungen nahezu gleich, so dass die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse mit hier verwendeten Methoden und Vorgehensweisen gegeben ist.

4.1.5 Die Verifikation der Methode

Die Hybridisierung des Arrays 12926910 (Vergleich Retina Wildtyp gegen Lamina Wildtyp) wurde zur Überprüfung der in dieser Arbeit verwendeten Methoden und Vorgehensweisen durchgeführt (Abweichung vom Standardprotokoll).

Es zeigte sich, dass bei der Auswertung dieses Arrays eine Reihe von Genen ermittelt werden konnte die differentiell in der Retina exprimiert sind (Tabelle 3.7). Diese Gene konnten nach einem Datenbankvergleich (<http://flybase.bio.indiana.edu>) als retinaspezifisch nachgewiesen werden.

So ist der Klon RH01044 Homolog zum Rhodopsin und wird retinaspezifisch exprimiert. Das Calmodulin (CG8472), welches Metarhodopsin inaktiviert (Porter et al., 1993) oder das Arrestin (CG5962), das an Metarhodopsin bindet (Strissel und Arshavsky, 2004) sind ebenfalls in der Retina exprimiert. So auch die Proteine γ 30A (CG3694) und bifocal (CG1822). Das Protein γ 30A hat eine GTPase-Funktion die in Zusammenhang steht mit Prozessen der Phototransduktion (Schulz et al., 2001). Für das Protein bifocal wurde ebenfalls eine Lokalisation in den Rhabdomeren gezeigt (Bahri et al., 1997). Für die anderen, differentiell exprimierten Gene liegen in den Datenbanken keine weiteren Informationen zu einer Funktion und Lokalisation in der Retina vor. Da aber die Informationen zu Funktionen und Lokalisation aller Gene längst nicht vollständig sind, ist es durchaus möglich, dass diese Gene im Rahmen dieses Vergleichs zum ersten Mal als Retina-spezifisch gezeigt werden konnten.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass mit dieser Kontrolle retinaspezifische Gene detektiert werden konnten, was die Effizienz und Verlässlichkeit der in dieser Arbeit verwendeten Methoden und Arbeitsweisen belegt.

4.2 Visualisierung dopaminerger Neurone durch GFP

Die Visualisierung dopaminerger Neurone durch Expression des GFP mit Hilfe des GAL4/UAS-Systems wird bestätigt durch die immunhistochemischen Untersuchungen zur Verteilung dopaminerger Neurone im Nervensystem von Insekten (Nässel und Elekes, 1992) und insbesondere im Nervensystem von *Drosophila melanogaster* (Abbildung 4.1; Monastirioti,

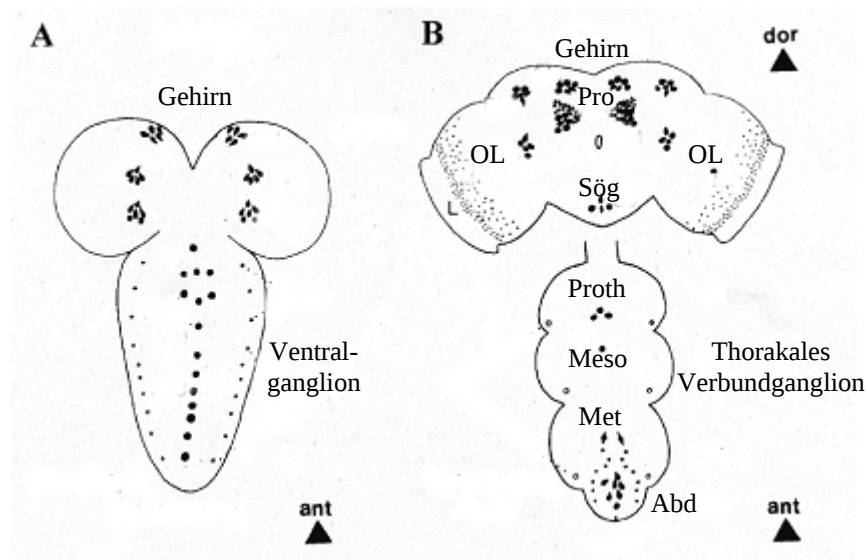


Abbildung 4.1 Lage der dopaminergen Neurone im Nervensystem der Larval- und Adultstadien von *Drosophila melanogaster*. Pro: Protocerebrum, Sög: Subösophagialganglion; OL: Optische Loben; Proth: Prothoraklganglion; L: Lamina; Meso: Mesothorakalganglion; Met: Metathorakalganglion; Abd: Abdominalganglien. Verändert nach Monastirioti, (1999).

1999).

GFP fluoreszierende dopaminerge Neurone finden sich im Nervensystem von Larvalstadien und adulten Tieren. Bei den adulten Tieren gruppieren sie sich größtenteils im mittleren und lateralen Bereich des Protocerebrums (Abbildung 3.9) in der Nähe der Pilzkörper. Außerdem finden sich auch noch verstreut liegende Zellen im Bereich der *Lamina*. Im Ventralganglion der Larven bzw. thorakalen Verbundganglion finden sich die dopaminergen Zellen eher vereinzelt lateral und median aufgereiht (Larve) bzw. in distinkten Bereichen des Verbundganglions (Adulte). Interessant ist die Aufreihung der Neurone im Ventralganglion der Larven. Sie spiegelt die ursprüngliche Form des Strickleiternnervensystems der Insekten wider. Diese Anordnung wird im adulten Tier zugunsten einer Ansammlung in distinkte Bereiche aufgegeben.

Zusätzlich konnte gezeigt werden, in welche Richtungen die axonalen Verbindungen der dopaminergen Zellen gehen. Deutlich wird dies am Beispiel des Nervensystems der L3 Larve. Die Axone des Ventralganglions machen sowohl im Bereich der Thorakalganglien, als auch im Bereich der Abdominalganglien Verbindungen in lateraler Richtung. Dies entspricht den Kommissuren des Strickleiternnervensystems der Insekten. Die abgerissenen Axone der Abdominalganglien (Abbildung 3.8) zeigen zudem, dass dopaminerge Neurone Verbindungen in Richtung des Abdomens haben. Im Gehirn der Larven ziehen Axone von lateral in zentripetaler Richtung auf den mittleren Bereich des Gehirns. Auf welche Zellgruppen die dopaminergen Zellen projizieren, kann hier nicht genau bestimmt werden.

Durch die Frontalansicht der 2D-Rekonstruktion vom adulten Gehirn kann gezeigt werden,

dass dopaminerge Zellen sich auf mehrere Ebenen im Gehirn verteilen. Insbesondere im zentralen Bereich ordnen sich die Zellen von ventral nach dorsal an, was in dieser Form bisher nur durch aufwendige Rekonstruktionen gezeigt wurde (Rein et al., 2000). Diese Anordnung, die dopaminergen Zellen in der Nähe der Pilzkörper zeigen, geben mögliche Hinweise auf die physiologischen Funktionen dieser Zellen z.B. im Zusammenhang mit olfaktorischem Lernen (Schwaerzel et al., 2003)

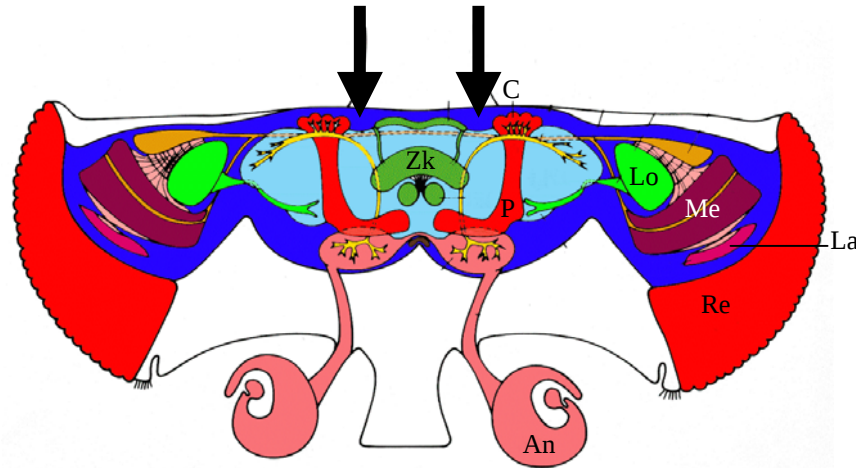


Abbildung 4.2 Gehirn *Drosophila melanogaster* schematisch. Die Lage der dopaminergen Neurone nach der 2D-Rekonstruktion sind durch schwarze Pfeile gekennzeichnet. C: *Calyx*; P: Pilzkörper; Re: Retina; La: *Lamina*; Me: *Medulla*; Lo: *Lobula*; Zk: Zentralkörper; An: Antennalloben. Zeichnung verändert nach Rein et al., 2000.

4.3 Immunhistochemischer Nachweis des Synucleins

Auf den Gehirnschnitten von *Drosophila melanogaster*, die mit dem GAL4/UAS-System gekreuzt wurden, konnte die Synuclein_{wt} Expression nachgewiesen werden (Abbildung 3.13 und 3.15). Sie deckt sich mit der Expression des GFP in den dopaminergen Zellen (Abbildung 3.9). Die zielgerichtete Expression des DDcGAL4-Transkriptionsfaktors in den dopaminergen Zellen und die dadurch induzierte Expression des Synuclein bzw. GFP wird dadurch bestätigt. Die hier gezeigte Expression des Synucleins zeigt, dass das Synuclein_{wt} in Gehirnbereichen oberhalb des Ösophagus, im Bereich des Protocerebrums, exprimiert wird. Ähnliche Ergebnisse finden sich in einer Untersuchung von Feany und Bender (2000), die ebenfalls Synuclein unter der Kontrolle des DDcGal4-Treibers im Gehirn von *Drosophila melanogaster* exprimiert haben (Abbildung 4.3). Diese Abbildungen zeigen die Immunodetektion von Synuclein im Gehirn von *Drosophila melanogaster* nach einem und nach 50 Tagen.

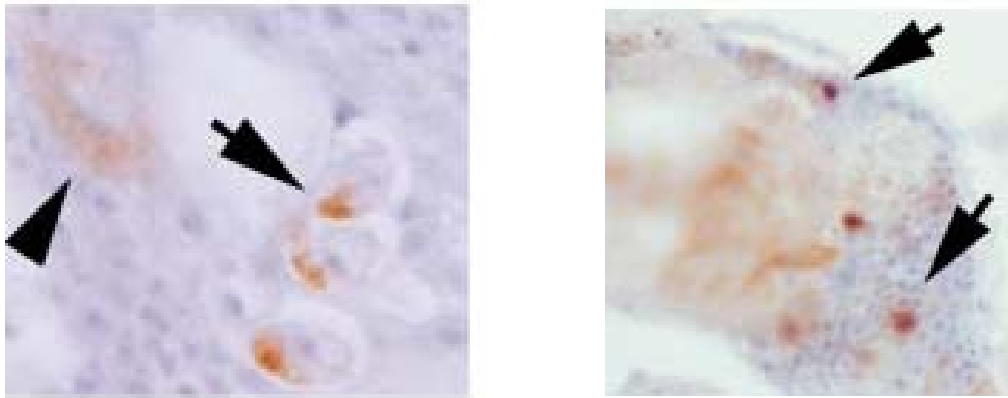


Abbildung 4.3 Immunhistochemische Anfärbung des Gehirns Synuclein_{wt} exprimierender *Drosophila melanogaster* ein Tag nach Schlupf (links) und Synuclein_{A30P} exprimierender *Drosophila melanogaster* 50 Tage nach Schlupf (rechts). Aus: A *Drosophila* model of Parkinson's Disease, Feany und Bender, 2000.

4.4 Expression des Synuclein und Verhalten

4.4.1 Laufaktivität

Die Verhaltensanalysen zeigen, dass durch die Expression des Synucleins im Verlauf der Zeit Verhaltensänderungen sowohl bei der Laufaktivität, als auch bei der Ruheaktivität eintreten. Die Laufaktivität der Synuclein_{wt} und Synuclein_{A30P} exprimierenden *Drosophila melanogaster* nimmt im Zeitverlauf zwischen 10 und 60 bzw. 45 Tagen um 40%, bzw. 20%, im Vergleich zur Kontrollgruppe Wildtyp ab (Diagramm 3.1). Diese Unterschiede sind signifikant.

Noch deutlicher wird dieser Effekt der Verhaltensänderungen bei der Messung der Ruheaktivität (Diagramm 3.2). Hier ist eine Abnahme der Aktivität zwischen 40% und 80% der Synuclein exprimierenden Tiere zu beobachten.

Ähnliche Ergebnisse zur Laufaktivität finden sich in der Arbeit von Feany und Bender (2000). Sie werden durch diese Ergebnisse noch einmal bestätigt. Mit der Einschränkung, dass die Laufaktivität der Wildtyp Kontrollgruppe in der vorliegenden Arbeit bis zum Abschluss der Untersuchungen nicht abgenommen hat (Abbildung 4.4). Dieser Effekt könnte sich darauf zurückführen lassen, dass die Population der Kontrollgruppe eine sehr hohe Überlebensrate hatte und somit die relative Anzahl aktiver Tiere größer war, als in der genannten Vergleichsuntersuchung. Obwohl nicht explizit darauf hingewiesen wird, scheinen die *Drosophila*-Populationen in der Arbeit von Feany und Bender (2000) einen Zeitraum von ca. 40-50 Tagen nicht überlebt zu haben (Abbildung 4.4). Zuma eine Laufaktivität von unter 5% sicher auch negative Auswirkungen auf die Nahrungsaufnahme und damit das Überleben haben dürfte.

Die negativen Effekte der Synuclein_{wt}-Expression in den dopaminergen Zellen auf die Laufaktivität ist ein weiterer Beleg für den Zusammenhang von Dopamin und lokomotorischer Aktivität bei Insekten (Pendleton et al., 2002). Zuma hier nicht nur die

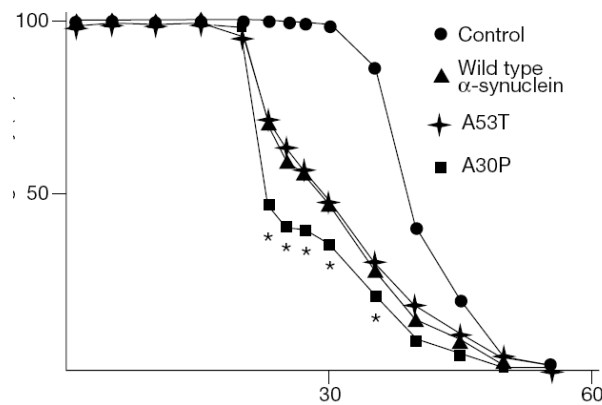


Abbildung 4.4 Gezeigt wird die Veränderung der Laufaktivität Synuclein exprimierender *Drosophila melanogaster* im Vergleich zum Wildtyp (Laufaktivitätstest). Synuclein_{wt}, die mutanten Formen A30P und A53T wurden in den dopaminergen Zellen des Gehirns exprimiert. Die Laufaktivität der Kontrollgruppe (*Control*) lässt zu einem späteren Zeitpunkt nach. (Feany und Bender, 2000)

dopaminergen Zellen im Gehirn, sondern auch die im thorakalen Verbundganglion von der Expression betroffen sind, wo bei Insekten die Steuerung der Bewegungsabläufe lokalisiert ist (Ryckebusch et al., 1994). Die Untersuchung der Laufaktivität beruht jedoch auf einer „Störung“ (Sensitivierung) der normalen Aktivität durch Herunterklopfen der Tiere, auf die reflexartig als Antwort das Herauflaufen im Glas provoziert wird. Insofern wird zunächst nur die Koordination der Bewegungsaktivität untersucht.

4.4.2 Ruheverhalten

Einen anderen Aspekt könnte die Abnahme der Ruheaktivität zeigen. Hierbei wird nicht nur die Einschränkung der Lokomotion gezeigt, sondern auch die des Antriebs Bewegungen zu initiieren. Die Synuclein exprimierenden Tiere zeigen mit abnehmender Tendenz immer weniger Antrieb sich zu bewegen bzw. Bewegungen zu initiieren (Diagramm 3.2).

Der interessante Aspekt ist, dass sich zwei verschiedene Symptome der Parkinsonschen Erkrankung zeigen lassen. Die eigentliche Störung der Koordination (Laufaktivität) sowie das Problem Bewegungen zu initiieren (Ruheaktivität). Dass sich der zweite Aspekt durch das Tiermodell reproduzieren lässt, wurde noch in keiner anderen Untersuchung gezeigt.

Die Beobachtung, dass bei der Untersuchung der Aktivität sowohl eine Störung der Lokomotion, als auch des Antriebs (Starten von Bewegungen) durch die Expression eines krankheitsrelevanten Proteins im Zeitverlauf zunimmt, wirft die für die Physiologie der Insekten interessante Frage auf, wo und wie bei Insekten Bewegungen initiiert werden.

Sowohl die Untersuchung zur Laufaktivität, als auch zur Ruheaktivität sind ein eindrucksvolles Beispiel dafür, dass die zielgerichtete Expression eines menschlichen Proteins, das in Zusammenhang mit der Genese neurodegenerativer Prozesse steht, im Modellorganismus *Drosophila melanogaster* vergleichbare phänotypische Änderungen zeigt.

4.5 FACS sortierte dopaminerge Neurone und D2-Rezeptor

Die zielgerichtete Expression des GFP in den dopaminergen Zellen des Nervensystems von *Drosophila melanogaster* ermöglichte es, mit der FACS-Sortierung aus der Gesamtpopulation der Nervenzellen die dopaminergen Zellen zu isolieren.

Aus den isolierten GFP-exprimierenden Nervenzellen konnte erfolgreich die mRNA isoliert werden. Nach dem Umschreiben wurde eine fluoreszenzmarkierte ccDNA auf den Arrays zur Hybridisierung gebracht. In Anbetracht der Tatsache, dass die Anzahl der dopaminergen Zellen im Gehirn von *Drosophila melanogaster* relativ gering ist (ca. 5000 aus ca. 250.000 (Celotto et al., 2001) Neurone pro Gehirn), bedeutet die erfolgreiche Hybridisierung einen großen Fortschritt hin zur selektiven Analyse des Expressionsmusters einzelner Gruppen von Neuronen und zur Erstellung eines Transkriptoms von *Drosophila melanogaster*.

4.5.1 Vergleich mit dem *Canada-12k-Microarray*

Der Vergleich des Expressionsmusters zeigte, dass die dopaminergen Zellen einen Querschnitt aller Gene exprimiert, der den auf dem *Canada-12k-Microarray* enthaltenen Genen entspricht (Diagramme 3.3 und 3.4).

4.5.2 Autorezeptor D2

Zur Verifikation des Expressionsmusters wurden aus der Datenbank *Flybase* (<http://flybase.bio.indiana.edu>) für dopaminerge Zellen relevante Gene herausgefiltert. Bei der Analyse der Hybridisierungen dieser Gene fiel auf, dass die dopaminergen Zellen die Dopaminrezeptoren D2 und D2R exprimieren (Tabelle 3.10). Beide Rezeptoren sind G-Protein gekoppelt. Für den Rezeptor D2R (und D1) wurde bisher lediglich eine Lokalisation in den Pilzkörpern von *Drosophila melanogaster* gezeigt (Kokay et al., 1999).

Da es sich aber bei der sortierten Zellpopulation ausschließlich um dopaminerge Zellen handelte, ist zu vermuten, dass es sich um Autorezeptoren handelt. Autorezeptoren dienen

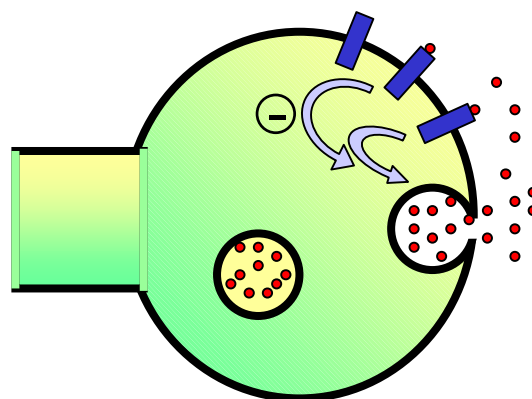


Abbildung 4.5 Autorezeptoren (blau) hemmen den Ausstoß des Transmitters (rot) aus dem Neuron, von/auf dem sie exprimiert sind. Es entsteht eine negative „feed-back“ Schleife.

den Zellen dazu, eine Information über die Menge des ausgeschütteten Transmitters zu geben und so, die eigene Transmitterausschüttung in den synaptischen Spalt zu kontrollieren (Abbildung 4.5). Die Funktion eines Autorezeptors konnte zwar bei Insekten für Serotoninrezeptoren gezeigt werden (Gerhardt, 1997) aber bisher noch nicht für die Dopaminrezeptoren D2 und D2R bei *Drosophila melanogaster*.

4.6 Differentiell exprimierte Gene

4.6.1 Stärker im Wildtyp exprimierte Gene zu allen Untersuchungszeitpunkten

Es wurden 37 Gene gefunden, die zu allen Untersuchungszeitpunkten differentiell exprimiert wurden. Unter diesen Genen wäre vor allem das Gen Sod2 zu erwähnen. Es handelt sich dabei um das Gen für die Superoxid-Dismutase, die zur Entsorgung von ROS dient und so neuroprotektive Wirkung entfaltet. Eine Überexpression dieses Gens bei *Drosophila melanogaster* führt zur Verlängerung der Lebensspanne (Sun et al., 2000). Die Genprodukte anderer Gene haben Aufgaben, wie Proteolyse (CG1857) oder intrazellulären Proteintransport (CG5510). Das Fehlen dieser Gene könnte negative Folgen für die Synuclein exprimierenden Neurone haben, da sie dann nicht mehr in der Lage wären das Synuclein zu entsorgen, bzw. ROS zu entfernen, was ihre Degeneration noch beschleunigen würde. Ob die differentielle Genexpression dieser Gene Ursache oder Folge der fortschreitenden Degeneration ist, müsste näher untersucht werden.

4.6.2 Differentielle (stärker exprimierte) Gene im Wildtyp

Im Folgenden sollen Gene, die im Verlauf der Untersuchung als differentiell d.h. stärker exprimiert im Wildtyp gefunden wurden, besprochen werden. Da es sich um eine große Anzahl von Genen handelt, wurde für diese eine Auswahl getroffen (Tabelle 3.14). Für diese Gene lässt sich folgendes Modell entwerfen: Bei der Kontrollgruppe *Drosophila melanogaster* dessen Genexpressionsmuster im Gehirn, als der „Normalzustand“ definiert werden kann, sind einige hundert (mit steigender Tendenz) Gene exprimiert, die bei der Synuclein_{wt} und Synuclein_{A30P} schwächer exprimiert sind. Sie sind aber nicht vollständig aus dem Genexpressionsmuster der Synuclein exprimierenden *Drosophila melanogaster* verschwunden, sondern hier eben nur schwächer exprimiert als im Wildtyp.

Dies liegt wahrscheinlich daran, dass der Anteil des Expressionsmusters der dopaminergen Zellen aufgrund der Degeneration aus dem Gesamtexpressionsmusters des Gehirns nahezu verschwunden ist. Dies wird auch belegt durch das Ergebnis, dass 98% der differentiellen Gene, die im Wildtyp exprimiert sind, in der Anzahl der Gene die für die dopaminergen Zellen gefunden wurden, enthalten sind. Exprimierte Gene in dopaminergen Zellen und differentielle Gene im Wildtyp müssen also in einem Zusammenhang stehen. Trotzdem sollen

an dieser Stelle einige differentiell exprimierte Gene besprochen werden, weil sie Aufschluss geben können über Abläufe, die im Verlauf neurodegenerativer Prozesse auftreten und weil sie die physiologischen Prozesse des „Normalzustands“ im Gehirn von *Drosophila melanogaster* repräsentieren. Außerdem sagen diese Gene auch etwas über die spezifisch in den dopaminergen Zellen exprimierten Gene aus, weil sie sozusagen gleichzeitig mit der Degeneration dieser Zellen aus dem Expressionsmuster verschwinden bzw. weniger exprimiert werden.

Einige dieser Gene bzw. ihrer Genprodukte stehen in einem direkten Zusammenhang mit physiologischen Prozessen, die sich unter dem Oberbegriff Neuroprotektion zusammenfassen lassen.

4.6.2.1 Antioxidative Funktion

Zur Gruppe der Gene die eine antioxidative Funktion haben, gehören das Gen Trxr1 (CG2151) oder Prx5037 (CG5826) (Tabelle 3.15). Diese Gene müssen als wichtige Kandidaten angesehen werden, da insbesondere oxidativer Stress in vielen Veröffentlichungen als entscheidend für die Genese der Parkinsonschen Krankheit angesehen werden (Smith et al., 1991; Mecocci et al., 1993). So gehört die Entsorgung von H_2O_2 zu den wichtigen Aufgaben, die von den Zellen geleistet werden müssen (Halliwell, 1993).

Dies wird zum Beispiel von dem Genprodukt des Gens Prx5037 erledigt, das zu einer Familie von Genen gehört, deren Genprodukte Wasserstoffperoxid abbauen und so zum Schutz der Zelle beitragen (Orr et al., 2001). Auch die Entstehung anderer ROS beim Katabolismus des Dopamins innerhalb der Zelle gibt Anlass zu der Annahme, dass nur deren ständige und vollständige Entsorgung die Zelle vor degenerierenden Prozessen schützt. So wurde für das Genprodukt des Gens Trxr1 (Thioredoxinreduktase) gezeigt, dass es durch Übertragung von Reduktionsäquivalenten auf Thioredoxin wesentlich zur Entsorgung von ROS beiträgt (Missrilis et al., 2001). Dies kann natürlich nur dann der Fall sein, wenn entsprechende Gene in ausreichender Menge, kontinuierlich exprimiert werden. Wenn dies, wie in vorliegender Untersuchung gezeigt, nicht der Fall ist, kann eine Beschleunigung dieser Prozesse zu entscheidenden Nachteilen für das Überleben der dopaminergen Zellen führen. Die Summe differentiell exprimierter Gene, mit antioxidativer Funktion steigt mit zunehmenden Alter. Dies bestätigt den bekannten progradienten Verlauf der Degeneration dopaminerger Zellen wie er auch bei der Parkinsonschen Erkrankung beobachtet wird.

4.6.2.2 Apoptose Gene

Apoptotose Gene sind dann besonders interessant für eine induzierte Apoptose Synuclein_{wt} exprimierender dopaminerger Zellen, wenn sie im Verlauf der Untersuchung zu einem späten

Zeitpunkt oder zu allen Zeitpunkten als differentiell erscheinen. Sie wären dann mit der Degeneration dieser Zellen aus dem Expressionsmuster verschwunden. Dies ist zum Beispiel der Fall für das Gen Trxr-1, das schon an anderer Stelle diskutiert wurde. Die Gene CG1643 und CG1709 erscheinen erst am Zeitpunkt nach 60 Tagen als differentiell und könnten daher bei der induzierten Apoptose dopaminerger Zellen eine Rolle spielen (Tabelle 3.16). Für das Gen 17019 gibt es bisher aber nur aufgrund seiner Aminosäuresequenz eine Vorhersage als Ubiquitin-Protein Ligase, welche mit Apoptose in Verbindung gebracht werden. Das Gen CG 1643 wurde in den Untersuchungen von Gorski et al. (2003) und Lee und Bachrecke (2000) für apoptotische Funktionen beschrieben.

Apoptotische Gene, die zu Beginn der Untersuchung als differentiell erscheinen, später aber nicht mehr, zeigen an, dass Apoptose und Anti-Apoptose während der ganzen Lebensspanne offensichtlich eine Rolle spielen und sich möglicherweise gegenseitig regulieren. Dies könnte für die Gene Akt1 (CG4006) und cathD (CG1548) der Fall sein. Das Gen Akt1 wird u.A. im Zusammenhang mit der Hemmung der Apoptose im PI3K/Akt1-Signalweg beschrieben (Songyang et al., 1997).

4.6.2.3 Proteinkatabolismus

Eine weitere Gruppe von Genen, die im Zusammenhang mit Prozessen der Proteinprozessierung/Faltung und des Proteintransports/Abbaus stehen, wie DoxA2 (CG10484) und Pros β 3 (CG11981), gehören zu den Genen, die in einer weiteren Untersuchung genauer betrachtet werden müssen (Tabelle 3.17). Hier könnte ein Zusammenhang bestehen, mit Prozessen, die durch die Synucleinexpression ausgelöst werden. Es gibt hierzu die Annahmen, dass das Synuclein durch einen nicht korrekten Umsatz und Transport zum einen, durch den Übergang von der gelösten Form in die metastabile, protofibrilläre Form zur Bildung der Lewy-Körper führt (Landsbury et al., 2000). Zum anderen, durch die Regulierung der Phospholipase D2, zur Rekrutierung dopaminerger Vesikel beiträgt (Brundin und Lotharius, 2002). Störungen in letztgenannten Zusammenhang, könnten dann wieder zu zuviel freiem Dopamin im Cytosol und damit zu einer Steigerung der ROS führen, da das freie Dopamin sehr schnell abgebaut wird.

Wie für die Apoptose erörtert, sind auch Gene im Zusammenhang mit Proteinmetabolismus dann interessant, wenn sie zu einem späten Zeitpunkt als differentiell gezeigt werden können. Da dies für eine größere Anzahl differentieller Gene der Fall ist, sollen hier nur einige Gene besprochen werden. Die Gene DoxA2, Pros β 3 oder Pros α 7 (CG1519) werden aufgrund ihrer Aminosäuresequenz als Bestandteile der Proteasomen vorhergesagt und könnten daher der Degradation von Proteinen dienen. Was für die Entsorgung des Synucleins eine wichtige Rolle spielen könnte. Besonders interessant ist hier das Gen DnaJ1 (CG10578), dass auch bei der

Induktion einer anderen neurodegenerativen Erkrankung (Ataxia) bei *Drosophila melanogaster* in Erscheinung getreten ist (Fernandez-Funez et al., 2000). Es wurde hier als Gen identifiziert, dass der korrekten Proteinfaltung und dem Proteinabbau dient. Auch für das Gen Hsp60 (CG12101) wurde eine neuroprotektive Funktion beschrieben. Als Hitzeschock induziertes Chaperon dient es der korrekten Proteinfaltung (Karunanithi et al., 1999). Diese Gene dienen im allgemeinen einer Antwort der Zelle auf Stresssituationen.

4.6.2.4 Ubiquitinylierung

Ein für die Zellen weiterer wichtiger Prozess ist die Ubiquitinylierung von Proteinen. Durch die Ubiquitinylierung werden Proteine für den Abbau vorbereitet. In einem mehrstufigen Prozess der durch die Proteine E1, E2, und E3 katalysiert wird, wird das Ubiquitin auf die abzubauenen Proteine übertragen und so, für den Abbau durch Proteasomen markiert. Die Gene CG17030 und CG7220 wurden aufgrund ihrer Aminosäuresequenz als Ubiquitin-konjugierende Proteine vorhergesagt (Tabelle 3.18). Ihre negative Regulation in den Synuclein exprimierenden *Drosophila melanogaster* könnte anzeigen, dass sie eine wichtige Funktion für den physiologischen „Normalzustand“ des Wildtypgehirns, als auch der degenerierten dopaminergen Zellen haben. Da es sich aber um eine ektopische Expression des Synuclein handelt, kann eine spezifische Funktion in Zusammenhang mit dem Abbau des Synuclein hier nicht postuliert werden.

4.6.2.5 Neurotransmittertransport-und Metabolismus

Die differentielle Expression der Dopamin-Acetyltransferase Dat, (CG3318) (Tabelle 3.19) lässt sich durch die Degeneration der dopaminergen Zellen erklären. Die Dopamin-Acetyltransferase ist am Dopaminkatabolismus beteiligt. Das dieses Gen aber erst nach 60 Tagen als differentiell exprimiert detektiert wird, kann damit erklärt werden, dass es relativ stark exprimiert ist (siehe Expressionsmuster der dopaminergen Zellen, [Tabelle 3.10]). Dies deutet wiederum an, dass die Degeneration der dopaminergen Zellen einem progradienten Verlauf folgt. Es könnte aber auch sein, dass die Zelle fast bis zum Ende ihrer vollständigen Degeneration versucht, durch die starke Expression dieses Gens freies Dopamin umzubauen. Möglicherweise würde dadurch das freie Dopamin einem anderen Katabolismus der zu oxidativen Stress führt entziehen. Zudem lässt sich über die differentielle Expression dieses Gens ein Zusammenhang mit den dramatischen Verhaltensänderungen der Ruheaktivität herstellen. Wie von Shaw et al. (2000) gezeigt, führt das Fehlen dieses Gens bei *Drosophila melanogaster* dazu, dass die Tiere verstärkt in einem Ruhezustand verharren. So stellt sich ein Zusammenhang zwischen Expression dieses Gens, Lokomotion und dopaminergem System her.

4.6.2.6 Lokomotion

Nach der Betrachtung der deutlichen Verhaltensänderungen im Verlauf der Expression des Synucleins liegt es nahe, dass es zu einer verminderten/differentiellen Expression von Genen kommt, die mit der Lokomotion und dem Verhalten zu tun haben (Tabelle 3.20).

Für alle differentiell im Wildtyp exprimierte Gene wird in der Literatur ein Zusammenhang mit Lokomotion und Verhalten hergestellt. So zum Beispiel für das Gen Pka-R2 (CG15862), einer Proteinkinase (Foster et al., 1984), das eine entscheidende Funktion für das Verhalten hat (Sokolowski, 2001). Das Gen Gycalpa99B (CG1912) wiederum hat etwas zu tun mit phototaktischen Verhalten, wie 2001 von Gibbs et al. an Mutanten gezeigt wurde. Für das Gen cry (CG3772) konnte eine Beziehung zum gravitaktischen Verhalten hergestellt werden (Toma et al., 2002).

Für das Gen Synaptotagmin stellen sich neben der Funktion für die Lokomotion (Bodily et al., 2001) noch weitere Verbindungen zur Degeneration dopaminerger Zellen her, wie seine Rolle bei der Transmitterausschüttung (Broadie et al., 1995) und auch ein Zusammenhang mit neurodegenerativen Erkrankungen wie der Huntingtonschen Krankheit (Lee et al., 2003).

4.6.2.7 Signaltransduktion

Differentiell exprimierte Gene der Signaltransduktion könnten eine Rolle spielen bei der Vermittlung von intra-oder extrazellulären Signalen, die der Degradation von Proteinen, der Induktion von Apoptose oder der Initiation der Proteinbiosynthese dienen. Diese wiederum könnten bei neuroprotektiven Prozessen eine Funktion haben. Hier wurde unter anderem das Gen Akt1 (CG4006) gefunden (Tabelle 3.21). Das Genprodukt von Akt1 hat eine Signalvermittelnde Funktion bei der Stabilisierung des Proteins ataxin-1, welches bei der Genese der Spinocerebellären Ataxie Typ 1 eine entscheidende Rolle spielt und am Tiermodell *Drosophila melanogaster* untersucht wurde (Chen, 2003).

4.6.2.8 Transkriptionsfaktoren

Alle Gene die im vorangegangenen diskutiert wurden, können in ihrer Expressionsrate nur dann verändert werden, wenn ihre Expression reguliert wird. Dazu dienen vielfältige intra- und extrazelluläre Kontroll- und Regulationsmechanismen, wie Substratinduktion oder rezeptorvermittelte Transkriptionskontrolle. Es gibt auch Gene, die über eine autoregulative Funktion, die eigene Transkription hemmen als auch fördern (Clock gene). Neben diesen Mechanismen spielen Transkriptionsfaktoren eine bedeutende Rolle. Transkriptionsfaktoren sind Proteine, die aufgrund ihrer Aminosäuresequenz und Konformation eine hohe Bindungsaffinität zur DNA haben. Sie kontrollieren und initiieren hier, in Zusammenspiel mit *Silencern* und *Enhancern*, die Transkription. Die Expression und Kontrolle der

Transkriptionsfaktoren wiederum ist auch regulativen Prozessen unterworfen. Für viele Transkriptionsfaktoren liegen aber bisher nur Daten für ihre Funktion während der Entwicklungsphase vor. Den differentiell exprimierten Transkriptionsfaktoren konnte keine direkte Funktion in Zusammenhang mit Neuroprotektion zugeordnet werden. Für viele dieser Gene gibt es lediglich die Vorhersagen aus ihren abgeleiteten Proteinmotiven, dass sie Transkriptionsfaktoraktivität haben (Tabelle 3.22).

4.6.3 Stärker exprimierte Gene in Synuclein_{wt} Fliegen

Bei den Synuclein_{wt} exprimierenden *Drosophila melanogaster* fällt zunächst auf, dass die Anzahl der differentiellen Gene zu Beginn der Untersuchung hoch ist, und am Ende bis auf zwei Gene abgenommen hat. Wie die GFP exprimierenden Tiere zeigen, findet die Expression des Effektors schon während der Larvalphase statt. Ein Einfluss der Synucleinexpression wird daher auch schon in den Larven und mit dem Beginn der Adultphase vorhanden sein.

Da der Verlauf der Degeneration progredient ist, wie durch die eigenen Verhaltesversuche und z.B. die Untersuchungen von Coulom und Birman (2004) bestätigt wird, ist davon auszugehen, dass am Ende der Untersuchung keine Expression mehr stattfindet. Die dopaminergen Zellen sind vollständig degeneriert. Dies korreliert auch mit der Steigerung der Anzahl differentiell exprimierter Gene im umgekehrten Vergleich. Die degenerierten dopaminergen Zellen können keinen Beitrag mehr zum Gesamtexpressionsmuster des Gehirns von *Drosophila melanogaster* leisten. Dieser Umstand wird auch bestätigt durch die differentielle Expression der Dopamin-Acetyltransferase (Dat) in der Kontrollgruppe Wildtyp nach 60 Tagen.

Anders ist es bei den Synuclein_{wt} exprimierenden *Drosophila melanogaster* im Zeitraum nach 20 Tagen. Die hier differentiell exprimierten Gene können Aufschluss geben, welche zelluläre Antwort die dopaminergen Zellen auf die ektopische Expression des Synucleins geben. Hier wäre zunächst das Gen Eip93F (CG18389) zu nennen, das als Transkriptionsfaktor bei der Einleitung von Apoptose gezeigt wurde (Martin und Baehrecke, 2004; Lee und Baehrecke, 2000). Das Auftauchen dieses Transkriptionsfaktors könnte bedeuten, dass die dopaminergen Zellen einen induzierten Zelltod einleiten. Das Gen Cyp450 (CG1438) (Cytochromoxidase) wird im Zusammenhang mit dem Entgiften von cytotoxischen Noxen erwähnt.

Ausgehend von der These, dass das Synuclein eine Rolle bei der Rekrutierung dopaminerger Vesikel spielt (Zhang et al., 1998), erscheint die differentielle Expression des Gens clc (CG6948) als besonders erwähnenswert, weil die Zelle versuchen könnte, eine durch das Synuclein gestörte Vesikelrekrutierung durch die Expression oder Überexpression dieses Gens zu kompensieren.

Den Genen CG1304 und CG17301 wird aufgrund ihrer Aminosäuresequenz eine Funktion

bei der Degradation von Proteinen vorhergesagt. Sie könnten daher zur Entsorgung des Synucleins exprimiert werden. Für die übrigen hier exprimierten Gene konnten keine spezifischen Funktionen in Bezug auf neuroprotektive Funktionen gefunden werden.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass sich gerade am Zeitpunkt 20 Tage bei den Synuclein_{wt} exprimierenden Fliegen Gene finden, die Zusammenhang mit einer aktiven Neuroprotektion stehen könnten.

4.6.4 Abschließende Betrachtung differentiell exprimierter Gene

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass unter den stärker im Wildtyp exprimierten Genen eine ganze Reihe ist, die neuroprotektive Wirkung haben. Diese Gene erscheinen aber vermutlich deswegen als differentiell, weil sie mit der Degeneration der dopaminergen Zellen aus dem Gesamtexpressionsmuster des Gehirns von *Drosophila melanogaster* verschwinden. Sie scheinen daher eher eine allgemeine neuroprotektive Wirkung zu entfalten und sagen so etwas aus über die normale Physiologie des Gehirns. Es scheint, als ob Neuroprotektion eine notwendige homöostatische Funktion des Gehirns ist, die während der ganzen Lebensspanne abläuft.

Interessanter sind hier die differentiell in den Synuclein exprimierenden Tieren exprimierten Gene. Hier werden offensichtlich Mechanismen in Gang gesetzt, welche die dopaminergen Zellen vor den Folgen der Synuclein-Expression zu schützen.

Die Beteiligung verschiedenster Gene, die dem Proteinabbau, der Endocytose von Vesikeln oder der Rezeptor-vermittelten Induktion von Apoptose dienen lässt darauf schließen, dass es Mechanismen gibt, die eine zelluläre Antwort auf die Expression eines krankheitsrelevanten Gens geben. Welchen Regeln diese Mechanismen folgen kann hier nicht geklärt werden. Auch die differentielle Expression von Transkriptionsfaktoren mit nicht geklärter Funktion gibt ebenfalls einen Hinweis darauf, dass hier Regulationsmechanismen greifen, die die Zelle vor der Degeneration schützen sollen. Die Funktion der hier als differentiell gefundenen Gene bedarf daher weiterer Abklärung.

4.7 Implikationen für neuroprotektive Strategien

Aus den oben gezeigten auftauchen differentiell exprimierter Gene im Zusammenhang mit der Expression des krankheitsrelevanten Proteins Synuclein ergeben sich mögliche Implikationen für neuroprotektive Strategien. Hier wären zunächst Strategien die der Vermeidung von oxidativem Stress dienen zu nennen. Oxidativer Stress kann zu einer Schädigung der Mitochondrien führen und damit Apoptose auslösen (Kermer und Bähr, 2002). Ein von Somayajulu et al., (2005) vorgestellter Weg oxidativen Stress zu verringern, ist die Applikation des Coenzym Q(10), dass die Produktion von ROS einschränkt. Gleiche

Eigenschaften werden für das Hormon 17 beta-estradiol diskutiert (Simpkins et al., 2005). Des weiteren wäre hier die Vermeidung der Exposition mit Insektengiften wie Rotenone und anderen zu nennen, da diese die Atmungskette schädigen und somit Apoptose auslösen können (Li et al., 2003).

Ein weitere Ansatz wäre, die apoptotischen Prozesse selbst zu hemmen. Hier ergeben sich erfolgversprechende Ansätze in der Hemmung der c-Jun Amino-terminal Kinase (JNK), welche proapoptotische Signale in die Zelle vermittelt. Dies kann zum Beispiel durch die Gabe des JNK-Inhibitors CEP-1347 (Saporito et al., 1999) oder ein ausreichendes Angebot an neurotrophen Faktoren geschehen.

Andere Möglichkeiten könnten sich eröffnen, wenn es gelänge, die vermutlich cytotoxischen intermediären Protofibrillen in ihre Ausgangskonformation zurückzuführen, oder sie in den nicht cytotoxischen fibrillären Zustand zu überführen. Dieser Ansatz wurde durch die Aktivierung des Chaperons Hsp70 im Tierversuch gezeigt (Auluck et al., 2005).

Letztlich kann nur die vollständige Aufklärung aller molekularbiologischen Prozesse die der Parkinsonschen Erkrankungen zugrunde liegen, einen Weg aufzeigen diese zu heilen.

4.8 Ausblick

4.8.1 Verifikation der Untersuchung

Um die in dieser Arbeit gemachten Aussagen noch etwas valider erscheinen zu lassen, wäre es wünschenswert, einige Untersuchungen nochmals zu wiederholen. Um eine Verifizierung mit einer unabhängigen Methode zu ermöglichen, sollten Gene, die als differentiell exprimiert angesehen werden mit geeigneten Primern mit Hilfe der Real-time PCR untersucht werden. In einigen Fällen wäre eine Lokalisierung der Genprodukte mit Hilfe von Antikörpern sinnvoll.

4.8.2 Erweiterung der GAL4-UAS-Methode

Um die dieser Arbeit zugrunde liegende Untersuchung in Bezug auf das untersuchte Gewebe bzw. die untersuchten Zellgruppen einzuschränken, soll an dieser Stelle eine Einengung des zu untersuchenden Zellmaterials beschrieben werden.

Durch gleichzeitige Expression des Synucleins und des GFP kann eine Isolierung der dopaminergen Zellen durch FACS-Analyse zu den gewählten Altersstufen stattfinden. Damit könnte gewährleistet werden, dass in die Untersuchung ausschließlich die betroffenen Zellen eingehen. Zum einen könnten somit Störfaktoren, welche durch die Präparation des gesamten Gehirns entstehen könnten ausgeschaltet werden und zum anderen, die durch die Amplifikation provozierten Verschiebungen des Expressionsmusters verringert werden.

Die gemeinsame Expression des Synuclein mit dem GFP könnte durch Klonierung der Sequenzen beider Proteine in einer Kasette mit anschließender Einschleusung des Vektors

mittels P-Element Insertion ins Genom stattfinden. Eine andere Möglichkeit wäre durch Einkreuzen einer GFP tragenden und einer Synuclein tragenden Effektorlinie gegeben. Anschließend würde eine Kreuzung mit der DDC-GAL4 Treiber-Linie erfolgen. Die hieraus entstehende Filialgeneration würde sowohl das GFP, als auch das Synuclein in den dopaminergen Zellen exprimieren.

Vorraussetzung für dieses Vorgehen ist das Vorhandensein sogenannter Balancer bzw. Doppelbalancer Linien. Balancer Chromosomen enthalten eine Inversion, welche ein Crossing-over mit dem homologen Chromosom stattfindet, einen Selektionsmarker wie *curly wings* und einen rezessiven Letalfaktor. Sinn dieser Konstruktion ist es eine Mutation bzw. ein eingeschleustes Gen, wie GFP in einer heterozygoten Form in einer Linie zu halten. Eine Doppelbalancer-Linie würde auf zwei Chromosomen (Chromosom 2. und 3.) diese Eigenschaft enthalten. Die Selektionsmarker zeigen einem dabei phänotypisch an, dass das entsprechende Balancer-Chromosom noch vorhanden ist, während der rezessive Letalfaktor den homozygoten Zustand des Balancers verhindert.

Die zu verwendenden Doppelbalancer-Linien würden zunächst mit der einen Effektorlinie 1 (z.B. GFP) gekreuzt. Durch Rückkreuzung der F1 mit sich selbst, würde ein genotypischer Zustand hergestellt, in dem die Effektor-Gene homozygot vorlägen und nur noch ein Balancer-Chromosom mit entsprechendem Marker vorhanden wäre. Das gleiche Vorgehen würde für die Effektorlinie 2 (z.B. wt-Synuclein) angewandt. Beide erzeugten Linien würden gekreuzt und rückgekreuzt, so dass die folgende Filialgeneration einen Zustand hätten, in dem beide Effektor-Gene in homozygoten Zustand vorlägen. Diese Linie würde dann mit der

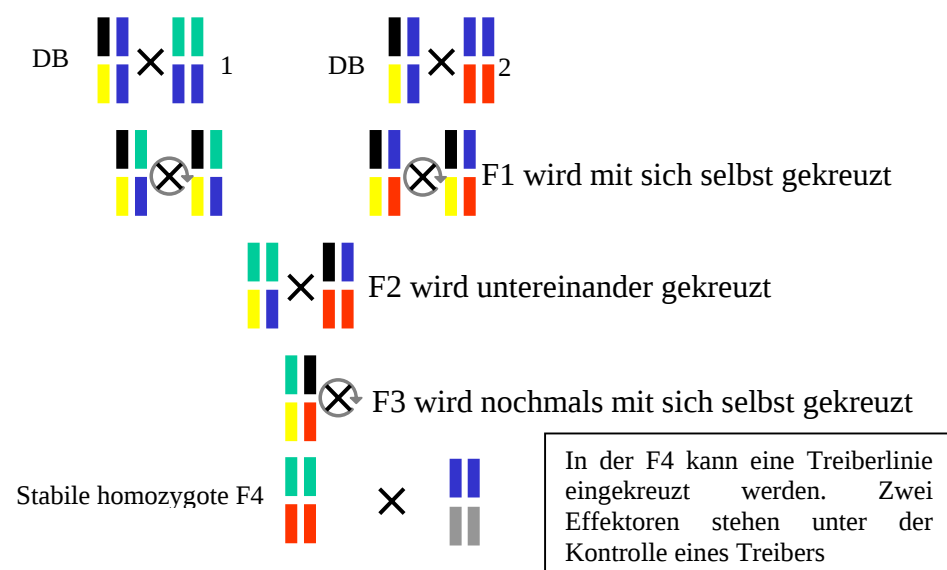


Abbildung 4.6 Erweiterung der GAL4/UAS-Methode: Die Doppelbalancer-Linie (schwarz/gelb) wird gekreuzt mit den Effektorlinien 1 (grün/blau) und 2 (blau/rot). Nach der Kreuzung der F1 mit sich selber, werden beide F2 miteinander gekreuzt. Diese Generation wird nochmals mit sich selbst gekreuzt und hat dann stabil die beiden gewünschten Effektoren im Genom z.B. UAS-GFP und UAS-Synuclein. In der F4 wird dann der Treiber eingekreuzt und beide Effektoren werden unter der Kontrolle eines Treibers exprimiert, z.B. in den dopaminergen Zellen.

Treiberlinie (DDc-GAL4) gekreuzt, so dass es in der nächsten Filialgeneration zur Expression beider Effektor-Gene im Zielgewebe kommt, d.h. in diesem Fall, Expression von GFP und Synuclein in den dopaminergen Zellen von *Drosophila melanogaster*.

4. 8.3 Pharmakologie und genetische Veränderung

Wie in pharmakologischen Versuchen zur Induktion der Parkinsonschen Krankheit mit z.B. 6-hydroxydopamine (6-OHDA) oder MPP(+) an anderen Modellorganismen (*C. elegans*) gezeigt werden konnte, dass sich Erkenntnisse über die Etiologie und Auswirkung der Parkinsonschen Krankheit gewinnen lassen, gilt es zu untersuchen, ob und wie sich dieses Vorgehen auf *Drosophila melanogaster* und das Genexpressionsmuster übertragen lässt. Lassen sich weiterhin durch genetische Veränderung des Modellorganismus die Auswirkungen der genannten Pharmaka kompensieren? Weiterhin könnte untersucht werden, wie die Wirkung von Pharmaka, welche derzeit gegen Parkinson bzw. zur Kompensation der Symptome dieser Krankheit eingesetzt werden (L-DOPA) sich im Tierversuch auf das Genexpressionsmuster auswirken.

Es stellt sich weiterhin die Frage, ob die erkannten Auswirkungen der Induktion der Parkinsonschen Erkrankung durch Expression Synuclein auf molekularer Ebene durch bestimmte Pharmaka unterdrückt werden kann.

Bezüglich der ektopischen Expression des Synuclein stellt sich die Frage, ob die beobachteten Effekte auf die Expression des kompletten Synucleinmoleküls zurückzuführen sind, oder ob lediglich ein Teil des Moleküls (z.B. Amino-Ende) ausreicht, diese Effekte zu hervorzurufen. Gezeigt von Marsh et al. (2000) und Huang et al. (1999) am Beispiel der Polyglutamin-Erkrankung Chorea Huntington. Man könnte also damit beginnen, die einzelnen Abschnitte des Synucleins zu exprimieren, und die Auswirkungen auf der genetischen Ebene mit denen der kompletten Expression zu vergleichen. Damit würde man sich gleichzeitig der Fragestellung nähern, welche Abschnitte im Synuclein-Protein entscheidende Rollen spielen.

Ein anderer Aspekt ist die genetische Veränderung des Modellorganismus, welche die Auswirkung der Parkinsonschen Erkrankung kompensieren könnte. So wurde gezeigt, dass die Coexpression des Hitzeschockproteins 70 (Hsp 70) einen positiven Effekt auf die Überlebensrate der Nervenzellen hatte, in denen das wt-Synuclein expremiert wurde. Dies könnte ein interessanter Ansatz zu weitergehenden Untersuchungen sein.

5.0 Zusammenfassung

Zusammenfassend ist festzuhalten, dass die in der Einleitung gestellten Fragen geklärt werden konnten. Dopaminerge Zellen im Nervensystem von *Drosophila melanogaster* konnten mit Hilfe des GAL4/UAS-Systems visualisiert werden. Nach der FACS-Analyse dieser Zellen wurden erfolgreich Hybridisierungen auf dem *Canada-12k-Drosophila-Microarray* durchgeführt, wodurch das Expressionsmuster dieser Zellen evaluiert werden konnte. Hier wurden Hinweise für die noch nicht gezeigte Expression eines Autorezeptors gefunden.

Das krankheitsrelevante Gen Synuclein wurde in den dopaminergen Zellen exprimiert, was durch immunhistochemischen Nachweis und Verhaltensversuche belegt wurde. Die Verhaltensversuche zeigten einen noch nicht gezeigten Effekt auf die Ruheaktivität.

Das Genexpressionsmuster des Gehirns von *Drosophila melanogaster* konnte erfolgreich, durch Hybridisierung mit dem *Canada-12k-Drosophila-Microarray*, dargestellt werden. Damit konnte auch ein wichtiger Beitrag zur Aufklärung des Expressionsmusters im Gehirn von *Drosophila melanogaster* geleistet werden. Im Vergleich zwischen Synuclein exprimierenden *Drosophila melanogaster* und der Kontrollgruppe Wildtyp fanden sich dynamische Veränderungen des Genexpressionsmusters im Zeitverlauf. Die Genexpressionsrate der Synuclein exprimierenden Tiere änderte sich mit abnehmender Tendenz. Gleichzeitig wurden zu Beginn der Untersuchung bei diesen Tieren Gene exprimiert, die sich im Wildtyp nicht wiederfanden. Differentiell exprimierte Gene wurden auf einen Zusammenhang mit Funktionen und Prozessen der Neuroprotektion in verschiedenen Datenbanken abgefragt und dokumentiert. Für einige dieser Gene ergab sich ein Zusammenhang mit Funktionen, wie Proteinmetabolismus, Vesikeltransport oder Apoptose, die Anlass zu der Hypothese geben, dass die dopaminergen Zellen auf zellulärer Ebene eine Antwort auf die Expression des krankheitsrelevanten Gens Synuclein geben.

6.0 Literaturverzeichnis

- Abeliovich A, Schmitz Y, Farinas I, Choi-Lundberg D, Ho WH, Castillo PE, Shinsky N, Verdugo JM, Armanini M, Ryan A, Hynes M, Phillips H, Sulzer D, Rosenthal (2000)** A.Mice lacking alpha-synuclein display functional deficits in the nigrostriatal dopamine system. *Neuron*. Jan;25(1):239-52.
- Auluck, P.K.Meulener MC, Bonini NM.** (2005) Mechanisms of Suppression of {alpha}-Synuclein Neurotoxicity by Geldanamycin in *Drosophila*. *J Biol Chem*. Jan 28;280(4):2873-8. Epub 2004 Nov 18.
- Bahri SM, Yang X, Chia W.,** (1997) The *Drosophila* bifocal gene encodes a novel protein which colocalizes with actin and is necessary for photoreceptor morphogenesis. *Molec. Cell. Biol.* 17(9): 5521--5529
- Bangs, P., Franc, N. and K White** (2000) Molecular mechanisms of cell death and phagocytosis in *Drosophila*, *Cell Death and Differentiation*. 7, 1027 ± 1034
- Beal, F.M.** (2001) Experimental Models of Parkinsons disease. *Nature Neuroscience* 5 (2); 325-332
- Bicker G, Schäfer S, Ottersen OP und J Storm-Mathisen** (1988). Glutamate-like immunoreactivity in identified neuronal populations of insect nervous systems. *J Neurosci* 8, 2108-2122.
- Biffo S, Marchisio PC.** The identification of signaling molecules by the yeast 2-hybrid system. In: *Adhesion Proteins Protocols, Methods in Molecular Biology Series*, vol. 96, E. Dejana, M. Corada Eds, Humana Press Inc, Totowa, NJ 1999; 211-220.
- Bodily, K.D., Morrison, C.M., Renden, R.B., Broadie, K.** (2001) A novel member of the Ig superfamily, turtle, is a CNS-specific protein required for coordinated motor control. *J. Neurosci.* 21(9):3113—3125
- Bower JH, Maraganore DM, McDonnell SK, Rocca WA.** (1999) Incidence and distribution of parkinsonism. *Neurology* 52:1214–20
- Brautigam C, Steenbergen-Spanjers GC, Hoffmann GF, Dionisi-Vici C, van den Heuvel LP, Smeitink JA, Wevers RA.** (1999) Biochemical and molecular genetic characteristics of the severe form of tyrosine hydroxylase deficiency. *Clin Chem*. Dec;45(12):2073
- Broadie, K., Prokop, A., Bellen, H.J., O'Kane, C.J., Schulze, K.L., Sweeney, S.T.** (1995) Syntaxin and synaptobrevin function downstream of vesicle docking in *Drosophila*. *Neuron* 15(3):663—673
- Brundin P., Lotharius J.** (2002) Pathogenesis of Parkinsons disease: Dopamine, vesicles and α -Synuclein. *Nat Rev Neurosci.* Dec;3(12):932-42.

- Buccafusco JJ, Beach JW, Terry AV Jr, Doad GS, Sood A, Arias E, Misawa H, Masai M, Fujii T, Kawashima K** (2004) Novel analogs of choline as potential neuroprotective agents. *J Alzheimers Dis.* Dec;6(6 Suppl):S85-92.
- Celotto Alicia M. Graveley Brenton R.** (2001) Alternative Splicing of the *Drosophila* Dscam Pre-mRNA Is Both Temporally and Spatially Regulated *Genetics* 159: 599–608 (October)
- Chen Z. et al.** (2003) Interaction of Akt-phosphorylated ataxin-1 with 14-3-3 mediates neurodegeneration in spinocerebellar ataxia type 1. *Cell* 113(4): 457--468
- Claassen DE, Kammer AE.** (1986) Effects of octopamine, dopamine, and serotonin on production of flight motor output by thoracic ganglia of *Manduca sexta*. *J Neurobiol.* Jan;17(1):1-14.
- Clayton, D.F. and George, J.M.** (1998) The synucleins: a family of proteins involved in synaptic function, plasticity, neurodegeneration and disease. *Trends Neurosci.* 21, 249–254.
- Clayton, D.F. and George, J.M.** (1999) Synucleins in synaptic plasticity and neurodegenerative disorders. *J. Neurosci. Res.* 58 (1),120–129.
- Conway KA, Lee SJ, Rochet JC, Ding TT, Williamson RE, Lansbury PT Jr.** (2000) Acceleration of oligomerization, not fibrillization, is a shared property of both α -synuclein mutations linked to early-onset Parkinson's disease: implications for pathogenesis and therapy. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 97, 571–576.
- Conway, K.A.:** (1998) Accelerated in vitro fibril formation by a mutant alpha-synuclein linked to early-onset Parkinsons disease. *Nature Medicine* 4, 1318-1320
- Coulom H, Birman S.** (2004) Chronic exposure to rotenone models sporadic Parkinson's disease in *Drosophila melanogaster*. *J Neurosci.* Dec 1;24(48):10993-8.
- Demerec, M.** (1950) *Biology of Drosophila*, John Wiley & Sons, Inc.; New York
- Descarries L, Lemay B, Doucet G, Berger B.** (1987) Regional and laminar density of the dopamine innervation in adult rat cerebral cortex. *Neuroscience.* Jun;21(3):807-24.
- Evans, P.D.** (1980) Biogenic amines in the insect nervous system. *Adv. Insect Physiol.* 15,317-474
- Feany MB, Bender WW.** (2000) A *Drosophila* model of Parkinson's disease. *Nature.* Mar 23;404(6776):394-8.
- Fernandez-Funez, P., Nino-Rosales, M.L., de Gouyon, B., She, W.C., Luchak, J.M., Martinez, P., Turiegano, E., Benito, J., Capovilla, M., Skinner, P.J., McCall, A., Canal, I., Orr, H.T., Zoghbi, H.Y., Botas, J.** (2000) Identification of genes that modify ataxin-1-induced neurodegeneration. *Nature* 408(6808):101—106
- Foster, J.L., Guttman, J.J., Hall, L.M., Rosen, O.M.** (1984) *Drosophila* cAMP-dependent protein kinase. *J. Biol. Chem.* 259(21):13049—13055

- Fuchs G.** (1997) Parkinson disease--problems in long-term treatment. Dopamine agonists optimize L-dopa therapy Fortschr Med. Feb 20;115(5):43-5.
- Fujita SC, Inoue H, Yoshioka T und Y Hotta** (1987). Quantitative tissue isolation from *Drosophila* freeze-dried in acetone. Biochem J 243, 97-104.
- George, J.M.** (2002) The synucleins. Genome Biol. 3, 1–6.
- Gerhardt CC, van Heerikhuizen H.** (1997) Functional characteristics of heterologously expressed 5-HT receptors. Eur J Pharmacol. Sep 3;334(1):1-23.
- Gibbs SM, Becker A, Hardy RW, Truman JW.,** (2001) Soluble guanylate cyclase is required during development for visual system function in *Drosophila*. J. Neurosci. 21(19): 7705--7714
- Gorski, S.M., Chittaranjan, S., Pleasance, E.D., Freeman, J.D., Anderson, C.L., Varhol, R.J., Coughlin, S.M., Zuyderduyn, S.D., Jones, S.J.M., Marra, M.A.** (2003) A SAGE approach to discovery of genes involved in autophagic cell death. Curr. Biol. 13(4):358—363
- Gotzes, F., Balfanz, S., Baumann, A.** (1994) Primary structure and functional characterization of a *Drosophila* dopamine receptor with high homology to human D1/5 receptors. Receptors Channels. 2:131-141
- Graham, D. G.** (1978) Oxidative pathways for catecholamines in the genesis of neuromelanin and cytotoxic quinones. Mol.Pharmacol. 14, 633–643.
- Halliday G. M. Harding A J., Stimson E, Henderson J M.** (2002) Clinical correlates of selective pathology in the amygdala of patients with Parkinson's disease. Brain 125 2431-2445
- Halliwell, B.** (1992) Reactive oxygen species and the central nervous system. J. Neurochem. 59 1609–1623.
- Han KA, Millar NS, Grotewiel MS, Davis RL.** (1996) DAMB, a novel dopamine receptor expressed specifically in *Drosophila* mushroom bodies. Neuron. Jun;16(6):1127-35.
- Honomichl, K.** (1998) Biologie und Ökologie der Insekten Spektrum Akademischer Verlag
- Hsu LJ, Sagara Y, Arroyo A, Rockenstein E, Sisk A, Mallory M, Wong J, Takenouchi T, Hashimoto M, Masliah E** (2000) alpha-synuclein promotes mitochondrial deficit and oxidative stress. Am J Pathol. Aug;157(2):401-10
- Huang CC, Faber PW, Persichetti F, Mittal V, Vonsattel JP, MacDonald ME, Gusella JF.** (1998) Amyloid formation by mutant huntingtin: threshold, progressivity and recruitment of normal polyglutamine proteins.Somat Cell Mol Genet. Jul;24(4):217-33.
- Issidorides MR. Panayotacopoulou MT, Boukis D,** (1989) Localization of phospholipids in human catecholamine neurons with Baker's acid haematein J Neurocytol. Oct;18(5):593-7.

- Jackson GR, Salecker I, Dong X, Yao X, Arnheim N, Faber PW, MacDonald ME, Zipursky SL.** (1998) Polyglutamine-expanded human huntingtin transgenes induce degeneration of *Drosophila* photoreceptor neurons. *Neuron*. Sep;21(3):633-42.
- Kahle PJ, Neumann M, Ozmen L, Muller V, Odoj S, Okamoto N, Jacobsen H, Iwatsubo T, Trojanowski JQ, Takahashi H, Wakabayashi K, Bogdanovic N, Riederer P, Kretschmar HA, Haass C** (2001) Selective insolubility of alpha-synuclein in human Lewy body diseases is recapitulated in a transgenic mouse model. *Am J Pathol*. Dec;159(6):2215-25.
- Karunanithi, S., Barclay, J.W., Robertson, R.M., Brown, I.R., Atwood, H.L.** (1999) Neuroprotection at *Drosophila* synapses conferred by prior heat shock. *J. Neurosci.* /19(11):4360—4369
- Kermer, P., Bähr, M.** (2002) Prävention neuronaler Apoptose: Implikationen für die Therapie neurodegenerativer Erkrankungen. *Neuroforum* 2/02 193-199
- Klemm, N.; Axelsson S.;** (1973) Determination of dopamine, noradrenaline and 5-Hydroxytryptamine in the brain of desert locust *Schistocerca gregaria* Forsk. (Insecta, Orthoptera). *Brain Res.* 57, 289-298
- Kokay IC, Ebert PR, Kirchhof BS, Mercer AR.** (1999) Distribution of dopamine receptors and dopamine receptor homologs in the brain of the honey bee, *Apis mellifera* L. *Microsc Res Tech.* Jan 15-Feb 1;44(2-3):179-89.
- Kruger R, Kuhn W, Muller T, Woitalla D, Graeber M, Kosel S, Przuntek H, Epplen JT, Schols L, Riess O.:** (1998) Ala30Pro mutation in the gene encoding alpha-synuclein in Parkinsons disease *Nature Genetics* 18, 106-108
- Lansbury Peter T. Matthew S. Goldberg** (2000) Is there a cause-and-effect relationship between a-synuclein fibrillization and Parkinson's disease? *Nature Cell Biology* Vol 2. 7 115-119
- Lavedan, C.** (1998) The synuclein family. *Genome Res.* 1998 Sep;8(9):871-80. Review.
- Lee CY, Baehrecke EH.** (2000) Genetic regulation of programmed cell death in *Drosophila*. *Cell Res.* Sep;10(3):193-204.
- Lee CY, Clough EA, Yellon P, Teslovich TM, Stephan DA, Baehrecke EH.,** (2003) Genome-wide analyses of steroid- and radiation-triggered programmed cell death in *Drosophila*. *Curr. Biol.* 13(4): 350--357
- Leskow P, Lachenmayer L.** (1992) Parkinson therapy yesterday, today, tomorrow. Neuroprotection gains in importance. *Fortschr Med.* Nov 10;110(31):589-92.

- Li N, Ragheb K, Lawler G, Sturgis J, Rajwa B, Melendez JA, Robinson JP** (2003) Mitochondrial complex I inhibitor rotenone induces apoptosis through enhancing mitochondrial reactive oxygen species production. *J. Biol. Chem.*, Vol. 278, Issue 10, 8516-8525, March 7,
- Liang P, Pardee AB.** (1997) Link Differential display. A general protocol. *Methods Mol Biol.*;85:3-11.
- Link CD.** Expression of human beta-amyloid peptide in transgenic *Caenorhabditis elegans*. (1995) *Proc Natl Acad Sci U S A.* Sep 26;92(20):9368-72.
- Lotharius J, O'Malley KL** (2000) The parkinsonism-inducing drug 1-methyl-4-phenylpyridinium triggers intracellular dopamine oxidation. A novel mechanism of toxicity. *Biol Chem.* Dec 8;275(49):38581-8.
- Lowe J, McDermott H, Landon M, Mayer RJ, Wilkinson KD.** (1990) Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase (PGP 9.5) is selectively present in ubiquitinated inclusion bodies characteristics of human neurodegenerative diseases. *J. Pathology* 161, 153-160
- Lozan J. L. , Kausch, H.** (2004) *Angewandte Statistik für Naturwissenschaftler* Parey Buchverlag Berlin
- Maker HS, Weiss C, Silides DJ, Cohen G** (1981) Coupling of dopamine oxidation (monoamine oxidase activity) to glutathione oxidation via the generation of hydrogen peroxide in rat brain homogenates. *J Neurochem.* Feb;36(2):589-93.
- Maker HS, Weiss C, Weissbarth S, Silides DJ, Whetsell W.** (1981) Regional activities of metabolic enzymes and glutamate decarboxylase in human brain. *Ann Neurol.* Oct;10(4):377-83.
- Maniatis, T., Sambrook, J., Fritsch, E.F.,** (1989) *Molecular Cloning A Laboratory Manual* 2nd Edition, Cold Sprinh Harbor Laboratory Press
- Marsh JL, Walker H, Theisen H, Zhu YZ, Fielder T, Purcell J, Thompson LM.** (2000) Expanded polyglutamine peptides alone are intrinsically cytotoxic and cause neurodegeneration in *Drosophila*. *Hum Mol Genet.* Jan 1;9(1):13-25.
- Martin, D.N., Baehrecke, E.H.** (2004) Caspases function in autophagic programmed cell death in *Drosophila* *Development* 131(2):275—284
- Masliah E, Rockenstein E, Veinbergs I, Mallory M, Hashimoto M, Takeda A, Sagara Y, Sisk A, Mucke L** (2000) Dopaminergic loss and inclusion body formation in alpha-synuclein mice: implications for neurodegenerative disorders. *Science.* Feb 18;287(5456):1265-9.

- Mecocci P, MacGarvey U, Kaufman AE, Koontz D, Shoffner JM, Wallace DC, Beal MF.** (1993) Oxidative damage to mitochondrial DNA shows marked age-dependent increases in human brain. *Ann. Neurol.* **34**, 609–616.
- Merims D, Djaldetti R, Melamed E.** (2003) Waiting for ON: a major problem in patients with Parkinson disease and ON/OFF motor fluctuations. *Clin Neuropharmacol.* Jul-Aug;26(4):196-8.
- Missirlis F, Phillips JP, Jackle H.,** (2001) Cooperative action of antioxidant defense systems in *Drosophila*. *Curr. Biol.* **11**(16): 1272—1277
- Monastirioti M.** (1999) Biogenic amine systems in the fruit fly *Drosophila melanogaster*. *Microsc Res Tech.* Apr 15;45(2):106-21
- Mühlhardt, C.** (2001) Der Experimentator: Molekularbiologie/Genomics Spektrum Akademischer Verlag
- Müller H.-J., Röder T.,** (2004) Der Experimentator: Microarrays. Elsevier Spektrum Akademischer Verlag
- Nässel, D.R. Elekes, K.** (1992) Aminergic neurons in the brain of blowflies and *Drosophila*: Dopamine- and Tyrosine hydroxylase-immunoreactive neurons and their relationship with putative histaminergic neurons. *Cell Tissue Res* 267:147-167
- Ogawa N, Asanuma M, Miyoshi K.** (2004) Mechanism of specific dopaminergic neuronal death in Parkinson's disease *Nippon Rinsho.* Sep;62(9):1629-34.
- Olanow CW, Perl DP, DeMartino GN, McNaught KS** (2004) Lewy-body formation is an aggresome-related process: A hypothesis. *Lancet Neurol* **3**: 496–503.
- Orr, A. Radyuk, W.C. A Klichko, S.N. A Spinola, V.I. . D** (2001) The peroxiredoxin gene Family in *Drosophila melanogaster*. *J A. Dros. Res. Conf.* **42** P 489C
- Paren, A., Sato, F., Wu, Y., Gauthier, J. Levesque, M., Parent, M.** (2000) Organisation of thr basal ganglia :the importance of axonal collateralisation. *Trends in Neurosc..* Vol No. 10 (suppl.) 20-27
- Parkinson J.** An Essay on the shaking pulsy (1817) Printed by Wittingham and Rowland, for Sherwood, Neely an Jones; Paternoster Row
- Pendleton RG, Rasheed A, Sardina T, Tully T, Hillman R.** (2002) Effects of tyrosine hydroxylase mutants on locomotor activity in *Drosophila*: a study in functional genomics. *Behav Genet.* Mar;32(2):89-94.
- Perez Ruth G. and Teresa G.** (2004) Could a loss of α -synuclein function put dopaminergic neurons at risk? *Hastings Journal of Neurochemistry* Volume 89 Issue 6 Page 1318 - June

- Polymeropoulos MH, Lavedan C, Leroy E, Ide SE, Dehejia A, Dutra A, Pike B, Root H, Rubenstein J, Boyer R, Stenroos ES, Chandrasekharappa S, Athanassiadou A, Papapetropoulos T, Johnson WG, Lazzarini AM, Duvoisin RC, Di Iorio G, Golbe LI, Nussbaum RL.** (1997) Mutation in the α -Synuclein gene identified in families with Parkinsons disease; Science 276, 2045-2047
- Porter JA, Yu M, Doberstein SK, Pollard TD, Montell C.** (1993) Dependence of calmodulin localization in the retina on the NINAC unconventional myosin. Science 262(5136): 1038--1042
- Rein K, Hiesinger P.R., Zöckler M., Kirsten J., Fischbach K.-F., and Heisenberg M.** (2000) Three-dimensional Reconstruction of the *Drosophila* Larval and Adult Brain (Flybrain accession number AB00120 [<http://www.flybrain.org>])
- Rockwell E, Choure J, Galasko D, Olichney J, Jeste DV.** (2000) Psychopathology at initial diagnosis in dementia with Lewy bodies versus Alzheimer disease: comparison of matched groups with autopsy-confirmed diagnoses. Int J Geriatr Psychiatry. Sep;15(9):819-23.
- Ryckebusch S, Wehr M, Laurent G.** (1994) Distinct rhythmic locomotor patterns can be generated by a simple adaptive neural circuit: biology, simulation, and VLSI implementation. J Comput Neurosci. Dec;1(4):339-58.
- Sambrook J, Fritsch E.F., Maniatis T.** (1989) Molecular Cloning, A laboratory Manual. Cold Spring Harbor Press Laboratory Press
- Saporito MS, Brown EM, Miller MS, Carswell S.** (1999) CEP-1347/KT-7515, an inhibitor of c-jun N-terminal kinase activation, attenuates the 1-methyl-4-phenyl tetrahydropyridine-mediated loss of nigrostriatal dopaminergic neurons In vivo. J Pharmacol Exp Ther. Feb;288(2):421-7.
- Schäfer, S. Rehder, V.** (1989) Dopamine-like immunoreactivity in the brain and subösophageal ganglia of the honeybee. J. comp. Neurol. 280, 43-58
- Schramm G, Bruchhaus I, Roeder T.** (2000) A simple and reliable 5'-RACE approach. A simple and reliable 5'-RACE approach. Nucleic Acids Res. Nov 15;28(22):E96.
- Schulz, S. Da Silva, N. Paulsen, R., Huber, A.** (2001) Overexpression of visual G protein gamma-subunits in *Drosophila* photoreceptors. Biol. Cell 93(3-4): 227
- Schwaerzel M, Monastirioti M, Scholz H, Friggi-Grelín F, Birman S, Heisenberg M.** (2003) Dopamine and octopamine differentiate between aversive and appetitive olfactory memories in *Drosophila*. J Neurosci. Nov 19;23(33):10495-502.
- Shaw, P.J., Cirelli, C., Greenspan, R.J., Tononi, G.** (2000) Correlates of sleep and waking in *Drosophila melanogaster*. Science 287(5459):1834—1837

- Shimura H, Schlossmacher MG, Hattori N, Frosch MP, Trockenbacher A, Schneider R, Mizuno Y, Kosik KS, Selkoe DJ** (2001) Ubiquitination of a new form of alpha-synuclein by parkin from human brain: implications for Parkinson's disease. *Science*. Jul 13;293(5528):263-9. Epub 2001 Jun 28.
- Sidhua,A., Christophe Wersingera, Philippe Vernierb** (2004) a-Synuclein regulation of the dopaminergic transporter: a possible role in the pathogenesis of Parkinson's disease *FEBS Letters* 565 1–5
- Simpkins JW, Wang J, Wang X, Perez E, Prokai L, Dykens JA.** (2005) Mitochondria play a central role in estrogen-induced neuroprotection. *Curr Drug Targets CNS Neurol Disord*. Feb;4(1):69-83.
- Smith CD, Carney JM, Starke-Reed PE, Oliver CN, Stadtman ER, Floyd RA, Markesbery WR.** (1991) Excess brain protein oxidation and enzyme dysfunction in normal aging and in Alzheimer disease. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **88**, 10540–10543.
- Sokolowski, M.B.** (2001) *Drosophila*: genetics meets behaviour. *Nature Rev. Genet.* 2(11): 879--890
- Somayajulu M, McCarthy S, Hung M, Sikorska M, Borowy-Borowski H, Pandey S.** Role of mitochondria in neuronal cell death induced by oxidative stress; neuroprotection by Coenzyme Q(10). (2005) *Neurobiol Dis.* Apr;18(3):618-27.
- Songyang Z, Baltimore D, Cantley LC, Kaplan DR, Franke TF.** Interleukin 3-dependent survival by the Akt protein kinase. (1997) *Proc Natl Acad Sci U S A*. Oct 14;94(21):11345-50.
- Spillantini MG, Schmidt ML, Lee VM, Trojanowski JQ, Jakes R, Goedert M.** (1997) Alpha-synuclein in Lewy bodies. *Nature*. Aug 28;388(6645):839-40.
- Strissel und Arshavsky,** (2004) Myosin III illuminates the mechanism of arrestin translocation. *Neuron* 43(1): 2--4
- Sullivan W., Ashburner M, R. Scott Hawley,** *Drosophila* Protocols (2000) Cold Spring Harbor Press, New York
- Sun, J., Folk, D., Bradley, T.J., Tower, J.** (2002) Induced overexpression of mitochondrial Mn-Superoxide dismutase extends the life span of adult *Drosophila melanogaster*. *Genetics* 161(2):661—672
- Toma, D.P., White, K.P., Hirsch, J., Greenspan, R.J.** (2002) Identification of genes involved in *Drosophila melanogaster* geotaxis, a complex behavioral trait. *Nature Genetics* 31(4):349—353
- Trepel, Martin** (2003) *Neuroanatomie; Struktur und Funktion* Verlag Urban & Fischer

- Vanacore N, Nappo A, Gentile M, Brustolin A, Palange S, Liberati A, Di Rezze S, Caldora G, Gasparini M, Benedetti F, Bonifati V, Forastiere F, Quercia A, Meco G.** (2002) Evaluation of risk of Parkinson's disease in a cohort of licensed pesticide users. *Neurol Sci.* Sep;23 Suppl 2:S119-20.
- Venter JC, Adams MD, Celniker SE, Holt RA, Evans CA, Gocayne JD, Amanatides PG, Scherer SE, Li PW, Hoskins RA, Galle RF, George RA, et al.** (2000) The genome sequence of *Drosophila melanogaster*. *Science.* Mar 24;287(5461):2185-95.
- Volles MJ, Lee SJ, Rochet JC, Shtilerman MD, Ding TT, Kessler JC, Lansbury PT Jr.** (2001) Vesicle permeabilization by protofibrillar alpha-synuclein: implications for the pathogenesis and treatment of Parkinson's disease. *Biochemistry.* 2001 Jul 3;40(26):7812-9.
- Walton KM. GDNF:** A novel factor with therapeutic potential for neurodegenerative disorders. (1999) *Mol Neurobiol.* Feb;19(1):43-59.
- Watson JD, Crick FH.** (1953) The structure of DNA. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol.*;18:123-31.
- Wendt B, Homberg U.** (1992) Immunocytochemistry of dopamine in the brain of the locust *Schistocerca gregaria*. *J Comp Neurol.* Jul 15;321(3):387-403.
- Wyan-Ching Mimi Lee, Motojiro Yoshihara, and J. Troy Littleton** (2004) Cytoplasmic aggregates trap polyglutaminecontaining proteins and block axonal transport in a *Drosophila* model of Huntington's disease 3224–3229 *PNAS* March 2, vol. 101 no. 9
- Youdim MB, Fridkin M, Zheng H.** (2004) Novel bifunctional drugs targeting monoamine oxidase inhibition and iron chelation as an approach to neuroprotection in Parkinson's disease and other neurodegenerative diseases. *J Neural Transm.* Oct;111(10)
- Zhang, B., Koh, Y.H., Beckstead, R.B., Budnik, V., Ganetzky, B., Bellen, H.J.** (1998) Synaptic vesicle size and number are regulated by a clathrin adaptor protein required for endocytosis. *Neuron* 21(6):1465—1475
- Zijlmans JC, Debilly B, Rascol O, Lees AJ, Durif F.** (2004) Safety of entacapone and apomorphine coadministration in levodopa-treated Parkinson's disease patients: pharmacokinetic and pharmacodynamic results of a multicenter, double-blind, placebo-controlled, cross-over study. *Mov Disord.* Sep;19(9):1006-1011.

Anhang I

Geräte, Chemikalien, Bezugsfirmen

Standard-Gerätschaften sind nicht gesondert aufgeführt.

Geräte

ArrayWorx Scanner	Applied Precision
BD FACSCalibur System	Becton Dickinson GmbH
Biofuge 13	Haereus
BioPhotometer	Eppendorf
Centrifuge 5415 D	Eppendorf
Corning Hybridisierungskammer	Corning
Dark Reader™ (Model DR-45 M)	Mo Bi Tec
Gel-Dokumentation	MWG
Hybridisierungsöfen (APT Line)	Biometra
Konfokales <i>Laser-Scanning</i> Mikroskop DM_IRBE	Leica
Robocycler Gradient 96	Stratagene
REM LEO 1525	LEO
Speed Vac SC 110	Savant
Stratalinker 1800	Stratagene
Vakuumpumpe Lyrovac GT2	Leybold Vakuum GmbH

Chemikalien

Chemikalien ohne einen entsprechenden Vermerk wurden von Merck (Darmstadt, D) bezogen. Standard-Gerätschaften sowie Einweg-Verbrauchsmaterialien werden nicht gesondert aufgeführt.

Agarose	Sigma
Alexa Dye	Mo Bi Tec/Amersham
Aminoallyl-UTP	Ambion
BCIP	Roth
dNTP	MBI Fermentas
Ceftraxione	Sigma
Collagenase/Dispase	Gibco
EDTA	Serva
Ethanol	Roth
Ethidiumbromid	Sigma
Glycerol	Roth
I-Block	Tropix
Isopropanol	Roth
Lachssperma	Sigma
L-15 Medium	Gibco
Methy-4-Hydroxybenzoat	Sigma
NBT	Roth
OCT	Sakura
SDS	Serva
Spectinomycin	Sigma
Stickstoff	Linde
Transgene <i>Drosophila melanogaster</i>	Bloomington Stock Center
Tris	Sigma
Triton X-100	Serva

Tween-20
ULTRAhyb
Yeast

Serva
Ambion

Bezugsfirmen

Ambion, Henkelstrasse 15,
Applied Precision,
Appligene Oncor,
Beckmann Instruments GmbH,
Becton Dickinson GmbH,
Bioform,
Biometra GmbH,
BioRad Laboratories GmbH,
Biozym Diagnostik GmbH,
Bloomington Stock Center
Boehringer Ingelheim Bioproducts Partnership,
Carl Roth GmbH & Co.,
Corning Cable Systems GmbH & Co KG,
Edge Bio Systems,
Eppendorf-Netheler-Hinz GmbH,
Genomed GmbH,
Gibco BRL Life Technology GmbH,
Haereus Instruments GmbH,
Invitrogen,
Kisker GbR,
Leica Mikrosysteme Vertrieb GmbH,
Leybold Vakuum GmbH,
MBI Fermentas,
Membra Pure, Reinstwasser,
Merck KGaA,
Mo Bi Tec,
MWG-Biotech AG,
LEO (siehe Zeiss)
PeqLab Biotechnologie GmbH,
Pharmacia Biotech Europe GmbH,
Promega GmbH,
Qiagen GmbH,
Quantifoil Micro Tools GmbH,
Raytest
Roche,
RothGmbH,
Sakura Finetek Inc,
Serva Feinbiochemica & Co. KG,
Sigma-Aldrich Chemie GmbH,
Stratagene GmbH,
TaKaRa Bio Whittaker Europe,
Trizol Reagent, Life Technologies GmbH,
Whatman,
Zeiss,

D-65187 Wiesbaden
Marlborough SN8 1LZ, UK
D-69120 Heidelberg
D-80807 München
D-69126 Heidelberg
D-90419 Nürnberg
D-37079
D-80939 München
D-31883 Hessisch Oldendorf
Bloomington, IN 47405-7000 US
D-69112 Heidelberg
D-76185 Karlsruhe
D-58093 Hilden
Gaithersburg, MD 20879-4149,
D-22331 Hamburg
D-32545 Bad Oeynhausen
D-76339 Eggenstein
D-63450 Hanau
San Diego, CA, USA
D-48543 Steinfurt
D-64625 Bensheim
D-50968 Köln
D-68789 St.Leon-Rot
D-55294 Bodenheim
D-64271 Darmstadt
D-37083 Göttingen
D-85560 Ebersberg

D-91058 Erlangen
D-79111 Freiburg
D-68199 Mannheim
D-40724 Hilden
D-7745 Jena
D-75339 Straubenhardt
D-69112 Heidelberg
D-76185 Karlsruhe
Torrance, CA 90501, USA
D-69042 Heidelberg
D-82039 Deisenhofen
D-69000 Heidelberg
D-82024 Taufkirchen
D-76339 Eggenstein
Springfield Mill, UK
D-07745 Jena

Anhang II

Im Anhang sind alle als differentiell gefundenen Gene aufgeführt, die im Vergleich Wildtyp gegen Synucleinwt bzw SynucleinA30P als stärker exprimiert im Wildtyp gefunden wurden. Diese Gene sind mit ihren Koordinaten, dem Namen, der Ratio und falls vorhanden dem Kürzel aufgeführt.

Tabelle 1 WT20G vs. Syn20G Vergleich auf Array Nummer 12926906. Die Ratio war <0,25.

Index	Label	Name	Ratio	Symbol
1.	1-7,3	CG2865	0,17	
2.	1-9,3	CG30011	0,09	gem
3.	1-22,15	CG32835	0,25	
4.	2-4,13	CG7220	0,19	
5.	2-8,18	CG3987	0,17	
6.	3-1,1	CG8261	0,2	Ggamma1
7.	3-4,16	GH05710	0,17	
8.	3-4,23	CG1340	0,16	
9.	3-8,18	CG5608	0,17	
10.	3-20,12	GH24429	0,15	Hsf
		CG5748		
11.	3-20,14	CG17376	0,19	
12.	3-20,21	CG3260	0,05	Zfrp8
13.	3-21,11	LP06778	0,19	Sas
		CG5232		
14.	4-5,12	CG6164	0,17	
15.	4-7,16	CG31637	0,08	
16.	4-15,15	CG17523	0,15	
17.	4-15,21	CG6500	0,09	Bx
18.	4-21,8	SD08107	0,18	Moca-cyp
		CG1866		
19.	4-21,11	CG9917	0,13	
20.	4-21,13	CG10268	0,04	
21.	5-4,12	CG7461	0,14	
22.	5-4,15	CG6405	0,17	
23.	5-5,8	CG32555	0,18	Rho
24.	5-7,21	CG11798	0,09	chn
25.	5-11,4	CG11462	0,09	
26.	5-20,19	GH16768	0,19	Rbp2
		CG4429		
27.	6-4,9	CG11509	0,2	
28.	6-5,22	CG6008	0,21	NP15.6
29.	6-15,11	RE64027	0,04	sn
		CG1536		
30.	6-15,22	CG4893	0,17	
31.	6-19,7	CG17329	0,1	
32.	6-19,17	CG11086	0,05	
33.	6-21,16	CG1399	0,03	
34.	6-22,12	CG31733	0,17	ms(2)35Ci
35.	6-22,14	CG9592	0,05	
36.	7-1,22	CG1838	0,19	myogliani n
37.	7-4,2	CG8611	0,25	
38.	7-4,9	CG8905	0,21	Sod2
39.	7-4,16	CG3564	0,2	
40.	7-4,24	CG11348	0,21	nAcRbeta -64B
41.	7-5,2	CG11035	0,16	

Index	Label	Name	Ratio	Symbol
42.	7-7,19	CG8326	0,14	
43.	7-8,2	CG9441	0,12	Pu
44.	7-9,22	CG6518	0,23	inaC
45.	7-15,10	CG10465	0,08	
46.	7-19,4	CG3213	0,09	
47.	7-20,2	CG14000	0,08	
48.	7-20,4	CG4218	0,09	
49.	7-20,5	CG13771	0,12	
50.	7-20,10	CG6367	0,18	psh
51.	7-20,17	CG32744	0,12	
52.	8-1,24	CG9553	0,04	chic
53.	8-4,11	CG11459	0,17	
54.	8-4,23	CG32833	0,15	
55.	8-5,5	GH23165	0,13	
56.	8-7,18	CG8981	0,16	
57.	8-7,23	CG5940	0,18	CycA
58.	8-17,9	RH47344	0,02	beat-IIIc
		CG6365		
59.	8-18,22	CG8971	0,24	fh
60.	8-19,11	CG5155	0,15	
61.	8-21,10	CG1332	0,25	
62.	8-22,11	CG2750	0,14	
63.	9-1,2	GM01267	0,17	mbf1
		CG4143		
64.	9-5,11	CG9366	0,22	RhoL
65.	9-7,18	CG9723	0,25	
66.	9-8,14	CG30059	0,24	
67.	9-20,19	CG5855	0,14	cni
68.	10-4,19	LD28068	0,1	
		CG17454		
69.	11-3,13	CG12345	0,05	
70.	11-4,10	CG3699	0,24	
71.	11-5,11	CG15820	0,22	
72.	11-8,14	CG11807	0,05	
73.	11-20,1	CG14174	0,05	
74.	12-4,3	CG3283	0,16	SdhB
75.	12-4,11	CG15084	0,15	
76.	12-4,20	CG4968	0,17	
77.	12-8,10	CG31170	0,12	
78.	12-13,18	CG12877	0,23	
79.	12-21,20	CG8989	0,07	His3.3B
80.	13-5,15	CG9796	0,2	
81.	13-9,3	CG14993	0,2	Faa
82.	13-19,23	CG31099	0,1	
83.	13-20,13	GH14137	0,09	
84.	14-3,13	CG11172	0,05	NFAT
85.	14-5,24	CG9528	0,11	
86.	14-20,11	CG10343	0,08	
87.	15-4,11	CG15012	0,16	
88.	15-17,10	CG32160	0,05	
89.	15-19,17	CG14590	0,11	
90.	15-20,21	CG11299	0,06	
91.	15-21,15	CG9396	0,17	
92.	16-5,6	CG30090	0,07	
93.	16-5,7	CG1827	0,09	
94.	16-5,11	CG6990	0,12	HP1c
95.	16-5,16	CG5108	0,14	mRpS7
96.	16-6,18	CG12191	0,08	dpr20
97.	16-8,8	CG5683	0,08	Aef1
98.	16-9,6	CG8003	0,04	
99.	16-9,20	CG5977	0,09	spas
100.	16-19,8	CG17931	0,23	
101.	16-21,6	CG9496	0,02	Tsp29Fb

Index	Label	Name	Ratio	Symbol
102.	16-21,7	LP09838	0,06	
		CG17541		
103.	17-8,3	CG5796	0,2	Ppox
104.	17-9,1	CG6054	0,25	Su(fu)
105.	17-9,9	CG4091	0,1	
106.	17-20,8	CG31722	0,18	
107.	17-20,10	CG31090	0,19	
108.	18-11,1	CG11329	0,24	
109.	18-19,1	CG13544	0,23	
110.	18-19,8	CG8398	0,16	
111.	19-3,19	CG8920	0,21	
112.	19-15,1	CG3532	0,21	
113.	20-5,18	CG18284	0,06	
114.	20-5,19	CG14683	0,11	
115.	20-17,1	CG10447	0,14	
116.	20-19,2	CG2292	0,05	
117.	20-20,1	GH07769	0,03	mod(mdg 4)
		CG7859		
118.	20-20,4	CG3517	0,03	
119.	20-20,6	CG2457	0,16	inaF
120.	20-20,8	CG1857	0,2	nec
121.	20-20,9	CG10579	0,05	Eip63E
122.	20-21,11	CG12924	0,17	
123.	20-21,14	CG1793	0,03	Arc70
124.	21-3,4	CG10959	0,02	
125.	21-4,13	CG12744	0,18	
126.	21-4,15	CG4468	0,2	
127.	21-20,4	CG17030	0,09	
128.	21-20,8	CG31678	0,13	
129.	22-5,16	CG10973	0,1	
130.	22-8,2	CG6718	0,23	
131.	22-20,16	CG6375	0,16	pit
132.	22-20,23	GM31840	0,08	
		CG15763		
133.	23-3,20	HL08134	0,23	
134.	23-5,2	CG6199	0,16	
135.	23-8,13	CG3691	0,13	Pof
136.	23-19,20	CG18558	0,09	
137.	23-20,8	CG7570	0,18	hale
138.	24-5,15	CG7840	0,15	CG7840
139.	24-8,21	CG4006	0,15	Akt1
140.	24-19,16	CG15730	0,16	
141.	24-20,22	HL07902	0,02	
		CG7402		
142.	24-21,4	CG11300	0,07	
143.	24-21,8	LP09836	0,23	Obp83cd
		CG15582		
144.	25-3,8	CG17233	0,08	
145.	25-8,12	CG17559	0,16	dnt
146.	25-8,22	CG13586	0,07	itp
147.	26-3,18	CG7842	0,25	
148.	26-4,16	CG8588	0,16	
149.	26-5,3	CG10531	0,19	
150.	26-21,3	LP12092	0,14	Lcp3
		CG2043		
151.	27-5,12	CG5826	0,22	Prx5037
152.	27-8,3	CG32394	0,07	
153.	27-9,4	CG3838	0,14	
154.	27-18,11	CG11710	0,24	
155.	27-19,11	CG2956	0,13	twi
156.	28-4,18	CG7891	0,21	
157.	28-9,1	CG7384	0,2	
158.	28-9,3	CG14641	0,17	

Index	Label	Name	Ratio	Symbol
159.	28-17,14	CG8893	0,22	Gapdh2
160.	28-19,4	CG3814	0,16	
161.	29-5,10	CG1659	0,16	unc-119
162.	29-19,8	CG15631	0,13	
163.	29-20,3	CG17440	0,12	
164.	30-5,10	CG5398	0,13	
165.	30-5,12	CG2905	0,16	Nipped-A
166.	30-7,14	CG5014	0,11	Vap-33-1
167.	30-9,14	CG11851	0,18	
168.	30-19,10	CG31160	0,24	
169.	31-4,11	CG6758	0,2	
170.	31-4,16	CG10233	0,14	
171.	31-5,16	CG16926	0,14	
172.	31-8,22	CG9653	0,09	brk
173.	31-10,1	CG3297	0,12	mnd
174.	31-10,10	CG33106	0,06	mask
175.	32-4,9	CG1743	0,18	Gs2
176.	32-5,8	CG10750	0,18	
177.	32-5,11	CG8208	0,15	MBD-like
178.	32-5,14	CG8132	0,15	
179.	32-6,14	CG8931	0,15	
180.	32-7,2	CG2019	0,06	disp
181.	32-8,3	CG6422	0,24	
182.	32-8,10	SD07085	0,09	cathD
		CG1548		
183.	32-8,12	CG12002	0,08	Pxn
184.	32-9,5	CG32767	0,06	
185.	32-11,1	CG6967	0,15	
186.	32-14,12	CG3851	0,13	odd
187.	32-21,6	CG15219	0,06	
188.	33-1,19	LD05623	0,22	Stlk
		CG40293		
189.	33-4,11	CG13095	0,18	
190.	33-4,15	CG30412	0,22	
191.	33-7,6	CG18285	0,11	igl
192.	33-7,24	CG2982	0,22	
193.	33-8,9	CG8657	0,22	Dgkepsilo n
194.	33-8,13	CG15478	0,08	
195.	33-8,20	CG8639	0,07	Cirl
196.	34-6,16	CG11791	0,14	
197.	34-8,19	CG10327	0,17	TBPH
198.	34-13,19	CG18549	0,09	
199.	34-16,11	CG11821	0,15	Cyp12a5
200.	34-18,12	CG8622	0,13	
201.	34-19,15	CG8226	0,15	
202.	35-7,17	CG7110	0,18	
203.	35-8,14	CG12004	0,06	
204.	35-9,10	CG5119	0,15	pAbp
205.	35-19,17	CG12018	0,09	
206.	35-19,22	CG1842	0,17	Dhc98D
207.	35-20,20	CG13244	0,2	
208.	36-4,9	CG17012	0,24	
209.	36-4,11	CG7445	0,15	fln
210.	36-7,5	CG3217	0,18	CkIIalpha -i3
211.	36-7,8	CG15436	0,1	
212.	36-7,9	CG12369	0,13	Lac
213.	36-7,19	CG18177	0,18	
214.	36-8,3	CG9523	0,18	
215.	36-8,11	CG5140	0,13	
216.	36-8,13	CG8118	0,06	mam
217.	36-8,16	CG31231	0,12	

Index	Label	Name	Ratio	Symbol
218.	36-9,10	CG1597	0,21	
219.	36-12,22	CG11971	0,21	
220.	36-18,16	CG6441	0,21	
221.	36-18,24	CG18675	0,18	
222.	37-8,8	CG8253	0,25	
223.	37-19,8	CG10920	0,16	
224.	37-19,22	AT25114	0,19	Mpk3
		CG14081		
225.	38-3,17	CG9611	0,23	
226.	38-4,10	CG31200	0,12	
227.	38-5,3	CG1349	0,12	dj-1beta
228.	38-5,8	CG8838	0,12	
229.	38-5,9	CG18316	0,13	
230.	38-5,11	CG32019	0,1	bt
231.	38-6,9	CG8613	0,07	
232.	38-7,20	CG33130	0,05	l(2)k07433
233.	38-7,24	CG4497	0,05	
234.	38-9,1	CG1506	0,15	Ac3
235.	38-9,5	CG1404	0,08	ran
236.	38-11,3	CG18102	0,04	
237.	38-20,23	CG14817	0,13	
238.	39-7,17	CG6700	0,21	
239.	39-9,10	GH25778	0,2	CR30068
240.	39-9,20	CG8669	0,22	crc
241.	39-10,1	CG17322	0,18	
242.	39-10,23	CG1658	0,1	Doa
243.	39-19,20	CG9455	0,04	
244.	39-20,9	CG4478	0,16	Mst35Bb
245.	39-21,11	CG3440	0,19	Pcp
246.	40-1,3	CG5014	0,1	Vap-33-1
247.	40-4,11	CG10226	0,18	
248.	40-5,10	CG8331	0,2	
249.	40-5,12	CG11589	0,15	VhaM9.7-1
250.	40-6,20	CG3772	0,21	cry
251.	40-9,8	CG7065	0,24	
252.	40-10,19	CG9379	0,16	by
253.	40-14,17	CG5510	0,24	
254.	40-19,14	CG1242	0,1	Hsp83
255.	40-21,2	LP08165	0,17	btd
		CG12653		
256.	41-3,9	CG14938	0,06	crol
257.	41-9,5	CG6315	0,09	fl(2)d
258.	41-15,18	CG3074	0,17	
259.	41-19,17	CG13168	0,2	
260.	41-21,17	SD19722	0,11	spn-A
		CG7948		
261.	42-4,7	CG6998	0,12	ctp
262.	42-4,10	GH23730	0,06	fbp
		CG10611		
263.	42-4,21	CG10733	0,1	loj
264.	42-8,12	CG14882	0,15	
265.	42-9,14	CG6340	0,15	
266.	43-4,13	CG3036	0,23	
267.	43-4,23	CG13890	0,19	
268.	43-5,1	CG9021	0,2	
269.	43-5,14	CG12758	0,12	sano
270.	43-20,20	GH27957	0,11	
		CG8253		
271.	43-22,10	CG9173	0,18	
272.	44-1,17	CG31605	0,07	gel
273.	44-4,21	CG5768	0,19	
274.	44-5,18	CG10562	0,06	

Index	Label	Name	Ratio	Symbol
275.	44-5,19	CG1623	0,08	
276.	44-7,19	CG6453	0,09	
277.	44-8,11	CG12348	0,08	Sh
278.	44-16,20	CG8663	0,17	nrv3
279.	44-16,22	CG5472	0,16	Pal
280.	44-16,24	CG5104	0,07	
281.	44-17,2	CG14437	0,04	
282.	44-18,14	CG31870	0,2	
283.	44-18,15	CG5987	0,15	
284.	44-19,8	AT22150	0,03	
		CG10481		
285.	44-19,9	CG11734	0,04	HERC2
286.	44-19,22	GH04674	0,16	
		CG6486		
287.	44-20,1	GH07363	0,03	
		CG7192		
288.	44-20,5	CG9334	0,05	Spn3
289.	44-20,8	CG18265	0,03	
290.	44-20,9	CG5452	0,05	dnk
291.	44-20,24	CG9769	0,11	
292.	44-21,4	CG15757	0,03	
293.	44-21,5	SD04979	0,24	RhoGAP5
		CG6477		4D
294.	45-5,2	CG12908	0,22	Ndg
295.	46-3,7	CG7958	0,12	tna
296.	46-5,10	CG10934	0,12	
297.	46-7,24	CG1416	0,12	
298.	46-8,19	CG9706	0,22	
299.	46-9,4	CG9213	0,12	
300.	46-14,23	RE50740	0,03	pit
		CG6375		
301.	47-4,17	CG6409	0,22	
302.	47-4,19	CG7583	0,23	CtBP
303.	47-5,3	CG8441	0,16	
304.	47-5,8	CG2330	0,22	
305.	47-5,15	CG11454	0,15	
306.	47-11,4	CG3497	0,05	Su(H)
307.	47-12,2	SD10530	0,13	
308.	47-17,17	CG7322	0,15	
309.	47-19,23	CG14962	0,15	
310.	47-22,11	CG33187	0,16	
311.	48-3,10	CG1822	0,08	bif
312.	48-3,15	CG7832	0,1	
313.	48-5,1	CG5428	0,19	
314.	48-5,5	CG8416	0,17	Rho1
315.	48-5,8	CG8453	0,18	Cyp6g1
316.	48-5,13	CG9231	0,18	
317.	48-5,16	CG8436	0,17	
318.	48-7,2	CG5466	0,08	
319.	48-7,3	CG3279	0,18	
320.	48-7,20	CG18870	0,08	
321.	48-7,24	CG18143	0,15	
322.	48-8,4	CG10596	0,13	Msr-110
323.	48-8,7	CG32810	0,23	
324.	48-8,10	CG17597	0,13	
325.	48-8,11	CG11238	0,08	l(3)04053
326.	48-8,16	CG1434	0,2	
327.	48-8,17	CG10578	0,06	DnaJ-1
328.	48-9,2	CG1218	0,18	
329.	48-9,4	CG10098	0,13	
330.	48-9,6	CG7826	0,14	mnb
331.	48-9,10	CG3172	0,13	twf
332.	48-9,14	CG10739	0,12	pigeon

Index	Label	Name	Ratio	Symbol
333.	48-10,4	CG7708	0,1	
334.	48-10,9	CG10084	0,24	
335.	48-10,15	CG5735	0,1	
336.	48-11,18	CG13222	0,21	
337.	48-18,16	AT08279	0,19	
338.	48-19,6	CG5144	0,23	

Tabelle 2 WT50G vs. Syn50G Vergleich auf Array Nummer 12926907. Die Ratio war <0,17.

Index	Label	Name	Ratio	Symbol
1.	1-3,19	CG11070	0,14	
2.	1-4,17	CG4377	0,14	
3.	1-7,4	CG2865	0,15	
4.	1-8,4	CG3806	0,15	eIF2B-epsilon
5.	1-9,13	CG2707	0,13	fs(1)Ya
6.	1-9,22	CG13384	0,16	
7.	1-12,11	CG6231	0,15	
8.	1-19,19	AT27571	0,1	
		CG11990		
9.	1-20,15	CG9345	0,1	Adgf-C
10.	1-20,19	CG13623	0,1	
11.	1-21,18	CG1973	0,14	
12.	1-22,8	CG10688	0,12	
13.	2-1,10	CG7866	0,13	
14.	2-2,13	CG4206	0,14	Mcm3
15.	2-4,8	CG15514	0,12	
16.	2-17,18	CG18767	0,12	
17.	2-21,2	CG7594	0,08	Eig71Eh
18.	3-5,10	CG7803	0,17	z
19.	3-8,12	CG4276	0,18	aru
20.	3-9,17	CG12109	0,18	Caf1-180
21.	3-20,13	CG17376	0,11	
22.	3-20,19	GH28556	0,13	
		CG12854		
23.	3-20,22	CG3260	0,11	Zfrp8
24.	3-21,3	LP05296	0,1	
		CG14350		
25.	3-21,11	LP06778	0,12	Sas
		CG5232		
26.	3-22,17	CG31639	0,17	
27.	4-1,5	CG6157	0,13	dah
28.	4-4,10	CG32278	0,19	
29.	4-15,16	CG17523	0,13	
30.	4-21,3	CG11138	0,12	
31.	4-21,7	SD08107	0,15	Moca-cyp
		CG1866		
32.	4-21,12	CG9917	0,14	
33.	5-4,12	CG7461	0,17	
34.	5-8,19	CG7793	0,09	Sos
35.	5-9,18	GH05702	0,13	
36.	5-10,2	CG7574	0,13	bip1
37.	5-19,11	CG5075	0,12	
38.	5-20,20	GH16768	0,16	Rbp2
		CG4429		
39.	6-2,8	CG18542	0,16	
40.	6-2,10	CG7981	0,11	trol
41.	6-12,11	CG12702	0,14	
42.	6-15,9	CG17715	0,1	
43.	6-15,22	CG4893	0,13	
44.	6-18,18	CG17934	0,11	Mst84Db
45.	6-19,5	CG11698	0,1	
46.	6-19,10	CG5458	0,14	
47.	6-20,10	CG15014	0,09	
48.	6-20,20	CG4464	0,12	RpS19a
49.	6-21,15	CG1399	0,12	
50.	6-22,9	CG12853	0,12	
51.	6-22,12	CG31733	0,09	ms(2)35Ci
52.	6-22,13	CG9592	0,13	
53.	7-1,21	CG1838	0,16	myoglianin
54.	7-4,9	CG8905	0,14	Sod2

Index	Label	Name	Ratio	Symbol
55.	7-7,19	CG8326	0,14	
56.	7-9,21	CG6518	0,14	inaC
57.	7-12,1	GH07425	0,15	
58.	7-15,2	CG7034	0,1	sec15
59.	7-20,1	CG14000	0,11	
60.	7-20,10	CG6367	0,13	psh
61.	7-20,11	CG15202	0,12	
62.	7-21,10	CG7031	0,15	
63.	7-21,21	CG15678	0,13	
64.	7-22,18	CG30110	0,11	
65.	8-1,23	CG9553	0,11	chic
66.	8-4,11	CG11459	0,16	
67.	8-5,14	CG5442	0,13	SC35
68.	8-7,24	CG5940	0,17	CycA
69.	8-11,1	CG14764	0,15	
70.	8-18,21	CG8971	0,13	fh
71.	8-19,12	CG5155	0,12	
72.	8-21,10	CG1332	0,13	
73.	9-1,9	CG17143	0,11	thoc7
74.	9-4,12	CG3318	0,1	Dat
75.	9-5,13	CG4924	0,09	icln
76.	9-7,22	CG7319	0,11	
77.	9-9,17	CG1710	0,12	Hcf
78.	9-9,24	CG15438	0,11	
79.	9-13,23	CG18088	0,11	
80.	9-19,1	CG10484	0,12	Dox-A2
81.	9-19,14	CG18124	0,08	mTTF
82.	9-19,20	CG8787	0,14	Asx
83.	9-22,22	CG32601	0,12	
84.	10-1,10	CG7726	0,07	RpL11
85.	10-2,9	CG2247	0,12	
86.	10-5,11	CG6443	0,1	
87.	10-8,4	CG5632	0,13	thoc6
88.	10-8,20	CG31388	0,11	
89.	10-18,18	CG9589	0,05	
90.	10-19,18	CG11400	0,05	
91.	10-20,18	CG6750	0,07	
92.	10-21,22	CG31633	0,04	
93.	11-4,9	CG3699	0,17	
94.	11-4,18	CG2652	0,1	
95.	11-9,17	CG33116	0,15	
96.	11-19,14	CG17387	0,12	
97.	11-20,6	CG11502	0,13	svp
98.	11-21,4	CG14717	0,11	
99.	11-21,22	CG4259	0,13	
100.	12-1,11	CG32418	0,14	
101.	12-4,20	CG4968	0,16	
102.	12-8,4	CG4649	0,17	Sodh-2
103.	12-19,18	CG12860	0,1	
104.	12-19,19	CG7828	0,13	
105.	13-4,3	CG2082	0,14	
106.	13-5,16	CG9796	0,15	
107.	13-9,19	CG8678	0,11	
108.	13-9,21	CG2736	0,12	
109.	13-10,4	CG6664	0,11	
110.	13-10,8	CG4162	0,15	lace
111.	13-13,20	CG11825	0,15	
112.	13-19,24	CG31099	0,11	
113.	13-20,13	GH14137	0,11	
		CG15316		
114.	13-22,9	CG30093	0,12	
115.	14-1,5	CG9154	0,12	
116.	14-5,11	CG10161	0,1	eIF-3p66
117.	14-5,24	CG9528	0,09	
118.	14-10,6	CG8135	0,15	
119.	14-15,19	CG6178	0,12	
120.	14-18,17	CG13349	0,1	
121.	14-19,15	CG10516	0,1	
122.	14-20,11	CG10343	0,08	
123.	15-3,18	CG7436	0,16	Nmt
124.	15-5,3	CG5194	0,09	
125.	15-5,5	CG4036	0,11	
126.	15-7,19	CG6398	0,14	
127.	15-8,16	CG5434	0,14	
128.	15-9,17	CG7069	0,14	
129.	15-10,3	LD29359	0,14	sinu
		CG10624		

Index	Label	Name	Ratio Symbol
130.	15-10,6	CG2260	0,17
131.	15-19,10	CG9159	0,1 Kr-h1
132.	15-20,24	CG5945	0,06
133.	15-21,10	CG32284	0,12
134.	16-2,9	CG3132	0,16 Ect3
135.	16-5,10	CG8501	0,17
136.	16-9,2	CG32756	0,17
137.	16-9,3	CG6205	0,17 por
138.	16-14,23	CG13643	0,12
139.	16-18,13	CG32062	0,17
140.	16-19,7	CG17931	0,15
141.	16-19,21	CG4073	0,08
142.	16-21,5	CG9496	0,11 Tsp29Fb
143.	16-22,16	CG31407	0,13
144.	17-2,12	CG17270	0,05
145.	17-4,14	CG18249	0,06
146.	17-4,15	CG9400	0,06
147.	17-4,22	CG7448	0,05
148.	17-5,7	CG9196	0,05
149.	17-7,6	CG1317	0,09
150.	17-7,18	CG3654	0,07
151.	17-9,21	CG10641	0,07
152.	17-9,24	CG14642	0,08
153.	17-10,4	CG6611	0,11 ect
154.	17-12,24	CG31272	0,11
155.	17-15,19	RE05127	0,13 Glycogenin
		CG9480	
156.	17-20,10	CG31090	0,11
157.	17-22,11	CG17261	0,08
158.	17-22,13	CG10969	0,09
159.	18-2,16	CG3488	0,11
160.	18-4,2	CG2151	0,12 Trxr-1
161.	18-4,4	CG11784	0,11
162.	18-4,15	CG31248	0,08
163.	18-5,10	CG8189	0,07 ATPsyn-b
164.	18-5,12	CG1519	0,07 Prosalpha7
165.	18-7,1	CG6815	0,13 bor
166.	18-8,2	CG2182	0,09
167.	18-11,2	CG11329	0,11
168.	18-12,11	CG13463	0,05
169.	18-15,15	CG1873	0,09 Eflalpha100 E
170.	18-18,14	CG31639	0,09
171.	18-19,1	CG13544	0,1
172.	18-19,18	CG1231	0,07
173.	18-20,1	CG31306	0,06 btsz
174.	18-20,9	CG5248	0,08 loco
175.	19-1,9	CG2249	0,14
176.	19-9,19	CG1474	0,16 Es2
177.	19-18,4	CG9914	0,1
178.	19-18,17	CG13396	0,12 fy
179.	19-19,15	CG17146	0,13 Adk1
180.	19-20,14	CG17051	0,12 dod
181.	19-20,19	CG10298	0,13
182.	19-22,14	CG31204	0,07
183.	19-22,15	CG4631	0,1
184.	20-5,6	CG1681	0,16
185.	20-5,8	CG7815	0,16 ran-like
186.	20-5,9	LP03261	0,14
187.	20-5,11	CG9771	0,13 Dip2
188.	20-5,18	CG18284	0,18
189.	20-16,13	CG10365	0,1
190.	20-18,19	AT11857	0,14
		CG6154	
191.	20-18,23	CG12692	0,12
192.	20-19,4	CG31910	0,13
193.	20-20,1	GH07769	0,15 mod(mdg4)
		CG7859	
194.	20-20,6	CG2457	0,16 inaF
195.	20-20,7	CG1857	0,18 nec
196.	20-21,3	CG12217	0,12 PpV
197.	20-21,11	CG12924	0,13
198.	21-4,17	CG9356	0,1
199.	21-7,22	CG1034	0,12 bcd
200.	21-8,2	CG8705	0,11 pnut
201.	21-9,20	CG5196	0,12
202.	21-9,21	CG7503	0,12 Con

Index	Label	Name	Ratio Symbol
203.	21-10,6	CG18069	0,12 CaMKII
204.	21-10,7	CG1703	0,1
205.	21-13,21	RE26306	0,12
206.	21-14,17	CG8357	0,11 Rep1
207.	21-19,9	CG14106	0,12
208.	21-20,4	CG17030	0,12
209.	21-20,24	CG13319	0,09
210.	21-21,4	CG2444	0,12
211.	21-21,22	SD15221	0,07
		CG17474	
212.	21-22,9	CG31178	0,15
213.	21-22,19	CG18128	0,08
214.	22-2,10	CG11679	0,13
215.	22-3,4	CG4832	0,1 cnn
216.	22-5,11	CG12112	0,11
217.	22-6,23	CG18656	0,09
218.	22-9,10	CG1799	0,14 ras
219.	22-11,5	CG7161	0,15
220.	22-12,3	CG9254	0,16
221.	22-19,14	CG13340	0,12
222.	22-20,15	CG6375	0,11 pit
223.	22-20,24	GM31840	0,06
		CG15763	
224.	23-3,22	LD32791	0,14
225.	23-4,5	CG16936	0,12
226.	23-4,24	CG18593	0,14 viaf1
227.	23-8,23	CG8980	0,09 NiPp1
228.	23-9,20	CG7470	0,14
229.	23-9,23	GH26692	0,13
230.	23-10,4	CG4203	0,13
231.	23-10,7	CG15862	0,14 Pka-R2
232.	23-13,3	CG6583	0,11
233.	23-17,16	CG32112	0,12
234.	23-19,9	CG6914	0,09
235.	23-20,2	CG8198	0,1 l(1)G0136
236.	23-20,8	CG7570	0,09 hale
237.	23-21,6	CG4109	0,1 Syx8
238.	23-22,13	CG32806	0,09
239.	23-22,17	CG30334	0,11
240.	24-5,20	CG9629	0,14
241.	24-6,5	CG8725	0,13 CSN4
242.	24-7,14	CG3508	0,13
243.	24-9,5	CG9007	0,12
244.	24-11,24	CG7094	0,16
245.	24-18,24	CG11262	0,14
246.	24-19,12	CG10748	0,09
247.	24-19,15	CG15730	0,12
248.	24-20,22	HL07902	0,07
		CG7402	
249.	24-21,4	CG11300	0,07
250.	25-2,19	CG13349	0,1
251.	25-4,13	CG2681	0,1
252.	25-7,18	CG10625	0,12
253.	25-9,17	CG32075	0,15
254.	25-9,20	CG15818	0,1
255.	25-10,2	CG3707	0,13 wapl
256.	25-22,20	CG32081	0,08
257.	25-22,22	CG31646	0,08
258.	26-1,12	CG17531	0,09 GstE7
259.	26-3,19	CG5277	0,1 Ip259
260.	26-3,22	CG7048	0,08
261.	26-4,12	CG17210	0,1 scpr-B
262.	26-8,14	CG32654	0,09
263.	26-16,8	CG14687	0,12
264.	26-16,18	CG3683	0,09
265.	26-18,11	CG7292	0,1 Rrp6
266.	26-18,22	CG8542	0,06 Hsc70-5
267.	26-19,6	CG2127	0,11
268.	26-21,1	CG11064	0,13 RfaBp
269.	27-4,4	CG9946	0,11 eIF-2alpha
270.	27-8,23	CG31110	0,11
271.	27-9,19	CG3689	0,12
272.	27-9,22	CG16896	0,12
273.	27-10,24	CG8494	0,15
274.	27-13,18	RE28720	0,1
		CG12643	
275.	27-18,12	CG11710	0,12

Index	Label	Name	Ratio Symbol
276.	27-19,1	CG12446	0,09
277.	27-20,20	CG12617	0,09
278.	27-22,10	CG17154	0,07
279.	28-1,3	GM01028	0,11
		CG13303	
280.	28-1,7	CG11007	0,15
281.	28-4,5	CG8636	0,1
282.	28-4,18	CG7891	0,16
283.	28-19,3	CG3814	0,14
284.	28-19,15	CG4659	0,11 Srp54k
285.	29-3,21	CG4012	0,11 gek
286.	29-4,1	CG7929	0,11 ocn
287.	29-8,15	CG31033	0,13
288.	29-9,16	CG13091	0,14
289.	29-9,19	GH06691	0,13
		CG11811	
290.	29-9,23	CG7583	0,09 CtBP
291.	29-13,15	CG5802	0,13
292.	29-17,6	CG14802	0,13
293.	29-18,19	AT02643	0,1 Gyc32E
		CG6275	
294.	29-20,11	CG2267	0,11
295.	29-21,2	LP01382	0,13
		CG5417	
296.	29-21,16	CG2906	0,1
297.	29-21,24	CG32021	0,13
298.	29-22,16	CG31784	0,1
299.	30-2,18	CG4710	0,14
300.	30-9,7	CG4351	0,16
301.	30-9,15	CG3016	0,12
302.	30-11,8	SD07683	0,13
303.	30-19,14	CG13032	0,13
304.	30-20,3	CG8635	0,13
305.	30-21,2	CG8997	0,08
306.	30-21,3	CG12181	0,1 Sgs4
307.	31-2,18	CG6598	0,11 Fdh
308.	31-4,15	CG10233	0,17
309.	31-4,17	CG10116	0,13
310.	31-5,8	CG11560	0,11
311.	31-9,2	CG6772	0,14 Slob
312.	31-9,24	CG8358	0,15
313.	31-10,3	CG9741	0,1 Dhod
314.	31-10,7	CG31223	0,15
315.	31-19,18	AT24649	0,09 Trf
		CG7562	
316.	32-4,13	CG17664	0,08
317.	32-6,14	CG8931	0,12
318.	32-8,3	CG6422	0,16
319.	32-17,3	RH44537	0,14
		CG5447	
320.	32-19,1	CG33017	0,13
321.	32-19,6	CG17764	0,1
322.	32-21,6	CG15219	0,07
323.	32-21,18	CG6353	0,09
324.	33-4,11	CG13095	0,14
325.	33-4,14	CG6290	0,09
326.	33-5,10	CG18495	0,11 Prosalpha6
327.	33-5,15	CG3955	0,09
328.	33-7,1	CG12855	0,17
329.	33-7,8	CG16705	0,14
330.	33-7,24	CG2982	0,12
331.	33-8,9	CG8657	0,13 Dgkepsilon
332.	33-8,16	CG13096	0,14
333.	33-8,17	CG15811	0,15 Rop
334.	33-9,24	CG1640	0,13
335.	33-11,15	CG7123	0,13 LanB1
336.	33-18,15	CG12186	0,09 Aats-pro
337.	33-18,18	AT05157	0,13
		CG14755	
338.	33-20,16	CG3579	0,08
339.	33-22,1	CG15525	0,14
340.	33-22,14	CG12377	0,09
341.	34-4,12	GH25188	0,1
342.	34-5,11	CG7789	0,11
343.	34-9,22	CG4261	0,14 Hel89B
344.	34-16,11	CG11821	0,11 Cyp12a5
345.	34-19,16	CG8226	0,17

Index	Label	Name	Ratio Symbol
346.	34-21,15	CG14346	0,13
347.	34-21,19	CG6547	0,1 mRpL2a
348.	35-1,2	CG1249	0,08
349.	35-1,6	CG4463	0,07 Hsp23
350.	35-9,12	CG10267	0,13
351.	35-9,18	CG7811	0,15 b
352.	35-11,8	CG12110	0,15 Pld
353.	35-19,6	CG12439	0,1
354.	35-19,18	CG12018	0,13
355.	35-19,22	CG1842	0,09 Dhc98D
356.	35-20,19	CG13244	0,07
357.	35-22,15	CG11369	0,09
358.	36-7,13	CG3959	0,12 pelo
359.	36-8,10	CG4721	0,13
360.	36-9,9	CG1597	0,17
361.	36-12,21	CG11971	0,12
362.	36-13,3	CG15598	0,12 Osi17
363.	36-15,23	CG12399	0,12 Mad
364.	36-18,16	CG6441	0,09
365.	36-20,3	CG7052	0,12 TepII
366.	36-20,5	CG10812	0,16 dro5
367.	37-4,23	CG32444	0,11
368.	37-5,1	CG1057	0,08 Trap18
369.	37-6,10	CG11910	0,13
370.	37-10,1	CG3345	0,09
371.	37-10,4	CG3429	0,14
372.	37-10,5	CG6293	0,12
373.	37-10,8	CG2944	0,13
374.	37-19,8	CG10920	0,14
375.	37-19,24	CG31287	0,09
376.	37-20,15	CG12795	0,09
377.	37-21,14	LP03989	0,13
		CG30099	
378.	38-1,13	CG5919	0,11
379.	38-3,18	CG9611	0,16
380.	38-7,21	CG6851	0,11 Mtch
381.	38-8,8	CG2179	0,11 Xe7
382.	38-18,10	CG14480	0,13
383.	38-20,24	CG14817	0,11
384.	38-21,13	LP11016	0,1 MED18
		CG14802	
385.	38-22,15	CG14690	0,06
386.	38-22,19	CG31468	0,08
387.	39-7,19	CG11266	0,15
388.	39-8,13	CG11546	0,13 l(2)02045
389.	39-8,20	CG3017	0,15 Alas
390.	39-9,18	CG31298	0,15 beat-Vb
391.	39-9,19	CG8669	0,16 crc
392.	39-9,22	CG7734	0,11 shn
393.	39-10,3	CG17746	0,13
394.	39-10,6	CG4942	0,13
395.	39-10,8	CG4542	0,14
396.	39-13,5	CG5385	0,11
397.	39-18,9	CG33129	0,12
398.	39-18,21	CG15498	0,12
399.	39-20,1	CG30116	0,12
400.	39-21,11	CG3440	0,09 Pcp
401.	39-21,20	CG14273	0,09
402.	40-2,4	CG6182	0,11
403.	40-4,20	CG12170	0,1
404.	40-6,20	CG3772	0,11 cry
405.	40-9,1	CG7729	0,15
406.	40-11,3	CG11299	0,16
407.	40-12,2	CG31533	0,11
408.	40-14,18	CG5510	0,11
409.	40-16,9	CG32553	0,12
410.	40-18,13	CG7975	0,08 Grx-1
411.	40-19,6	CG14339	0,13
412.	40-19,7	CG8885	0,11
413.	40-21,2	LP08165	0,13
		CG32697	
414.	40-21,4	CG2556	0,14
415.	40-21,8	CG1443	0,12
416.	40-21,9	CG32091	0,09
417.	41-1,5	CG5885	0,1
418.	41-3,18	CG9847	0,14 Fkbp13
419.	41-3,19	CG1098	0,13 CG1098

Index	Label	Name	Ratio	Symbol
420.	41-7,16	CG5383	0,13	PSR
421.	41-8,16	CG6792	0,1	
422.	41-9,24	CG9054	0,14	Ddx1
423.	41-10,19	CG14801	0,17	
424.	41-16,12	CG13935	0,09	
425.	41-19,11	AT16656	0,09	
		CG12609		
426.	41-19,17	CG13168	0,1	
427.	41-20,22	CG7770	0,08	
428.	41-21,4	CG1850	0,07	
429.	41-21,13	CG6675	0,09	
430.	41-21,15	CG1139	0,1	
431.	42-5,4	CG4338	0,12	
432.	42-7,9	CG4262	0,14	elav
433.	42-9,3	CG1575	0,13	
434.	42-18,16	CG14448	0,1	
435.	42-19,4	CG17991	0,09	
436.	42-19,16	CG9582	0,09	
437.	43-1,18	CG7818	0,11	
438.	43-4,10	CG3139	0,11	syt
439.	43-5,2	CG9021	0,14	
440.	43-7,17	CG2198	0,14	Ama
441.	43-8,10	CG13097	0,14	
442.	43-18,16	CG32138	0,13	
443.	43-19,3	CG30161	0,09	
444.	43-22,9	CG9173	0,13	
445.	44-5,7	CG16719	0,14	
446.	44-13,18	CG9522	0,14	
447.	44-18,16	CG5987	0,14	
448.	44-19,4	CG6497	0,1	
449.	44-19,7	AT22150	0,13	
450.	44-19,23	CG18646	0,11	mst
451.	44-20,15	CG1424	0,1	
452.	44-20,23	CG9769	0,09	
453.	44-21,4	CG15757	0,14	
454.	44-21,20	CG33130	0,1	l(2)k07433
455.	45-1,8	HL03474	0,09	
		CG15293		
456.	45-4,4	CG4265	0,12	Uch
457.	45-5,15	CG1381	0,11	
458.	45-6,4	CG10157	0,11	
459.	45-8,13	CG6296	0,12	
460.	45-9,3	CG11255	0,11	
461.	45-9,19	CG1438	0,09	Cyp4c3
462.	45-9,21	CG5191	0,15	
463.	45-9,23	CG18476	0,08	
464.	45-13,24	CG3069	0,13	Taf10b
465.	45-18,16	CG17744	0,09	
466.	45-19,4	CG13148	0,08	
467.	45-19,12	CG5207	0,08	scpr-A
468.	45-20,12	CG10560	0,08	
469.	45-20,17	CG3712	0,12	mRpL33
470.	45-21,12	CG8360	0,12	
471.	46-1,17	LD14406	0,08	
472.	46-2,20	CG1900	0,12	Rab40
473.	46-5,1	CG5703	0,07	
474.	46-5,3	CG4604	0,15	GLaz
475.	46-8,24	CG7957	0,14	Trap80
476.	46-18,12	CG7551	0,08	
477.	46-18,20	CG32560	0,08	
478.	46-22,9	CG40188	0,07	
479.	47-1,6	LD03340	0,11	Rab14
		CG4212		
480.	47-2,4	CG11173	0,11	usnp
481.	47-4,2	CG8230	0,09	
482.	47-4,14	CG4070	0,1	Tis11
483.	47-9,18	CG7669	0,12	
484.	47-9,20	CG3981	0,11	Unc-76
485.	47-9,24	CG10269	0,13	D19A
486.	47-10,2	CG5127	0,12	
487.	47-10,4	CG17520	0,1	CkIIalpha
488.	47-10,8	CG3071	0,14	
489.	47-10,24	CG31163	0,16	
490.	47-17,17	CG7322	0,13	
491.	47-18,9	CG8105	0,11	
492.	47-18,18	CG11333	0,11	
493.	47-21,9	CG7604	0,15	Eig71Ee

Index	Label	Name	Ratio	Symbol
494.	47-21,12	LP03575	0,1	
		CG3219		
495.	47-22,12	CG33187	0,08	
496.	47-22,20	CG31538	0,08	
497.	48-1,5	CG5532	0,08	
498.	48-1,21	CG13333	0,11	
499.	48-4,12	GH14656	0,1	
		CG12699		
500.	48-5,16	CG8436	0,18	
501.	48-7,16	CG2903	0,13	Hrs
502.	48-8,17	CG10578	0,18	DnaJ-1
503.	48-11,4	CG1951	0,13	
504.	48-11,5	CG10293	0,13	how
505.	48-14,4	CG6246	0,12	nub
506.	48-14,7	CG4647	0,12	mRpL49
507.	48-18,16	AT08279	0,12	
		CG9491		
508.	48-22,11	CG8840	0,08	

Tabelle 3 WT60G vs. Syn0G Vergleich auf Array Nummer 12926953. Die Ratio war <0,17.

Index	Label	Name	Ratio	Symbol
1.	1-1,10	CG12238	0,39	l(1)G0084
2.	1-1,11	CG5864	0,41	AP-1sigma
3.	1-1,17	CG10495	0,38	
4.	1-3,19	CG11070	0,49	
5.	1-3,23	CG18617	0,39	Vha100-2
6.	1-4,18	CG4377	0,35	
7.	1-5,14	CG17183	0,32	Trap25
8.	1-7,2	CG32597	0,48	l(1)G0469
9.	1-7,4	CG2865	0,28	
10.	1-8,4	CG3806	0,43	eIF2B-epsilon
				fs(1)Ya
11.	1-9,13	CG2707	0,4	
12.	1-9,17	CG14536	0,22	
13.	1-9,20	CG5844	0,24	
14.	1-9,22	CG13384	0,32	
15.	1-9,24	CG11840	0,27	shanti
16.	1-12,12	CG6231	0,43	
17.	1-20,6	CG18788	0,49	
18.	1-20,15	CG9345	0,49	Adgf-C
19.	1-22,15	CG32835	0,41	
20.	2-1,9	CG7866	0,44	
21.	2-2,14	CG4206	0,43	Mcm3
22.	2-4,7	CG15514	0,33	
23.	2-4,14	CG7220	0,36	
24.	2-5,6	CG4323	0,31	
25.	2-5,8	CG5198	0,31	
26.	2-5,9	CG2976	0,34	
27.	2-8,9	CG8372	0,38	
28.	2-18,5	CG11180	0,47	
29.	2-18,18	CG14537	0,43	
30.	2-19,12	CG31826	0,45	
31.	2-21,1	CG7594	0,47	Eig71Eh
32.	3-1,1	CG8261	0,41	Ggamma1
33.	3-4,15	GH05710	0,3	
34.	3-4,21	CG31795	0,33	ia2
35.	3-4,24	CG1340	0,3	
36.	3-5,9	CG7803	0,37	z
37.	3-8,11	CG4276	0,37	aru
38.	3-8,17	CG5608	0,35	
39.	3-9,17	CG12109	0,3	Caf1-180
40.	3-9,19	CG14941	0,27	esc
41.	3-21,11	LP06778	0,43	Pp1-87B
		CG5650		
42.	4-4,10	CG32278	0,37	
43.	4-5,6	CG13603	0,38	
44.	4-5,11	CG6164	0,35	
45.	4-7,9	CG7971	0,34	
46.	4-7,12	CG1725	0,29	dlgl
47.	4-7,18	CG32789	0,4	
48.	4-8,14	CG5888	0,24	
49.	4-10,13	CG9934	0,27	
50.	4-21,12	CG9917	0,49	

Index	Label	Name	Ratio	Symbol
51.	4-21,14	CG10268	0,38	
52.	5-5,11	CG5739	0,32	
53.	5-8,20	CG7793	0,28	Sos
54.	5-9,18	GH05702	0,32	
		CG4757		
55.	5-10,2	CG7574	0,49	bip1
56.	5-10,4	CG5081	0,33	Syx7
57.	5-10,5	CG3430	0,4	
58.	5-10,20	CG8817	0,27	lilli
59.	5-11,5	CG3376	0,46	
60.	5-12,22	CG4972	0,41	
61.	5-16,14	RH02591	0,42	
62.	5-19,12	CG5075	0,43	
63.	6-2,9	CG7981	0,49	trol
64.	6-3,19	CG10863	0,36	
65.	6-4,24	CG8920	0,3	
66.	6-5,7	CG3245	0,38	PpN58A
67.	6-5,10	CG7006	0,37	
68.	6-5,16	CG31898	0,36	
69.	6-8,16	CG17158	0,31	cpb
70.	6-9,22	CG3979	0,28	Indy
71.	6-11,4	CG6588	0,46	Fas1
72.	6-15,9	CG17715	0,46	
73.	6-20,10	CG15014	0,48	
74.	6-22,12	CG31733	0,4	ms(2)35Ci
75.	7-1,22	CG1838	0,5	myoglianin
76.	7-2,8	CG8649	0,42	Fim
77.	7-2,9	CG7239	0,49	
78.	7-2,14	GM06804	0,43	
79.	7-4,10	CG8905	0,34	Sod2
80.	7-4,11	CG4919	0,38	Gclm
81.	7-4,15	CG3564	0,34	
82.	7-4,22	CG3466	0,4	Cyp4d2
83.	7-5,2	CG11035	0,42	
84.	7-5,8	CG17052	0,35	
85.	7-5,15	CG10200	0,41	
86.	7-7,20	CG8326	0,31	
87.	7-8,13	CG10007	0,36	
88.	7-9,16	CG9968	0,27	Anxb11
89.	7-9,20	CG3690	0,29	
90.	7-9,21	CG6518	0,25	inaC
91.	7-9,23	CG9431	0,32	kek4
92.	7-10,6	CG2867	0,26	Prat
93.	7-10,7	CG9424	0,31	bocksbeutel
94.	7-15,1	CG7034	0,46	sec15
95.	7-22,21	CG4073	0,39	
96.	8-1,23	CG9553	0,35	chic
97.	8-2,21	CG11961	0,46	
98.	8-4,11	CG11459	0,38	
99.	8-4,23	CG32833	0,37	
100.	8-5,1	CG31199	0,46	
101.	8-5,6	GH23165	0,3	
102.	8-5,14	CG5442	0,37	SC35
103.	8-7,23	CG5940	0,27	CycA
104.	8-11,2	CG14764	0,41	
105.	9-1,17	CG2028	0,44	Cklalpha
106.	9-3,18	CG2061	0,43	
107.	9-4,11	CG3318	0,28	Dat
108.	9-5,11	CG9366	0,33	RhoL
109.	9-5,14	CG4924	0,34	icln
110.	9-7,22	CG7319	0,4	
111.	9-8,13	CG30059	0,38	
112.	9-9,17	CG1710	0,35	Hcf
113.	9-9,19	CG6145	0,3	
114.	9-9,23	CG15438	0,29	
115.	9-11,13	CG2269	0,48	
116.	9-19,1	CG10484	0,4	Dox-A2
117.	9-20,15	CG32100	0,44	
118.	9-22,21	CG32601	0,5	
119.	10-4,21	CG5181	0,33	
120.	10-5,1	CG6674	0,35	
121.	10-5,8	CG32262	0,43	
122.	10-5,12	CG6443	0,3	
123.	10-8,3	CG5632	0,33	thoc6
124.	10-8,6	CG10444	0,26	
125.	10-8,19	CG31388	0,3	
126.	10-10,4	CG30115	0,32	

Index	Label	Name	Ratio	Symbol
127.	10-10,7	CG33202	0,3	dpr11
128.	10-19,20	CG5362	0,39	
129.	11-3,5	CG4068	0,44	
130.	11-4,9	CG3699	0,41	
131.	11-4,15	CG12749	0,37	Hrb87F
132.	11-4,17	CG2652	0,34	
133.	11-5,11	CG15820	0,38	
134.	11-5,13	CG2139	0,39	aralar1
135.	11-7,22	CG6187	0,29	RluA-2
136.	11-9,6	CG18398	0,32	
137.	11-9,18	CG33116	0,29	
138.	12-1,11	CG32418	0,47	
139.	12-4,20	CG4968	0,38	
140.	12-5,5	CG32295	0,36	
141.	12-5,9	CG3756	0,39	
142.	12-7,18	CG6355	0,37	
143.	12-8,4	CG4649	0,32	Sodh-2
144.	12-8,14	CG8193	0,35	
145.	12-9,22	CG6230	0,32	
146.	12-10,23	CG1965	0,18	
147.	13-3,3	CG4616	0,31	
148.	13-4,1	CG12182	0,38	
149.	13-4,4	CG2082	0,41	
150.	13-4,22	CG3321	0,35	
151.	13-5,2	CG3594	0,29	Eap
152.	13-5,16	CG9796	0,22	
153.	13-8,19	CG3692	0,3	CalpC
154.	13-9,18	CG9347	0,24	ninaB
155.	13-9,19	CG8678	0,23	
156.	13-9,21	CG2736	0,29	
157.	13-9,23	CG6406	0,35	
158.	13-10,2	CG8006	0,39	
159.	13-10,3	CG6664	0,3	
160.	13-10,7	CG4162	0,26	lace
161.	13-19,5	CG17216	0,47	KP78a
162.	13-20,7	CG16996	0,45	
163.	13-20,14	GH14137	0,4	
164.	13-20,20	CG9445	0,44	
165.	13-22,9	CG30093	0,44	
166.	13-22,14	CG31851	0,48	
167.	14-1,6	CG9154	0,4	
168.	14-3,2	CG14786	0,45	
169.	14-5,12	CG10161	0,31	eIF-3p66
170.	14-9,21	CG3025	0,28	mof
171.	14-10,5	CG8135	0,27	
172.	14-11,2	CG7162	0,46	Trap220
173.	14-11,6	CG11526	0,44	
174.	14-11,18	CG32811	0,46	
175.	14-18,17	CG13349	0,44	
176.	14-19,6	CG32598	0,44	
177.	14-19,8	AT18965	0,42	Obp19b
		CG1670		
178.	14-19,15	CG10516	0,46	
179.	14-20,12	CG10343	0,45	
180.	15-1,10	LD12474	0,36	
		CG4455		
181.	15-2,1	CG3026	0,43	mus81
182.	15-3,18	CG7436	0,33	Nmt
183.	15-5,4	CG5194	0,34	
184.	15-5,5	CG4036	0,35	
185.	15-7,20	CG6398	0,21	
186.	15-8,15	CG5434	0,29	
187.	15-9,18	CG7069	0,26	
188.	15-9,22	CG31343	0,27	
189.	15-9,24	GH26828	0,26	
190.	15-10,4	LD29359	0,22	
		CG1062		
191.	15-10,5	CG2260	0,25	
192.	15-10,8	CG13425	0,25	bl
193.	15-19,23	CG32686	0,44	
194.	15-20,7	CG10845	0,39	
195.	15-21,9	CG32284	0,43	
196.	16-2,10	CG3132	0,5	Ect3
197.	16-5,10	CG8501	0,39	
198.	16-5,16	CG5108	0,48	mRpS7
199.	16-8,1	CG1635	0,33	
200.	16-8,10	CG3066	0,35	

Index	Label	Name	Ratio	Symbol
201.	16-9,1	CG32756	0,31	
202.	16-9,3	CG6205	0,33	por
203.	16-9,16	CG1105	0,28	
204.	16-12,2	CG30487	0,38	
205.	16-14,24	CG13643	0,5	
206.	16-19,18	CG3694	0,36	Gamma30A
207.	16-19,21	CG4073	0,44	
208.	16-21,12	CG4624	0,49	
209.	17-2,11	CG17270	0,23	
210.	17-4,13	CG18249	0,22	
211.	17-4,16	CG9400	0,26	
212.	17-4,21	CG7448	0,2	
213.	17-5,8	CG9196	0,23	
214.	17-7,3	CG4955	0,23	
215.	17-7,5	CG1317	0,34	
216.	17-7,18	CG3654	0,21	
217.	17-9,2	CG6054	0,29	Su(fu)
218.	17-9,17	CG8399	0,3	
219.	17-9,19	CG12178	0,28	Nhe1
220.	17-9,21	CG10641	0,25	
221.	17-9,23	CG14642	0,27	
222.	17-10,3	CG6611	0,23	ect
223.	17-12,24	CG31272	0,4	
224.	17-15,19	RE05127	0,41	Glycogenin
		CG9480		
225.	17-18,19	CG17669	0,46	
226.	17-20,7	CG31722	0,38	
227.	17-20,10	CG31090	0,48	
228.	18-1,9	CG11981	0,42	Prosbeta3
229.	18-1,20	CG11804	0,47	ced-6
230.	18-2,15	CG3488	0,44	
231.	18-4,1	CG2151	0,35	Trxr-1
232.	18-4,4	CG11784	0,32	
233.	18-4,15	CG31248	0,31	
234.	18-5,10	CG8189	0,32	ATPsyn-b
235.	18-5,12	CG1519	0,36	Prosalpha7
236.	18-7,1	CG6815	0,29	bor
237.	18-8,2	CG2182	0,32	
238.	18-9,13	CG6007	0,33	gatA
239.	18-11,1	CG11329	0,36	
240.	18-18,14	CG31639	0,45	
241.	18-19,17	CG1231	0,43	
242.	19-3,20	CG8920	0,42	
243.	19-7,24	CG3165	0,26	
244.	19-8,19	CG8340	0,33	128up
245.	19-9,18	SD02481	0,27	
246.	19-9,20	CG1474	0,29	Es2
247.	19-9,21	CG32177	0,28	
248.	19-11,14	CG32514	0,46	
249.	20-1,4	CG1518	0,43	
250.	20-2,15	CG4936	0,41	
251.	20-3,19	CG2118	0,3	
252.	20-3,22	CG12708	0,37	
253.	20-5,8	CG7815	0,44	ran-like
254.	20-7,23	CG8351	0,26	
255.	20-8,23	CG4317	0,37	Mipp2
256.	20-17,2	CG10447	0,45	
257.	20-18,20	AT11857	0,5	
258.	20-18,24	CG12692	0,49	
259.	20-20,6	CG2457	0,43	inaF
260.	20-20,8	CG1857	0,5	nec
261.	20-21,3	CG12217	0,38	PpV
262.	21-4,4	CG15437	0,32	morgue
263.	21-4,13	CG12744	0,46	
264.	21-4,17	CG9356	0,31	
265.	21-5,3	CG12363	0,36	Dlc90F
266.	21-5,5	CG14999	0,36	RfC40
267.	21-5,14	CG7081	0,4	
268.	21-6,12	CG12239	0,4	
269.	21-7,22	CG1034	0,29	bcd
270.	21-8,1	CG8705	0,33	pnut
271.	21-9,16	CG8532	0,31	lqf
272.	21-9,20	CG5196	0,39	
273.	21-9,22	CG7503	0,3	Con
274.	21-9,24	CG33075	0,26	
275.	21-10,3	CG6276	0,27	
276.	21-10,5	CG18069	0,35	CaMKII

Index	Label	Name	Ratio	Symbol
277.	21-10,7	CG1703	0,28	
278.	21-21,3	CG2444	0,47	
279.	22-2,9	CG11679	0,49	
280.	22-3,4	CG4832	0,38	cnn
281.	22-4,14	CG4207	0,34	bonsai
282.	22-5,12	CG12112	0,36	
283.	22-6,24	CG18656	0,49	
284.	22-7,22	CG1420	0,3	
285.	22-9,9	CG1799	0,33	ras
286.	22-11,5	CG7161	0,43	
287.	22-11,7	CG18214	0,46	trio
288.	22-12,3	CG9254	0,35	
289.	22-18,11	CG1571	0,44	
290.	22-19,13	CG13340	0,44	
291.	22-20,24	GM31840	0,37	
		CG3323		
292.	23-3,20	HL08134	0,39	
293.	23-3,22	LD32791	0,34	
		CG1544		
294.	23-4,5	CG16936	0,42	
295.	23-4,24	CG18593	0,4	viafl
296.	23-5,2	CG6199	0,29	
297.	23-5,9	CG8067	0,36	
298.	23-5,12	CG10916	0,38	
299.	23-8,24	CG8980	0,4	NiPp1
300.	23-9,18	CG17019	0,36	
301.	23-9,20	CG7470	0,3	
302.	23-9,21	CG7628	0,26	
303.	23-9,23	GH26692	0,29	
304.	23-10,3	CG4203	0,27	
305.	23-10,5	CG14444	0,25	
306.	23-10,7	CG15862	0,22	Pka-R2
307.	23-13,3	CG6583	0,5	
308.	23-17,16	CG32112	0,47	
309.	23-20,5	CG4483	0,36	
310.	23-20,7	CG7570	0,45	hale
311.	23-21,6	CG4109	0,47	Syx8
312.	23-22,14	CG32806	0,47	
313.	23-22,18	CG30334	0,47	
314.	24-4,20	CG9483	0,39	
315.	24-5,7	CG32450	0,37	
316.	24-5,20	CG9629	0,48	
317.	24-6,6	CG8725	0,44	CSN4
318.	24-7,2	CG11259	0,36	MICAL-like
319.	24-7,5	CG12047	0,28	
320.	24-7,13	CG3508	0,2	
321.	24-9,1	CG6755	0,31	
322.	24-9,6	CG9007	0,27	
323.	24-11,24	CG7094	0,32	
324.	24-19,21	CG7363	0,5	
325.	25-2,19	CG13349	0,49	
326.	25-4,13	CG2681	0,36	
327.	25-4,18	CG32488	0,35	
328.	25-5,11	CG1803	0,37	regucalcin
329.	25-5,13	CG4510	0,41	Surf6
330.				
331.	25-7,17	CG10625	0,39	
332.	25-9,18	CG32075	0,34	
333.	25-9,19	CG15818	0,31	
334.	25-9,23	CG12101	0,25	Hsp60
335.	25-10,2	CG3707	0,23	wapl
336.	25-19,17	CG1625	0,28	
337.	25-20,3	AT28783	0,41	
338.	26-3,20	CG5277	0,35	Ip259
339.	26-3,21	CG7048	0,4	
340.	26-4,11	CG17210	0,31	scpr-B
341.	26-4,15	CG8588	0,36	
342.	26-5,11	CG4424	0,3	
343.	26-6,14	CG6416	0,47	
344.	26-8,14	CG32654	0,31	
345.	26-18,12	CG7292	0,4	Rrp6
346.	26-18,21	CG8542	0,48	Hsc70-5
347.	26-19,5	CG2127	0,43	CG2127
348.	27-4,3	CG9946	0,3	eIF-2alpha
349.	27-4,10	CG5107	0,3	CG5107
350.	27-5,11	CG5826	0,41	Prx5037
351.	27-7,20	CG5212	0,3	Pli

Index	Label	Name	Ratio	Symbol
352.	27-8,24	CG31110	0,39	
353.	27-9,9	CG6686	0,34	
354.	27-9,20	CG3689	0,27	
355.	27-9,21	CG16896	0,32	
356.	27-10,24	CG8494	0,26	
357.	27-18,12	CG11710	0,39	
358.	28-1,4	GM01028	0,47	
359.	28-1,5	CG11899	0,44	
360.	28-1,7	CG11007	0,44	
361.	28-4,5	CG8636	0,35	
362.	28-4,17	CG7891	0,34	
363.	28-5,2	CG3862	0,35	
364.	28-5,4	CG31988	0,37	
365.	28-5,5	CG31451	0,38	
366.	28-8,16	CG5248	0,24	loco
367.	28-9,2	CG7384	0,49	
368.	28-9,7	CG18408	0,43	CAP
369.	28-20,13	CG1602	0,45	
370.	29-3,20	GH13704	0,36	γ Cop
		CG1528		
371.	29-3,21	CG4012	0,35	gek
372.	29-4,2	CG7929	0,36	ocn
373.	29-5,11	CG5174	0,32	
374.	29-8,15	CG31033	0,48	
375.	29-9,11	CG8485	0,32	
376.	29-9,16	CG13091	0,34	
377.	29-9,17	CG9165	0,31	l(3)02640
378.	29-9,19	GH06691	0,31	
		CG11811		
379.	29-9,21	CG18585	0,31	
380.	29-9,23	CG7583	0,36	CtBP
381.	29-10,1	CG4821	0,32	Tequila
382.	29-10,8	CG1643	0,33	
383.	29-17,5	CG14802	0,45	
384.	29-19,23	AT25392	0,46	
385.	30-1,17	CG1430	0,48	bys
386.	30-2,18	CG4710	0,48	
387.	30-5,7	CG1468	0,36	
388.	30-5,11	CG2905	0,3	Nipped-A
389.	30-5,14	CG4258	0,33	dbe
390.	30-7,6	CG10593	0,37	Acer
391.	30-9,8	CG4351	0,35	
392.	30-9,15	CG3016	0,3	
393.	30-19,15	CG33147	0,46	
394.	30-19,22	CG33041	0,5	
395.	31-2,18	CG6598	0,43	Fdh
396.	31-4,9	CG10616	0,38	
397.	31-4,15	CG10233	0,49	
398.	31-4,18	CG10116	0,37	
399.	31-4,19	CG12261	0,39	mRpS22
400.	31-5,8	CG11560	0,34	
401.	31-5,15	CG16926	0,41	
402.	31-7,12	CG30190	0,33	
403.	31-9,1	CG6772	0,36	Slob
404.	31-9,18	CG1208	0,34	
405.	31-9,22	CG33115	0,32	
406.	31-9,24	CG8358	0,33	
407.	31-10,3	CG9741	0,3	Dhod
408.	31-10,7	CG31223	0,33	
409.	32-4,12	CG7054	0,38	
410.	32-4,14	CG17664	0,36	
411.	32-5,12	CG8208	0,46	MBD-like
412.	32-5,13	CG8132	0,42	
413.	32-7,13	CG11802	0,33	
414.	32-8,4	CG6422	0,34	
415.	32-9,11	CG15445	0,29	
416.	32-21,5	CG15219	0,47	
417.	32-22,10	CG4683	0,48	
418.	33-4,7	CG5815	0,49	
419.	33-4,13	CG6290	0,45	
420.	33-4,15	CG30412	0,47	
421.	33-4,19	CG17035	0,36	GXIVPLA2
422.	33-5,9	CG18495	0,46	Prosalpha6
423.	33-5,12	CG5869	0,38	
424.	33-7,1	CG12855	0,34	
425.	33-7,7	CG16705	0,32	
426.	33-7,23	CG2982	0,36	

Index	Label	Name	Ratio	Symbol
427.	33-9,4	CG30055	0,45	
428.	33-9,20	CG4827	0,26	
429.	33-9,21	CG12213	0,36	
430.	33-20,22	GH28692	0,41	
		CG13124		
431.	34-4,10	CG11455	0,41	
432.	34-4,12	GH25188	0,42	
433.	34-4,23	CG12909	0,45	
434.	34-5,1	CG13601	0,34	
435.	34-5,9	CG12056	0,36	
436.	34-5,12	CG7789	0,38	
437.	34-9,22	CG4261	0,41	Hel89B
438.	35-1,2	CG1249	0,34	
439.	35-5,2	CG4818	0,25	
440.	35-7,22	CG7853	0,46	
441.	35-9,12	CG10267	0,39	
442.	35-9,17	CG7811	0,48	b
443.	36-4,10	CG17012	0,42	
444.	36-4,19	CG6238	0,39	ssh
445.	36-5,5	CG32333	0,34	
446.	36-7,3	CG11063	0,39	
447.	36-7,13	CG3959	0,25	pelo
448.	36-8,3	CG9523	0,33	
449.	36-8,10	CG4721	0,35	
450.	36-9,4	CG15081	0,38	l(2)03709
451.	36-9,10	CG1597	0,34	
452.	36-12,21	CG11971	0,45	
453.	37-4,9	CG17950	0,37	HmgD
454.	37-4,22	CG1846	0,5	
455.	37-4,24	CG32444	0,37	
456.	37-5,2	CG1057	0,39	Trap18
457.	37-8,7	CG8253	0,33	
458.	37-9,18	CG6959	0,31	
459.	37-9,19	CG5089	0,31	
460.	37-9,22	CG9775	0,28	
461.	37-10,2	CG3345	0,39	
462.	37-10,7	CG2944	0,27	
463.	37-10,14	CG8177	0,22	
464.	37-16,2	CG32048	0,47	
465.	38-1,14	CG5919	0,5	
466.	38-3,18	CG9611	0,44	
467.	38-4,18	CG3397	0,39	
468.	38-5,4	CG1349	0,43	dj-1beta
469.	38-5,9	CG18316	0,37	CG18316
470.	38-5,11	CG32019	0,43	bt
471.	38-7,22	CG6851	0,27	Mtch
472.	38-8,7	CG2179	0,29	Xe7
473.	38-8,16	CG2064	0,38	
474.	38-14,12	RE47429	0,44	
		CG6043		
475.	39-4,10	CG33111	0,36	
476.	39-5,8	CG8321	0,31	
477.	39-7,18	CG6700	0,37	
478.	39-7,20	CG11266	0,35	
479.	39-8,13	CG11546	0,41	l(2)02045
480.	39-8,20	CG3017	0,35	Alas
481.	39-9,17	CG31298	0,36	beat-Vb
482.	39-9,19	CG8669	0,39	crc
483.	39-9,21	CG7734	0,38	shn
484.	39-10,8	CG4542	0,41	
485.	39-10,12	CG9908	0,27	disco
486.	40-1,23	CG8809	0,41	Camta
487.	40-2,3	CG6182	0,48	
488.	40-4,12	CG10226	0,44	
489.	40-4,19	CG12170	0,31	
490.	40-5,7	CG10131	0,35	
491.	40-5,12	CG11589	0,38	VhaM9.7-1
492.	40-9,1	CG7729	0,23	
493.	40-11,1	CG7837	0,49	
494.	40-11,3	CG11299	0,47	
495.	40-12,1	CG31533	0,36	
496.	40-12,5	CG3354	0,36	Mst77F
497.	40-14,17	CG5510	0,48	
498.	40-19,7	CG8885	0,48	
499.	40-21,7	CG1443	0,46	
500.	41-1,5	CG5885	0,45	
501.	41-3,20	CG1098	0,25	

Index	Label	Name	Ratio	Symbol
502.	41-4,13	CG12428	0,28	
503.	41-7,15	CG5383	0,42	PSR
504.	41-8,15	CG6792	0,39	
505.	41-9,24	CG9054	0,27	Ddx1
506.	41-19,12	AT16656	0,47	
		CG12609		
507.	41-21,3	CG1850	0,42	
508.	42-4,16	CG1773	0,4	
509.	42-5,4	CG4338	0,4	
510.	42-7,9	CG4262	0,33	elav
511.	42-9,2	CG6754	0,49	nbs
512.	42-9,3	CG1575	0,4	
513.	43-4,9	CG3139	0,33	syt
514.	43-5,2	CG9021	0,18	
515.	43-7,18	CG2198	0,29	Ama
516.	43-7,23	CG7351	0,25	
517.	43-8,9	CG13097	0,32	
518.	43-8,20	CG8929	0,38	
519.	43-9,20	CG30493	0,37	
520.	43-22,9	CG9173	0,5	
521.	44-2,16	CG1972	0,47	
522.	44-4,12	CG8057	0,48	
523.	44-4,19	CG6459	0,41	
524.	44-5,5	CG9813	0,34	
525.	44-5,8	CG16719	0,35	
526.	44-7,17	CG9890	0,42	
527.	44-8,15	CG1912	0,27	Gycalpa99B
528.	44-8,23	CG8345	0,44	Cyp6w1
529.	44-9,12	CG7635	0,38	
530.	44-9,15	CG11184	0,35	Upf3
531.	44-10,11	CG5841	0,22	
532.	44-20,23	CG9769	0,4	
533.	45-4,3	CG4265	0,48	Uch
534.	45-4,16	CG3289	0,43	Ptpa
535.	45-5,1	CG12908	0,35	Ndg
536.	45-5,16	CG1381	0,35	
537.	45-8,14	CG6296	0,42	
538.	45-9,3	CG11255	0,28	
539.	45-9,20	CG1438	0,46	Cyp4c3
540.	45-9,21	CG5191	0,46	
541.	45-10,2	CG17888	0,27	Pdp1
542.	45-10,4	CG2670	0,27	Taf7
543.	45-10,8	CG6814	0,32	Mat89Bb
544.	45-19,24	CG6744	0,41	
545.	46-7,18	CG9858	0,27	clt
546.	46-7,20	CG6325	0,3	
547.	46-8,23	CG7957	0,24	Trap80
548.	46-9,18	CG10737	0,21	
549.	46-18,11	CG7551	0,49	
550.	46-18,20	CG32560	0,42	
551.	47-4,1	CG8230	0,37	
552.	47-4,18	CG6409	0,35	
553.	47-9,18	CG7669	0,32	
554.	47-9,20	CG3981	0,17	Unc-76
555.	47-9,21	CG17843	0,19	
556.	47-9,23	CG10269	0,22	D19A
557.	47-10,1	CG5127	0,22	
558.	47-10,8	CG3071	0,31	
559.	47-10,24	CG31163	0,16	
560.	47-17,18	CG7322	0,44	
561.	47-20,11	CG11404	0,45	
562.	47-22,12	CG33187	0,44	
563.	48-1,5	CG5532	0,5	
564.	48-1,21	CG13333	0,43	
565.	48-4,12	GH14656	0,33	
		CG12699		
566.	48-4,20	CG12375	0,4	
567.	48-5,12	CG31363	0,34	
568.	48-5,14	CG9231	0,31	
569.	48-5,15	CG8436	0,29	
570.	48-7,14	CG5276	0,23	
571.	48-7,15	CG2903	0,26	Hrs
572.	48-13,16	CG15515	0,19	
573.	48-20,11	CG18591	0,39	
574.	48-20,23	CG12373	0,35	
575.	48-21,16	CG3752	0,5	
576.	48-22,12	CG8840	0,47	

Tabelle 4 WT60G vs. SynucleinA30PG nach 45 Tagen.Vergleich auf Array Nummer 12917951. Die Ratio war <0,17.

Index	Label	Name	Rati	Symbol
0.	1-1,9	CG12238	0,26	I(1)G0084
1.	1-1,12	CG5864	0,3	AP-1sigma
2.	1-1,18	CG10495	0,27	
3.	1-1,21	CG10927	0,32	
4.	1-3,20	CG11070	0,28	
5.	1-3,24	CG18617	0,27	Vha100-2
6.	1-4,17	CG4377	0,3	
7.	1-5,14	CG17183	0,33	Trap25
8.	1-7,1	CG32597	0,24	I(1)G0469
9.	1-7,3	CG2865	0,24	
10.	1-8,4	CG3806	0,24	eIF2B-epsilon
11.	1-8,16	CG8046	0,31	
12.	1-8,21	SD05379	0,12	
13.	1-9,14	CG2707	0,26	fs(1)Ya
14.	1-9,17	CG14536	0,25	
15.	1-9,22	CG13384	0,26	
16.	1-9,23	CG11840	0,32	shanti
17.	1-11,13	CG7893	0,29	vav
18.	1-12,11	CG6231	0,29	
19.	1-14,7	CG9380	0,24	
20.	1-16,10	CG16884	0,27	
21.	1-18,12	CG31912	0,33	
22.	1-18,23	CG14644	0,24	
23.	1-19,10	CG32703	0,29	
24.	1-19,12	CG6129	0,29	
25.	1-19,15	CG1801	0,33	
26.	1-20,6	CG18788	0,32	
27.	1-20,8	CG8197	0,35	
28.	1-20,16	CG9345	0,3	Adgf-C
29.	1-20,20	CG13623	0,28	
30.	1-21,2	LP04773	0,2	
31.	1-21,18	CG1973	0,31	
32.	1-22,8	CG10688	0,28	
33.	1-22,15	CG32835	0,35	
34.	1-22,22	CG11251	0,29	
35.	2-1,9	CG7866	0,31	
36.	2-1,12	CG14716	0,33	Ho
37.	2-2,14	CG4206	0,29	Mcm3
38.	2-4,8	CG15514	0,31	
39.	2-5,9	CG2976	0,31	
40.	2-6,18	CG9746	0,26	
41.	2-9,14	CG7850	0,3	puc
42.	2-10,17	CG1141	0,25	
43.	2-17,18	CG18767	0,34	mRpL36
44.	2-18,17	CG14537	0,34	
45.	2-19,19	CG2647	0,32	per
46.	2-20,1	CG6192	0,28	
47.	2-21,2	CG7594	0,28	Eig71Eh
48.	3-1,1	CG8261	0,35	Ggamma1
49.	3-2,4	CG11652	0,3	
50.	3-4,22	CG31795	0,31	ia2
51.	3-5,10	CG7803	0,28	z
52.	3-7,23	CG10496	0,29	6
53.	3-8,12	CG4276	0,29	aru
54.	3-8,18	CG5608	0,3	
55.	3-9,18	CG12109	0,29	Caf1-180
56.	3-9,19	CG14941	0,35	esc
57.	3-11,14	CG5741	0,31	
58.	3-11,20	SD07435	0,29	
59.	3-18,9	CG1303	0,31	agt
60.	3-18,14	CG9329	0,29	
61.	3-18,17	CG10930	0,31	PpY-55A
62.	3-18,22	AT07244	0,29	
63.	3-19,12	CG13127	0,34	CG13127
64.	3-20,11	GH24429	0,26	

Index	Label	Name	Rati	Symbol
65.	3-20,13	CG17376	0,29	CG17376
66.	3-20,19	GH28556	0,28	
67.	3-21,4	LP05296	0,29	
68.	3-21,11	LP06778	0,31	
69.	3-22,17	CG31639	0,31	
70.	3-22,23	CG15323	0,25	
71.	4-1,6	CG6157	0,26	dah
72.	4-2,7	CG5335	0,26	
73.	4-2,22	CG9320	0,2	
74.	4-3,3	CG5954	0,22	l(3)mbt
75.	4-4,10	CG32278	0,32	
76.	4-6,4	CG7021	0,33	Ela
77.	4-7,10	CG7971	0,24	CG7971
78.	4-7,11	CG1725	0,26	dlg1
79.	4-7,18	CG32789	0,23	
80.	4-8,14	CG5888	0,28	
81.	4-9,13	CG7744	0,29	
82.	4-9,15	CG7101	0,34	
83.	4-10,14	CG9934	0,22	
84.	4-10,20	CG7879	0,22	
85.	4-15,5	CG40228	0,3	
86.	4-15,15	CG17523	0,35	
87.	4-18,12	CG13090	0,28	
88.	4-19,1	CG6485	0,33	
89.	4-19,13	CG3849	0,27	Lasp
90.	4-21,4	CG11138	0,28	
91.	4-21,6	CG9766	0,34	
92.	4-21,8	SD08107	0,26	
93.	4-21,12	CG9917	0,29	
94.	4-23,16	CG4120	0,26	Cyp12c1
95.	5-1,7	LD02957	0,24	
96.	5-4,11	CG7461	0,31	CG7461
97.	5-8,20	CG7793	0,28	Sos
98.	5-9,18	GH05702	0,28	
99.	5-9,23	GH22607	0,29	
100.	5-10,2	CG7574	0,22	bip1
101.	5-10,4	CG5081	0,28	Syx7
102.	5-10,6	CG3430	0,23	
103.	5-10,19	CG8817	0,28	lilli
104.	5-11,5	CG3376	0,26	
105.	5-11,13	CG8233	0,27	
106.	5-11,20	CG5394	0,31	Aats-glupro
107.	5-19,12	CG5075	0,27	
108.	5-19,13	AT14266	0,27	
109.	5-20,4	CG13030	0,29	
110.	5-20,18	CG2209	0,24	
111.	6-2,7	CG18542	0,31	
112.	6-2,10	CG7981	0,32	trol
113.	6-2,17	CG7989	0,32	l(2)k07824
114.	6-5,21	CG6008	0,31	NP15.6
115.	6-7,7	CG2916	0,3	Sep 05
116.	6-8,12	CG2910	0,32	nito
117.	6-8,15	CG17158	0,29	cpb
118.	6-8,17	CG12175	0,3	tth
119.	6-9,21	CG3979	0,31	Indy
120.	6-10,20	CG3421	0,3	RhoGAP93B
121.	6-11,2	GH25573	0,32	
122.	6-11,4	CG6588	0,32	Fas1
123.	6-11,6	SD06617	0,29	
124.	6-11,8	CG6490	0,28	
125.	6-12,11	CG12702	0,32	
126.	6-18,10	AT07490	0,27	
127.	6-19,2	CG12700	0,26	skpD
128.	6-19,10	CG5458	0,31	
129.	6-20,20	CG4464	0,33	RpS19a
130.	7-1,14	CG4208	0,32	XRCC1
131.	7-1,21	CG1838	0,31	myoglianin
132.	7-1,23	CG14066	0,33	larp
133.	7-2,8	CG8649	0,33	Fim
134.	7-2,10	CG7239	0,29	
135.	7-4,2	CG8611	0,3	
136.	7-4,10	CG8905	0,34	Sod2
137.	7-4,21	CG3466	0,28	Cyp4d2

Index	Label	Name	Rati	Symbol
138.	7-5,8	CG17052	0,34	
139.	7-5,15	CG10200	0,34	
140.	7-7,3	CG5887	0,31	desat1
141.	7-7,19	CG8326	0,32	
142.	7-8,13	CG10007	0,3	
143.	7-9,3	CG30359	0,34	
144.	7-9,17	CG2945	0,31	cin
145.	7-9,20	CG3690	0,28	
146.	7-9,21	CG6518	0,27	inaC
147.	7-9,24	CG9431	0,34	kek4
148.	7-10,6	CG2867	0,28	Prat
149.	7-11,4	CG8403	0,32	SP2353
150.	7-12,2	GH07425	0,31	
151.	7-12,6	CG18009	0,3	Trf2
152.	7-14,24	RE42506	0,01	
153.	7-15,1	CG7034	0,27	sec15
154.	7-19,10	CG33142	0,3	
155.	7-20,11	CG15202	0,31	
156.	7-21,10	CG7031	0,32	
157.	7-21,21	CG15678	0,3	
158.	7-21,23	SD16627	0,3	
159.	7-22,17	CG30110	0,35	
160.	8-1,3	CG9926	0,32	
161.	8-1,23	CG9553	0,01	chic
162.	8-2,22	CG11961	0,2	
163.	8-4,12	CG11459	0,33	
164.	8-4,24	CG32833	0,3	
165.	8-5,14	CG5442	0,3	SC35
166.	8-7,18	CG8981	0,25	
167.	8-7,23	CG5940	0,22	CycA
168.	8-9,2	CG6752	0,29	
169.	8-9,13	CG5974	0,34	pll
170.	8-11,1	CG14764	0,28	
171.	8-17,9	RH47344	0,32	
172.	8-17,14	CG9032	0,3	sun
173.	8-18,22	CG8971	0,28	fh
174.	8-19,11	CG5155	0,26	
175.	8-21,9	CG1332	0,28	
176.	8-22,11	CG2750	0,33	
177.	9-1,2	GM01267	0,31	
178.	9-1,9	CG17143	0,27	thoc7
179.	9-2,9	CG15611	0,28	
180.	9-2,21	CG4591	0,33	Tsp86D
181.	9-3,17	CG2061	0,27	
182.	9-4,11	CG3318	0,31	Dat
183.	9-6,21	CG7088	0,32	bnb
184.	9-7,2	CG10420	0,28	
185.	9-7,18	CG9723	0,27	
186.	9-7,22	CG7319	0,31	
187.	9-8,14	CG30059	0,33	
188.	9-9,18	CG1710	0,28	Hcf
189.	9-9,20	CG6145	0,29	
190.	9-9,24	CG15438	0,31	
191.	9-10,1	CG16728	0,22	
192.	9-11,13	CG2269	0,26	
193.	9-13,24	CG18088	0,31	
194.	9-14,13	CG5189	0,31	
195.	9-15,12	CG15807	0,3	Cyp313a5
196.	9-18,13	CG14151	0,3	
197.	9-18,18	CG12698	0,31	
198.	9-19,2	CG10484	0,2	Dox-A2
199.	9-19,11	AT16792	0,23	
200.	9-20,15	CG32100	0,33	
201.	9-20,18	CG11203	0,28	
202.	9-21,17	CG3382	0,31	Oatp58Db
203.	9-22,2	SD23414	0,22	
204.	9-22,4	CG5057	0,23	Nut2
205.	9-22,22	CG32601	0,35	
206.	9-22,24	CG31029	0,26	
207.	10-2,10	CG2247	0,32	
208.	10-5,11	CG6443	0,35	
209.	10-8,3	CG5632	0,34	thoc6
210.	10-8,5	CG10444	0,33	

Index	Label	Name	Rati	Symbol
211.	10-10,4	CG30115	0,32	
212.	10-10,8	CG33202	0,32	dpr11
213.	10-10,17	SD07763	0,31	
214.	10-14,22	RE54291	0,31	
215.	10-17,3	CG3525	0,35	eas
216.	10-19,20	CG5362	0,31	
217.	10-21,13	CG11926	0,33	
218.	11-1,10	CG3595	0,29	sqh
219.	11-1,12	CG7917	0,31	Nlp
220.	11-3,19	CG9634	0,32	
221.	11-7,21	CG6187	0,34	RluA-2
222.	11-9,6	CG18398	0,32	
223.	11-9,17	CG33116	0,31	
224.	11-9,20	CG6451	0,27	blue
225.	11-11,14	CG13830	0,25	
226.	11-11,15	CG11676	0,1	
227.	11-11,20	CG1815	0,34	
228.	11-18,9	CG17258	0,31	
229.	11-19,14	CG17387	0,33	
230.	11-21,4	CG14717	0,33	
231.	11-22,18	CG32148	0,34	
232.	11-22,23	CG5421	0,01	
233.	12-1,12	CG32418	0,29	
234.	12-4,4	CG3283	0,33	SdhB
235.	12-4,11	CG15084	0,33	
236.	12-4,20	CG4968	0,3	
237.	12-5,9	CG3756	0,32	
238.	12-7,17	CG6355	0,26	
239.	12-8,4	CG4649	0,35	Sodh-2
240.	12-8,10	CG31170	0,31	
241.	12-8,13	CG8193	0,23	
242.	12-9,22	CG6230	0,22	
243.	12-10,5	CG1848	0,28	LIMK1
244.	12-10,24	CG1965	0,2	
245.	12-13,18	CG12877	0,29	
246.	12-15,7	CG3351	0,34	mRpL11
247.	12-18,20	CG7196	0,25	
248.	12-18,24	CG32392	0,23	
249.	12-19,18	CG12860	0,26	
250.	12-20,2	CG11502	0,33	svp
251.	12-20,5	CG4409	0,3	
252.	12-20,17	CG7434	0,29	RpL22
253.	12-21,11	CG7213	0,29	
254.	12-21,14	SD12691	0,28	
255.	13-3,4	CG4616	0,25	
256.	13-3,20	CG5808	0,31	
257.	13-4,2	CG12182	0,27	
258.	13-4,3	CG2082	0,28	
259.	13-6,2	CG9575	0,35	Rab35
260.	13-8,20	CG3692	0,32	CalpC
261.	13-9,17	CG9347	0,3	ninaB
262.	13-9,19	CG8678	0,32	
263.	13-9,22	CG2736	0,31	
264.	13-9,23	CG6406	0,31	
265.	13-10,2	CG8006	0,28	
266.	13-10,4	CG6664	0,31	
267.	13-10,7	CG4162	0,3	lace
268.	13-13,20	CG11825	0,3	
269.	13-19,6	CG17216	0,31	KP78a
270.	14-1,6	CG9154	0,33	
271.	14-3,1	CG14786	0,31	
272.	14-5,12	CG10161	0,33	eIF-3p66
273.	14-5,23	CG9528	0,24	
274.	14-10,6	CG8135	0,24	
275.	14-11,2	CG7162	0,32	Trap220
276.	14-11,6	CG11526	0,19	
277.	14-11,8	CG7627	0,35	
278.	14-11,18	CG32811	0,31	
279.	14-18,20	CG17390	0,3	
280.	14-19,5	CG32598	0,29	
281.	14-19,15	CG10516	0,34	
282.	14-20,2	CG10743	0,26	
283.	15-2,2	CG3026	0,32	mus81

Index	Label	Name	Rati	Symbol
284.	15-3,17	CG7436	0,3	Nmt
285.	15-7,3	CG5201	0,34	Dad
286.	15-7,19	CG6398	0,34	
287.	15-9,17	CG7069	0,29	
288.	15-9,24	GH26828	0,29	
289.	15-10,1	CG8272	0,3	
290.	15-10,6	CG2260	0,32	
291.	15-19,9	CG9159	0,35	Kr-h2
292.	15-20,23	CG5945	0,35	
293.	16-1,9	CG11886	0,31	Slbp
294.	16-2,8	CG10648	0,3	
295.	16-2,9	CG3132	0,28	Ect3
296.	16-3,12	CG3421	0,32	RhoGAP93B
297.	16-5,9	CG8501	0,33	
298.	16-8,2	CG1635	0,33	
299.	16-8,10	CG3066	0,26	
300.	16-9,4	CG6205	0,3	por
301.	16-9,16	CG1105	0,24	
302.	16-11,3	CG4931	0,24	Sra-1
303.	16-12,2	CG30487	0,33	
304.	16-14,24	CG13643	0,23	
305.	16-18,13	CG32062	0,26	
306.	16-18,17	AT08987	0,28	
307.	16-18,18	AT08987	0,27	
308.	16-18,22	CG7335	0,24	
309.	16-19,8	CG17931	0,34	
310.	16-19,22	CG4073	0,31	
311.	16-20,14	CG33071	0,28	
312.	16-21,12	CG4624	0,3	
313.	16-22,10	CG17835	0,31	inv
314.	16-22,16	CG31407	0,24	
315.	17-2,12	CG17270	0,32	
316.	17-5,7	CG9196	0,35	
317.	17-7,4	CG4955	0,3	
318.	17-7,6	CG1317	0,32	
319.	17-7,17	CG3654	0,3	
320.	17-9,18	CG8399	0,3	
321.	17-9,19	CG12178	0,32	Nhe1
322.	17-9,22	CG10641	0,34	
323.	17-10,3	CG6611	0,33	ect
324.	17-11,5	CG7479	0,33	Aats-leu
325.	17-18,20	CG17669	0,34	
326.	17-21,4	CG5391	0,34	
327.	17-22,6	CG5524	0,28	
328.	18-1,10	CG11981	0,28	Prosbeta3
329.	18-1,19	CG11804	0,34	ced-6
330.	18-2,15	CG3488	0,34	
331.	18-4,2	CG2151	0,34	Trxr-1
332.	18-7,2	CG6815	0,29	bor
333.	18-8,2	CG2182	0,32	
334.	18-9,16	CG6322	0,34	
335.	18-10,18	CG7971	0,3	
336.	19-1,10	CG2249	0,3	
337.	19-2,16	CG1318	0,33	Hexo1
338.	19-9,22	CG32177	0,31	
339.	19-10,10	CG6603	0,33	Hsc70Cb
340.	19-11,14	CG32514	0,31	
341.	19-15,2	CG3532	0,23	
342.	19-16,9	RH06493	0,3	
343.	19-19,15	CG17146	0,34	Adk1
344.	19-20,19	CG10298	0,33	
345.	19-21,14	CG3219	0,34	Klp59C
346.	20-1,4	CG1518	0,34	
347.	20-2,16	CG4936	0,24	
348.	20-3,4	CG11897	0,27	
349.	20-3,20	CG2118	0,23	
350.	20-3,22	CG12708	0,26	
351.	20-5,8	CG7815	0,32	ran-like
352.	20-6,3	CG7874	0,33	
353.	20-6,14	CG32700	0,3	
354.	20-7,24	CG8351	0,24	
355.	20-8,24	CG4317	0,21	Mipp2
356.	20-9,1	CG8749	0,29	snRNP70K

Index	Label	Name	Rati	Symbol
357.	20-11,4	CG31340	0,34	
358.	20-11,13	CG11943	0,23	
359.	20-13,23	CG13345	0,2	RacGAP50C
360.	20-16,14	CG10365	0,25	
361.	20-18,20	AT11857	0,24	
362.	20-18,24	CG12692	0,25	
363.	20-19,20	CG1667	0,26	
364.	20-19,24	GH06380	0,25	
365.	20-20,7	CG1857	0,3	nec
366.	21-8,2	CG8705	0,34	pnut
367.	21-9,20	CG5196	0,33	
368.	21-16,20	CG7409	0,27	
369.	21-17,2	CG3997	0,26	RpL39
370.	21-20,13	CG9357	0,34	
371.	21-21,13	LP04022	0,24	
372.	22-8,12	CG6695	0,32	
373.	22-8,21	CG12428	0,17	
374.	22-9,19	CG8232	0,27	
375.	22-11,4	CG9045	0,33	Myb
376.	22-11,6	CG7161	0,33	Oseg1
377.	22-11,7	CG18214	0,33	trio
378.	23-2,18	CG12125	0,34	
379.	23-5,11	CG10916	0,33	
380.	23-9,22	CG7628	0,31	
381.	23-10,4	CG4203	0,35	
382.	23-10,6	CG14444	0,34	
383.	23-18,13	AT02159	0,33	
384.	23-18,23	CG3491	0,32	
385.	23-19,7	CG5062	0,32	
386.	23-21,5	CG4109	0,34	Syx8
387.	24-4,20	CG9483	0,34	
388.	24-5,20	CG9629	0,21	
389.	24-6,6	CG8725	0,3	CSN4
390.	24-7,5	CG12047	0,33	
391.	24-7,13	CG3508	0,33	
392.	24-8,21	CG4006	0,33	Akt1
393.	24-9,6	CG9007	0,33	
394.	24-9,18	CG12396	0,28	Nnp-1
395.	24-10,4	CG9155	0,3	Myo61F
396.	24-11,23	CG7094	0,25	
397.	24-15,8	RE63504	0,01	
398.	24-18,16	CG8487	0,34	garz
399.	24-18,23	CG11262	0,23	
400.	24-19,12	CG10748	0,31	
401.	24-19,16	CG15730	0,3	
402.	24-19,22	CG7363	0,31	
403.	24-21,10	CG30152	0,29	
404.	26-2,22	CG4984	0,35	
405.	28-1,6	CG11899	0,35	
406.	28-1,8	CG11007	0,35	
407.	28-8,15	CG5248	0,29	loco
408.	28-11,14	CG31738	0,3	
409.	28-19,16	CG4659	0,32	Srp54k
410.	28-19,24	GH06377	0,31	
411.	28-21,18	CG2168	0,34	RpS3A
412.	30-3,10	CG5640	0,05	
413.	30-20,11	CG40127	0,12	
414.	32-1,15	CG12189	0,34	Rev1
415.	32-1,19	CG11621	0,17	Pi3K68D
416.	32-18,11	CG7910	0,34	
417.	32-21,17	CG6353	0,32	
418.	34-5,20	CG3295	0,33	
419.	34-21,20	CG6547	0,29	mRpL37
420.	35-9,9	CG5119	0,23	pAbp
421.	35-16,8	CG13383	0,24	
422.	36-18,24	CG18675	0,31	
423.	39-10,3	CG17746	0,35	
424.	40-1,24	CG8809	0,32	Camta
425.	40-6,20	CG3772	0,04	cry
426.	40-6,24	GH18009	0,34	
427.	40-10,13	CG8250	0,32	Alk
428.	40-11,2	CG7837	0,33	
429.	40-16,23	CG10654	0,34	

Index	Label	Name	Rati	Symbol
430.	40-22,11	CG5388	0,27	
431.	43-4,24	CG13890	0,01	
432.	43-11,5	CG11181	0,22	cup
433.	45-17,2	RH26620	0,15	
434.	46-1,10	CG9273	0,01	
435.	47-12,2	SD10530	0,12	

Danksagung

Hiermit bedanke ich mich bei Hr. Prof. Dr. Michael Gewecke dafür, dass er mich als Doktorand in seine Arbeitsgruppe aufgenommen und mir das Vertrauen geschenkt hat, diese Arbeit zu beginnen. Ich danke ihm für seine immer freundliche und zuvorkommende Art mich in meiner Arbeit zu bestärken und mir Mut zu machen weiterzumachen, um diese Arbeit zu Ende zu bringen. Für das Interesse das er mir und meiner Arbeit entgegengebracht hat und dafür, dass er mich bis zum Schluss betreut hat. Danke Hr. Gewecke.

Dann möchte ich mich bei Prof. Dr. Thomas Röder bedanken, für seine Idee, die mit dieser Arbeit verwirklicht wurde, seine freundliche Art, mich mit meiner Arbeit voranzubringen, seine Geduld, auch manche Schwierigkeit zu meistern, seine praktische Art vermeintliche und tatsächliche Probleme zu lösen und letztlich für seine mehr als großzügige Unterstützung, durch die ich diese Arbeit erst vollenden konnte. Danke Thomas!

Dann möchte ich mich natürlich bei meiner Frau Beate Kampmann und meinen Kindern Max und Paula bedanken, für die Zuneigung und Liebe, die sie mir gegeben haben. Nur durch den Rückhalt, den sie mir gegeben haben, hatte ich die Kraft diesen Weg zu gehen. Danke Beate.

Bedanken möchte ich mich auch bei meinen Kollegen (Dr.) Guido Schramm (von dem ich auch vieles lernen konnte) und Dr. Mark Seifert, die mich grade auf dem letzten Wegstück so hervorragend und vorbehaltlos unterstützt haben. Dazu gehört auch Torsten Fregin, der grade zum Schluss manchen guten Tipp hatte. Auch bei dem Rest der Arbeitsgruppe möchte ich mich bedanken für den großen Spaß den wir oft hatten und der einem die Arbeit immer leicht gemacht hat. Dörte Heyden möchte ich meinen besonderen Dank sagen, für ihre angenehme und humorvolle Art, mit den Gegebenheiten des Lebens und der Arbeit umzugehen und für die vielen netten Gespräche, die wir immer hatten und die mir oft geholfen haben weiterzumachen.

Meinem Vater Joachim Lammers danke ich für seinen Respekt und die Unterstützung mein Studium und diese Arbeit bis hierhin zu bringen. Danke Jo.

Allen anderen Freunden und Bekannten danke ich für das Interesse, mit dem sie meine Arbeit verfolgt haben und für die Abwechslung und den Spaß, den wir zusammen hatten und hoffentlich weiter haben werden.

Des weiteren danke ich Prof. Dr. Ian Meinertzhagen (Dalhousie University Halifax; Canada), für die Zurverfügungstellung der *Canada-12k-Drosophila Microarrays* und Dr. Stefan Scholten (Biozentrum Grindel, Universität Hamburg), für die Unterstützung beim Scannen und viele wertvolle Tipps zur Arbeit mit Microarrays, sowie dem Team Tropeninstitut (BNI-Hamburg) für Möglichkeit zum Scannen.

Genehmigt vom
Fachbereich Biologie der
Universität Hamburg
auf Antrag von Professor Dr. M. GEWECKE
Weiterer Gutachter der Dissertation:
Professor Dr. T. ROEDER
Tag der Disputation: 22. April 2005

Hamburg, den 08. April 2005



Professor Dr. Arno Frühwald
Dekan