

IDENTIFIZIERUNG VON BIFURKATIONSPUNKTEN DER  
ZELLULÄREN REPROGRAMMIERUNG UND REVERSE  
ENGINEERING DES REGULATIONSNETZWERKES DER  
DIFFERENTIELLEN GENEXPRESSION

**Dissertation**

zur Erlangung des akademischen Grades

**doctor rerum naturalium  
(Dr. rer. nat.)**

genehmigt durch die Fakultät für Naturwissenschaften  
der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg

von Dipl.-Ing. Pauline Marquardt (geb. Walter)  
geb. am 31.12.1987 in Löbau

Gutachter: Prof. Dr. Wolfgang Marwan  
Universität Magdeburg, FNW / Institut für Biologie

Prof. Dr. Martin Grube  
Karl-Franzens-Universität Graz/Österreich, Inst. f. Biologie/Pflanzenwissenschaften

eingereicht am: 18.12.2017

verteidigt am: 29.11.2018

Dipl.-Ing. Pauline Marquardt: *Identifizierung von Bifurkationspunkten der zellulären Reprogrammierung und reverse Engineering des Regulationsnetzwerkes der differentiellen Genexpression*

„Die Fragen eines Kindes sind schwerer zu beantworten als die  
Fragen eines Wissenschaftlers.“

— Alice Miller (\*1923)

Gewidmet meiner süßen Tochter Liliana.



---

## ABSTRACT

---

### IDENTIFICATION OF BIFURCATION POINTS IN CELLULAR REPROGRAMMING AND REVERSE ENGINEERING OF THE REGULATORY NETWORK FOR DIFFERENTIAL GENE EXPRESSION

Dipl.-Ing. Pauline Marquardt

Cellular differentiation during sporulation of the lower eukaryote *Physarum polycephalum* (Amoebozoa) was investigated at the level of differential gene expression. During its life cycle this organism develops into a giant multinucleate cell, the so called plasmodium. All nuclei in this plasmodium behave synchronously concerning their state of cell cycle and transcription. This allows time series measurements of gene expression at the level of a single cell. By taking macroscopic samples from these plasmodia without disturbing their way to commitment and differentiation the gene expression levels of 35 sporulation relevant genes was analyzed at different time points during the sporulation process with the multiplex RT-PCR eXpress profiling method.

Analyzing the time dependent changes in gene expression in *Physarum polycephalum* sporulation mutants revealed significant differences to wild type plasmodia. Individually different and stable states of gene expression in differentiating plasmodia could be identified by statistical data analysis. To study the co-regulation of genes an algorithm was implemented to assign the analyzed genes to jointly regulated groups. Based on the co-regulation the regulatory network was reconstructed and modeled as a Petri net.

Different *Physarum polycephalum* sporulation mutants were fused with each other to search for somatic complementation effects. The gene expression levels in both halves of a fused plasmodium were analyzed separately and compared with the expression data of unfused plasmodia. We observed partial recovery of the wild type phenotype in fused plasmodia via effects of complementation. Based on the experimental data the hierarchy of certain differentiation specific blocks in the sporulation cascade has been analyzed and a model for regulation cascades in fused palasmodia was derived.

The alternative ways of differentiation in individual *Physarum polycephalum* plasmodial cells during the sporulation process have been identified. These findings clearly support the theory of a Waddington-type epigenetic landscape of gene regulation during commitment, cellular reprogramming and differentiation.



---

## ZUSAMMENFASSUNG

---

### IDENTIFIZIERUNG VON BIFURKATIONSPUNKTEN DER ZELLULÄREN REPROGRAMMIERUNG UND REVERSE ENGINEERING DES REGULATIONSNETZWERKES DER DIFFERENTIELLEN GENEXPRESSION

Dipl.-Ing. Pauline Marquardt

Die zelluläre Differenzierung wurde am Beispiel der lichtinduzierten Sporulation des niederen Eukaryonten *Physarum polycephalum* (*Amoebozoa*) untersucht. Dieser Organismus entwickelt sich im Laufe seines Entwicklungszyklus zu vielkernigen Riesenzellen, den so genannten Plasmodien. Alle Zellkerne eines Plasmodiums verhalten sich in Hinblick auf ihren Teilungs- und Transkriptionsstatus synchron, was Genexpressionsanalysen auf Einzelzellebene ermöglicht. Durch die Möglichkeit, Zellmaterial von diesen Plasmodien ohne Beeinflussung des Differenzierungsvorganges entnehmen zu können, können die Expressionsniveaus von 35 sporulationsrelevanten Genen zu unterschiedlichen Zeitpunkten des Differenzierungsvorganges untersucht werden. Die Genexpressionsanalysen erfolgten mithilfe einer Multiplex RT-PCR-Methode, dem eXpress-Profiling Verfahren.

Sporulationsmutanten von *Physarum polycephalum* wurden im Hinblick auf die zeitabhängigen Änderungen der Genexpressionsniveaus und ihr Sporulationsverhalten vergleichend analysiert und signifikante Unterschiede zu den Expressionsdaten von Wildtyp-Plasmodien gefunden. Mithilfe biostatistischer Methoden wurden Effekte in den Expressionsdaten nachgewiesen, die auf die Existenz spezifischer und stabiler Differenzierungsstadien schließen lassen. Zur Rekonstruktion des Sporulationsnetzwerkes wurde ein Algorithmus implementiert, der die analysierten Gene in Gruppen unterteilt, die einer gemeinsamen Regulation unterliegen. Auf der Grundlage dieser Clusterdaten konnten Teile des Regulationsnetzwerkes als Petri-Netz rekonstruiert und modelliert werden.

Durch Fusion von Plasmodien unterschiedlicher Mutanten zu beliebigen Zeitpunkten wurden Versuche zur somatischen Komplementation durchgeführt. Es wurde untersucht, inwiefern der Wildtyp-Phänotyp in den erzeugten heterokaryonten Fusionszellen durch Komplementationseffekte wiederhergestellt werden kann. Dazu wurden die Transkriptmengen beider Hälften des Fusionsplasmodiums getrennt analysiert und mit den unfusionierten Plasmodien verglichen. Die Analysen lieferten Rückschlüsse auf die Hierarchie von Regulationsblöcken innerhalb der Signalkaskade und ermöglichten ein Modell der differentiellen Genregulation in den Fusionsplasmodien.

Mithilfe der Ergebnisse dieser Arbeit wurden alternative Differenzierungspfade in der Sporulation von *Physarum polycephalum* identifiziert, die für die Existenz einer Waddington Quasipotentiallandschaft der regulatorischen Kontrolle sprechen.





---

## EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG

---

Hiermit erkläre ich, dass ich die von mir eingereichte Dissertation zum Thema:

*Identifizierung von Bifurkationspunkten der zellulären  
Reprogrammierung und reverse Engineering  
des Regulationsnetzwerkes der differentiellen Genexpression*

selbstständig verfasst habe. Diese Dissertation wurde von mir zuvor noch nicht verwendet. Alle Hilfsmittel und Quellen wurden vollständig angegeben.

Weiterhin erkläre ich, dass ich weder diese noch eine andere Arbeit zur Erlangung des akademischen Grades *doctor rerum naturalium* (*Dr. rer. nat.*) an anderen Einrichtungen eingereicht habe.

*Magdeburg, 18. Dezember 2017*

---

Dipl.-Ing. Pauline Marquardt



---

## VERÖFFENTLICHUNGEN

---

- Marquardt, Pauline, Britta Werthmann, Viktoria Rätzel, Markus Haas und Wolfgang Marwan (Juli 2017). „Quantifying 35 transcripts in a single tube: Model-based calibration of the GeXP RT-PCR assay“. In: *bioRxiv (Preprint)*.
- Walter, Pauline (2012). „Quantifizierung der Transkriptmengen licht-regulierter Gene in Sporulations-defizienten Mutanten von *Physarum polycephalum*“. Diplomarbeit. Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg.
- Walter, Pauline, Xenia-Katharina Hoffmann, Britta Ebeling, Markus Haas und Wolfgang Marwan (2013). „Switch-like reprogramming of gene expression after fusion of multinucleate plasmodial cells of two *Physarum polycephalum* sporulation mutants“. In: *Biochemical and Biophysical Research Communications* 435, S. 88–93.



*„Gebt mir einen Hebel, der lang genug,  
und einen Angelpunkt, der stark genug ist,  
dann kann ich die Welt mit einer Hand bewegen.“*

— Archimedes (287 v. Chr. - 212 v. Chr.)

---

## DANKSAGUNGEN

---

Bedanken möchte ich mich ganz besonders herzlich bei...

- ... Herrn Professor Wolfgang Marwan für die persönliche Betreuung meiner Promotion und die wertvollen Ratschläge bei allen Fragen und Problemen.
- ... Herrn Dr. Markus Haas und Frau Dr. Anke Jungebloud für die zahlreich gegebenen Denkanstöße in Theorie und Praxis, die moralische Unterstützung und die schöne gemeinsame Zeit.
- ... Frau Bärbel Lorenz für ihr Engagement in der Medienküche und ihre kompetente Unterstützung in allen Fragen rund um die Zellkultivierung.
- ... allen ehemaligen und aktuellen Mitarbeitern des Lehrstuhls für Regulationsbiologie für die tolle Arbeitsatmosphäre und die vielen erinnerungswürdigen Betriebsausflüge, Weihnachtsfeiern und die mittwöchlichen Kaffeepausen.
- ... Frau Christina Stöhr und Frau Kerstin Reckrühm für ihre Hilfe bei der statistischen Auswertung.
- ... meiner Familie, besonders meinem Mann Fabian Marquardt und meiner Tochter Liliana für ihr Verständnis und ihre Geduld.



---

# INHALTSVERZEICHNIS

---

ZUSAMMENFASSUNG	vii
<b>I EINFÜHRUNG</b>	<b>1</b>
1 EINLEITUNG	3
1.1 Physarum polycephalum . . . . .	4
1.1.1 Phylogenetische Einordnung . . . . .	4
1.1.2 Entwicklungszyklus . . . . .	5
1.1.3 Modellorganismus . . . . .	6
1.1.4 Sporulation . . . . .	8
1.1.5 Zellfusion . . . . .	10
1.2 eXpress-Profiling-Verfahren . . . . .	11
1.2.1 RT-PCR-Reaktion . . . . .	12
1.2.2 Fragmentquantifizierung . . . . .	14
1.3 Waddington Modell der epigenetischen Landschaften	17
<b>II DIE ARBEIT</b>	<b>21</b>
2 ERGEBNISSE	23
2.1 Phänotypische Charakterisierung von Mutantenstämmen . . . . .	24
2.1.1 Sporulationsverhalten . . . . .	24
2.2 Genexpressionsanalysen in Zeitreihenexperimenten . . . . .	25
2.2.1 Versuchsaufbau für Zeitreihenexperimente . . . . .	26
2.2.2 Hauptkomponentenanalyse . . . . .	28
2.2.3 Signifikanzanalyse . . . . .	33
2.2.4 Vergleich mit Wildtyp-Plasmodien . . . . .	42
2.3 Fusionsanalysen an Sporulationsmutanten . . . . .	46
2.3.1 Probenahme für Fusionsanalysen . . . . .	47
2.3.2 Hauptkomponentenanalyse . . . . .	48
2.3.3 Expressionszustände in Fusionsplasmodien . . . . .	50
2.3.4 Komplementationsanalyse . . . . .	59
2.4 Clustering von Genexpressionsdaten . . . . .	68
2.4.1 Arbeitsweise und Implementierung des Algorithmus . . . . .	68
2.4.2 Clusteranalyse für Mutantenstämme . . . . .	73
2.4.3 Netzwerkrekonstruktion . . . . .	93
2.4.4 Validierung des Clusteralgorithmus . . . . .	97
2.5 Validierung des eXpress-Profiling Kitsystems . . . . .	99
2.5.1 Experimentelle Systemoptimierung . . . . .	100
2.5.2 Validierung des Modellsystems . . . . .	103
2.5.3 Überprüfung des Quantifizierungsalgorithmus	104
2.5.4 Korrelation zwischen Primer- und Fragmentmenge . . . . .	108

3	DISKUSSION	113
3.1	Das Differenzierungsverhalten der Sporulationsmutanten . . . . .	113
3.1.1	Die Mutante N26B5 ist vermindert zur Sporulation fähig . . . . .	113
3.1.2	Die Mutante N11D4 ist nicht zur Sporulation fähig . . . . .	114
3.2	Die zelluläre Differenzierung verläuft hoch spezifisch in Einzelzellen . . . . .	115
3.3	Identifikation von sporulationsrelevanten Genen . . .	116
3.3.1	Zeitverläufe der Genexpression an Sporulationsmutanten . . . . .	116
3.3.2	Unterschiede der Genexpressionsmuster zum Wildtyp . . . . .	117
3.4	Fusionsanalysen an Sporulationsmutanten . . . . .	118
3.4.1	Analyse auf Komplementationeffekte . . . . .	119
3.5	Entwicklung eines Algorithmus zur Datenauswertung	122
3.5.1	Theoretische Ansätze . . . . .	122
3.5.2	Spezifische Genregulationsprogramme können nachgewiesen werden . . . . .	123
3.6	Validierung des eXpress-Profilings-Systems . . . . .	124
3.6.1	Experimentelle Optimierung . . . . .	124
3.6.2	Mathematische Modellierung des Systems . .	125
4	AUSBLICK	127
5	MATERIAL UND METHODEN	129
5.1	Chemikalien . . . . .	129
5.2	Geräte . . . . .	131
5.3	Verbrauchsmaterialien . . . . .	132
5.4	Enzyme . . . . .	133
5.5	Stämme . . . . .	133
5.6	Primer . . . . .	134
5.7	Medien . . . . .	139
5.7.1	Hemin-Lösung . . . . .	139
5.7.2	Sporulations-Agar . . . . .	139
5.7.3	Sporulationsmedium . . . . .	141
5.7.4	Wachstumsmedium für Mikroplasmodien . .	142
5.8	Kultivierung von Physarum polycephalum . . . . .	143
5.8.1	Kultivierung im Fermenter . . . . .	143
5.8.2	Plattieren der Mikroplasmodien . . . . .	145
5.9	Probenahme für Genexpressionsanalysen . . . . .	145
5.10	RNA-Isolierung . . . . .	147
5.11	Konzentrationsbestimmung der RNA . . . . .	148
5.12	DNase-Verdau und Aufreinigung . . . . .	148
5.13	Agarose-Gelelektrophorese . . . . .	148
5.14	Genexpressionsanalysen . . . . .	149
5.14.1	Reverse-Transkriptase-Reaktion . . . . .	150



5.14.2	Polymerase-Kettenreaktion . . . . .	152
5.14.3	Standardkurve . . . . .	154
5.14.4	Kapillarelektrophorese . . . . .	154
5.14.5	Quantifizierung der Transkriptmengen . . . . .	155
5.14.6	DNA-Größenstandard . . . . .	158
5.15	Statistische Auswertung . . . . .	161
5.15.1	Mann-Whitney-U-Test . . . . .	161
5.15.2	Wilcoxon-Vorzeichen-Rangtest . . . . .	162
5.15.3	Hauptkomponentenanalyse . . . . .	162
5.16	Clusteranalyse . . . . .	163
5.17	Petri-Netze . . . . .	164
<b>III</b>	<b>APPENDIX</b>	169
<b>A</b>	<b>ANHANG</b>	171
	<b>LITERATUR</b>	179

---

## ABBILDUNGSVERZEICHNIS

---

Abbildung 1.1	<i>Physarum polycephalum</i> – Entwicklungszyklus . . . . .	6
Abbildung 1.2	<i>Physarum polycephalum</i> – Vergleich Entwicklungszyklen . . . . .	8
Abbildung 1.3	Sensorische Regulation der Sporulation . . . . .	9
Abbildung 1.4	Zeitverlauf der Sporulation . . . . .	9
Abbildung 1.5	Fusion in <i>Physarum polycephalum</i> . . . . .	11
Abbildung 1.6	eXpress-Profilng – RT-PCR-Reaktion . . . . .	13
Abbildung 1.7	eXpress-Profilng – PCR-Reaktion . . . . .	14
Abbildung 1.8	Elektropherogramm . . . . .	15
Abbildung 1.9	eXpress-Profilng RT – Kapillarelektrophorese . . . . .	16
Abbildung 1.10	Epigenetische Landschaften nach Waddington . . . . .	17
Abbildung 2.1	Probenahme für Zeitreihen . . . . .	28
Abbildung 2.2	PCA für Mutante N26B5 . . . . .	30
Abbildung 2.3	PCA für Mutante N11D4 . . . . .	31
Abbildung 2.4	PCA –Trajektorienvergleich für Mutante N26B5 . . . . .	32
Abbildung 2.5	PCA – Trajektorienvergleich für Mutante N11D4 . . . . .	33
Abbildung 2.6	Durchführung Signifikanztests . . . . .	35
Abbildung 2.7	Wilcoxon-Vorzeichen-Rangtest für N26B5 . . . . .	38
Abbildung 2.8	Wilcoxon-Vorzeichen-Rangtest für N11D4 . . . . .	41
Abbildung 2.9	Mann-Whitney-U-Test – Vergleich N26B5 und WT . . . . .	43
Abbildung 2.10	Mann-Whitney-U-Test – Vergleich N11D4 und WT . . . . .	45
Abbildung 2.11	Probenahme für Fusionsanalysen . . . . .	48
Abbildung 2.12	PCA für Fusionsplasmodien . . . . .	49
Abbildung 2.13	Genexpressionsverhalten in Fusionsplasmodien . . . . .	51
Abbildung 2.14	Expressionszustände in Fusionsplasmodien 1-6, Teilversuch 1 . . . . .	53
Abbildung 2.15	Expressionszustände in Fusionsplasmodien 7-12, Teilversuch 1 . . . . .	54
Abbildung 2.16	Expressionszustände in Fusionsplasmodien 13-15, Teilversuch 1 . . . . .	55
Abbildung 2.17	Expressionszustände in Fusionsplasmodien 1-6, Teilversuch 2 . . . . .	56
Abbildung 2.18	Expressionszustände in Fusionsplasmodien 7-12, Teilversuch 2 . . . . .	57
Abbildung 2.19	Expressionszustände in Fusionsplasmodien 13-15, Teilversuch 2 . . . . .	58
Abbildung 2.20	Zeitaufgelöste somatische Komplementation . . . . .	60
Abbildung 2.21	Komplementationseffekte A . . . . .	63
Abbildung 2.22	Komplementationseffekte B . . . . .	64

Abbildung 2.23	Netzwerkstruktur Analysemethoden . . . . .	66
Abbildung 2.24	Schema Netzwerkstruktur . . . . .	67
Abbildung 2.25	Programmablauf Clusteralgorithmus . . . . .	72
Abbildung 2.26	Kreisplot für N26B5 spo <sup>+</sup> , DK – 4 h . . . . .	78
Abbildung 2.27	Kreisplot für N26B5 spo <sup>+</sup> , 4 h – 8 h . . . . .	79
Abbildung 2.28	Kreisplot für N26B5 spo – . . . . .	83
Abbildung 2.29	Kreisplot für N26B5 DK . . . . .	85
Abbildung 2.30	Kreisplot für N11D4 belichtet . . . . .	86
Abbildung 2.31	Kreisplot für N11D4 DK . . . . .	92
Abbildung 2.32	Petri-Netz für N26B5 sporuliert . . . . .	95
Abbildung 2.33	Petri-Netz für N26B5 sporuliert . . . . .	96
Abbildung 2.34	Testschema Zugabemethode Taq-Polymerase .	101
Abbildung 2.35	Effizienz Taq-Polymerase . . . . .	101
Abbildung 2.36	RNase Inhibitor-Konzentrationen . . . . .	102
Abbildung 2.37	Peakquantifizierung – experimentelles Setup .	105
Abbildung 2.38	Peakquantifizierungstest – Ergebnisse . . . . .	107
Abbildung 2.39	Versuchsablauf Primerverdünnung . . . . .	109
Abbildung 2.40	Primerverdünnung – Ergebnisse . . . . .	110
Abbildung 2.41	Fitting der Modellgleichung . . . . .	111
Abbildung 3.1	Gendosiseffektkurve . . . . .	121
Abbildung 5.1	Probenahme an <i>Physarum polycephalum</i> Plasmo- dien . . . . .	146
Abbildung 5.2	eXpress-Profilng . . . . .	149
Abbildung 5.3	eXpress-Profilng – Datenverarbeitung . . . . .	157
Abbildung 5.4	Petri-Netz-Formalismus . . . . .	167
Abbildung A.1	Trajektorien im PCA-Plot – N26B5 induziert .	175
Abbildung A.2	Trajektorien im PCA-Plot – N11D4 uninduziert	176
Abbildung A.3	Trajektorien im PCA-Plot – N11D4 induziert .	177
Abbildung A.4	Trajektorien im PCA-Plot – N26B5 uninduziert	178

---

## TABELLENVERZEICHNIS

---

Tabelle 1.1	<i>Physarum polycephalum</i> – Phylogenetische Einordnung . . . . .	4
Tabelle 2.1	Sporulationsverhältnisse . . . . .	25
Tabelle 2.2	Isolierte Proben für Zeitserien . . . . .	26
Tabelle 2.3	Isolierte Proben für Fusionsanalysen . . . . .	46
Tabelle 2.4	Parameter für Clusteranalysen . . . . .	73
Tabelle 2.5	Clusterdaten N26B5 spo <sup>+</sup> , DK – 4 h nach FR .	75
Tabelle 2.6	Clusterdaten N26B5 spo <sup>+</sup> , 4 h – 8 h nach FR .	77
Tabelle 2.7	Clusterdaten N26B5 spo <sup>-</sup> , DK – 4 h nach FR .	81
Tabelle 2.8	Clusterdaten N26B5 spo <sup>-</sup> , 4 h – 8 h nach FR .	82
Tabelle 2.9	Clusterdaten N26B5 Dunkelkontrolle . . . . .	84
Tabelle 2.10	Clusterdaten N11D4 belichtet . . . . .	87
Tabelle 2.11	Clusterdaten N11D4 Dunkelkontrolle, Teil A .	89
Tabelle 2.12	Clusterdaten N11D4 Dunkelkontrolle, Teil B .	90
Tabelle 2.13	Clusterdaten N11D4 Dunkelkontrolle, Teil C .	91
Tabelle 2.14	Peakquantifizierung – Geradensteigungen . . .	106
Tabelle 2.15	Modellierungsparameter . . . . .	111
Tabelle 5.1	Chemikalien . . . . .	129
Tabelle 5.2	Geräte . . . . .	131
Tabelle 5.3	Verbrauchsmaterialien . . . . .	132
Tabelle 5.4	Enzyme . . . . .	133
Tabelle 5.5	<i>Physarum polycephalum</i> -Stämme . . . . .	133
Tabelle 5.6	Primer . . . . .	134
Tabelle 5.7	Hemin-Lösung . . . . .	139
Tabelle 5.8	Sporulations-Agar . . . . .	139
Tabelle 5.9	Sporulationsagar – Lösung 2 . . . . .	139
Tabelle 5.10	Sporulationsagar – Lösung 3 . . . . .	140
Tabelle 5.11	Sporulationsagar – Lösung 1 . . . . .	140
Tabelle 5.12	Sporulationsagar – Salz-Stock-Lösung . . . . .	140
Tabelle 5.13	Sporulationsagar – Kupferchlorid-Lösung . . .	141
Tabelle 5.14	Sporulationsagar – Kaliumdihydrogenphosphat-Lösung . . . . .	141
Tabelle 5.15	Sporulationsmedium . . . . .	141
Tabelle 5.16	Sporulationsmedium – Chlorid-Stammlösung	141
Tabelle 5.17	Sporulationsmedium – Sulfat-Stammlösung . .	142
Tabelle 5.18	Wachstumsmedium für Mikroplasmidien . . .	142
Tabelle 5.19	Wachstumsmedium – MMZ-Lösung . . . . .	143
Tabelle 5.20	Animpfvolumina für Schüttelkolben . . . . .	143
Tabelle 5.21	Animpfvolumina für Fermenter . . . . .	144
Tabelle 5.22	Reaktionsansatz RT-Reaktion . . . . .	150
Tabelle 5.23	Temperaturprofil RT-Reaktion . . . . .	151

Tabelle 5.24	5x RT-Puffer . . . . .	151
Tabelle 5.25	RT-PCR-Primer . . . . .	151
Tabelle 5.26	Reaktionsansatz PCR-Reaktion . . . . .	152
Tabelle 5.27	Universalprimer-Mix . . . . .	153
Tabelle 5.28	Temperaturprofil PCR-Reaktion . . . . .	153
Tabelle 5.29	Verdünnungsreihe Standardkurve . . . . .	154
Tabelle 5.30	Pipettierschema DNA-Größenstandard . . . . .	158
Tabelle 5.31	PCR Temperaturprofil – DNA-Größenstandard	159
Tabelle 5.32	Vorwärtsprimer DNA-Größenstandard . . . . .	160
Tabelle A.1	Analysierte Gene I . . . . .	172
Tabelle A.2	Analysierte Gene II . . . . .	173
Tabelle A.3	Analysierte Gene III . . . . .	174

---

## ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

---

A <sub>230</sub>	Absorption bei einer Wellenlänge von 230 nm
A <sub>260</sub>	Absorption bei einer Wellenlänge von 260 nm
A <sub>280</sub>	Absorption bei einer Wellenlänge von 280 nm
BMU	Best Matching Unit
BSA	Bovines Serumalbumin
cAMP	Cyklisches Adenosinmonophosphat
cDNA	Complementary DNA
CRISPR	Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DK	Dunkelkontrolle
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonucleinsäure
dNTP	Desoxiribonukleosidtriphosphat
DS	Datensatz
DSDM	Diluted Semidefined Medium
DSPB	Diluted Semidefined Phosphate Buffered Medium
DuKo	Dunkelkontrolle
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EAL	Epigenetische Attraktor-Landschaft
EL	Epigenetische Landschaften
ENU	N-ethyl-N-nitrosourea
FI	Fluoreszenzintensität
FW	Forward
FKB	Formalin Killed Bacteria
FR	Far Red Light

GDP	Guanosindiphosphat
GEDI	Gene Expression Dynamics Inspector
GeXP	Gene eXpression Profiling
GRN	Genregulatorische Netzwerke
GTP	Guanosintriphosphat
MA	Mittlere Steigung der Regressionsgeraden
mRNA	Messenger RNA
NPA	Normierte Peakflächen
nt	Nukleotide
NT	No Template
PA	Peakflächen
PCA	Principle Component Analysis
PCR	Polymerase Kettenreaktion
PNR	Point of No Return
rcf	Relative Centrifugal Force
rpm	Revolutions per Minute
rRNA	Ribosomale RNA
RNA	Ribonucleinsäure
RT	Reverse Transkription
RV	Reverse
SDM	Semidefined Medium
SLS	Sample Loading Solution
SOM	Self Organizing Maps
spo <sup>+</sup>	Sporulations-positiv
spo <sup>-</sup>	Sporulations-negativ
ssDNA	Single-Stranded DNA (Einzelstrang-DNA)
TBE	TRIS-Borate-EDTA
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
U	Unit

UV	Ultraviolett
V	Volumen
WM	Wachstumsmedium
WT	Wildtyp
⚡	Plasmodium wurde belichtet



Teil I

EINFÜHRUNG



---

## EINLEITUNG

---

Komplexe Organismen bestehen aus einer Vielzahl unterschiedlicher Arten von Zellen. So befinden sich im menschlichen Körper mehr als 200 verschiedene Zelltypen, welche sich aus ein und derselben Zelle entwickelt haben (Watson u. a., 2011). Diese Entwicklung genetisch identischer Zellen hin zu verschiedensten Zelltypen mit unterschiedlicher Funktion und Morphologie wird durch die selektive Aktivierung zelltypischer Gensätze während der Individualentwicklung ermöglicht und als Zelldifferenzierung bezeichnet.

Die zelluläre Differenzierung wird dabei durch Signale der extrazellulären Umgebung, wie zum Beispiel Umweltreize, Wachstumsfaktoren und Hormone oder dem Kontakt zu Nachbarzellen, vermittelt (Streuli, 1999). Durch die Aktivierung unterschiedlicher Transkriptionsfaktoren und die damit verbundene Transkription zellspezifischer Gene wird die Entwicklung zu spezifischen Zelltypen ermöglicht.

Die Analyse der komplexen Vorgänge die während eines Differenzierungsvorganges ablaufen, ist derzeit Schwerpunkt vieler Forschungsarbeiten. Durch die tiefgreifende Aufklärung der Regulationsnetzwerke, die die zelluläre Differenzierung steuern, kann eine mathematisch-berechenbare Beeinflussung des zugrundeliegenden Regulationsnetzwerkes ermöglicht werden. Diese Vorgehensweise könnte zum Beispiel die Aufklärung und Behandlung einer Vielzahl von Krankheiten vereinfachen, deren Ursache mit einer Fehlfunktion der Genexpression ursächlich im Zusammenhang steht (Huang, Ernberg und Kauffman, 2009). Sollte es gelingen, die Reaktionsnetzwerke, die einen solchen Differenzierungsprozess steuern, zu rekonstruieren, wird das die weitere Forschung auf dem Gebiet der Entwicklungsbiologie und Biomedizin stark vereinfachen.

Seit den 1970er Jahren wird der Myxomycet *Physarum polycephalum* in Zelldifferenzierungsstudien eingesetzt (Sauer, 1982) und (Sauer, Babcock und H. P. Rush, 1969). Wachstum und Differenzierung sind in *Physarum polycephalum*, im Gegensatz zu den Zellen vieler anderer Organismen, klar und eindeutig voneinander getrennt. Zudem kann der Differenzierungsvorgang der Sporulation unter experimentellen Bedingungen verhältnismäßig einfach induziert werden

(Sauer, Babcock und H. P. Rush, 1969). Aufgrund dieser Eigenschaften lassen sich die Regulationsvorgänge, welche die Sporulation kontrollieren, im Labor gezielt analysieren und lassen einen wertvollen Beitrag zu einem tieferen und besseren Verständnis zellulärer Signalkaskaden und den Mechanismen in der Regulation der Genexpression erhoffen.

## 1.1 PHYSARUM POLYCEPHALUM

### 1.1.1 Phylogenetische Einordnung

*Physarum polycephalum* ist ein prototypischer Eukaryont mit typisch eukaryontischem Zellzykluskontrollsystem, welcher sowohl phänotypische Ähnlichkeiten mit den Pilzen, als auch mit den Protozoen aufweist (Baldauf und Doolittle, 1997). Die phylogenetische Einordnung des Organismus erfolgt auf molekularer Ebene durch Ähnlichkeiten der Gensequenzen zu anderen Organismen. *Physarum* besitzt hinsichtlich seiner Proteinausstattung Ähnlichkeiten zu tierischen, pflanzlichen und pilzlichen Zellen und wird den Amoebozoen zugeordnet, genauer der Klasse der *Myxogastria*, der echten Schleimpilze (Schaap u. a., 2015). Die *Myxogastria* bilden neben den *Acrasiomycota*, den zellulären Schleimpilzen, wie zum Beispiel *Dictyostelium* und den *Protostelia*, die dritte Gruppe der Organismen, die unter den *Eukarya* zu den Schleimpilzen gezählt werden (Brandmaier, 2005).

Die phylogenetische Einordnung von *Physarum polycephalum* ist in Tabelle 1.1 aufgeführt (Sitte u. a., 1998, Aldrich und J. W. Daniel, 1982).

Tabelle 1.1: *Physarum polycephalum* – Phylogenetische Einordnung

Abteilung	Myxomycota
Klasse	Myxogastria
Unterklasse	Myxogastromycetidae
Ordnung	Physarales
Familie	Physaraceae
Gattung	Physarum
Art	<i>Physarum polycephalum</i>

### 1.1.2 Entwicklungszyklus

In seinem natürlichen Lebensraum, den Wäldern der Tropen und Subtropen, wachsen die Plasmodien von *Physarum polycephalum* als flächige Riesenzellen, die intensiv gelb gefärbt sind und ein netzförmiges Adergeflecht ausbilden (E. Guttes, S. Guttes und Rusch, 1961). Die Plasmodien leben vorwiegend auf modrigem Holz, wo sie sich von Bakterien und anderen Mikroorganismen ernähren (Brandmaier, 2005).

Der Entwicklungszyklus von *Physarum polycephalum* ist in zwei vegetative Phasen unterteilt, deren Zelltypen sich stark in Morphologie und Funktion unterscheiden. Die haploide Phase ist durch den Zelltyp der Amöbe gekennzeichnet. Zwei Amöben kompatiblen Paarungstypes sind in der Lage sich zu einer diploiden Zygote zu vereinigen. Diese Zygote wächst heran und vollführt eine Vielzahl an Kernteilungen, jedoch keine Zellteilungen mehr. Dadurch entwickelt sie sich zu einer vielkernigen Riesenzelle, dem sogenannten Plasmodium. Dieser Zelltyp ist kennzeichnend für die zweite, diploide vegetative Phase. Das Plasmodium besitzt unbegrenztes replikatives Potential und kann bei ausreichender Nahrungszufuhr zu annähernd unbegrenzter Größe heranwachsen (Burland u. a., 1993). Ein Plasmodium mit einem Durchmesser von 9 cm enthält circa  $10^7$ - $10^8$  Zellkerne, deren Zellzyklus über die ganze Zelle synchron verläuft (Hoffmann u. a., 2012). Diese Zellkerne werden mit Hilfe der Zytoplasmaströmung durch das stark verzweigte Adernetzwerk gepumpt und somit im ganzen Plasmodium verteilt. Herrscht Nahrungsmangel, so erreicht das Plasmodium einen Zustand, der als Sporulationskompetenz bezeichnet wird. Die Sporulation kann in einem kompetenten Plasmodium durch Belichtung, einen Hitzeschock oder andere Stimuli induziert werden (Sauer, Babcock und H. P. Rush, 1969), siehe Abbildung 1.3. Der Vorgang der Sporulation kann durch Zuführung von Nahrung umgekehrt werden, ohne dass morphogenetische Veränderungen sichtbar werden, so lange das Plasmodium den so genannten Point of No Return (PNR) nicht überschritten hat (Chapman und Coote, 1982). Andernfalls ist die das Voranschreiten der Sporulation nicht wieder umkehrbar, das unbegrenzte replikative Potential geht verloren und das Zellplasma wird zu Fruchtkörpern (Sporangien) umgebildet. Durch Meiose entstehen erneut haploide Sporen, welche sich zu Amöben entwickeln können.

Der Entwicklungszyklus von *Physarum polycephalum* ist in Abb. 1.1 dargestellt.

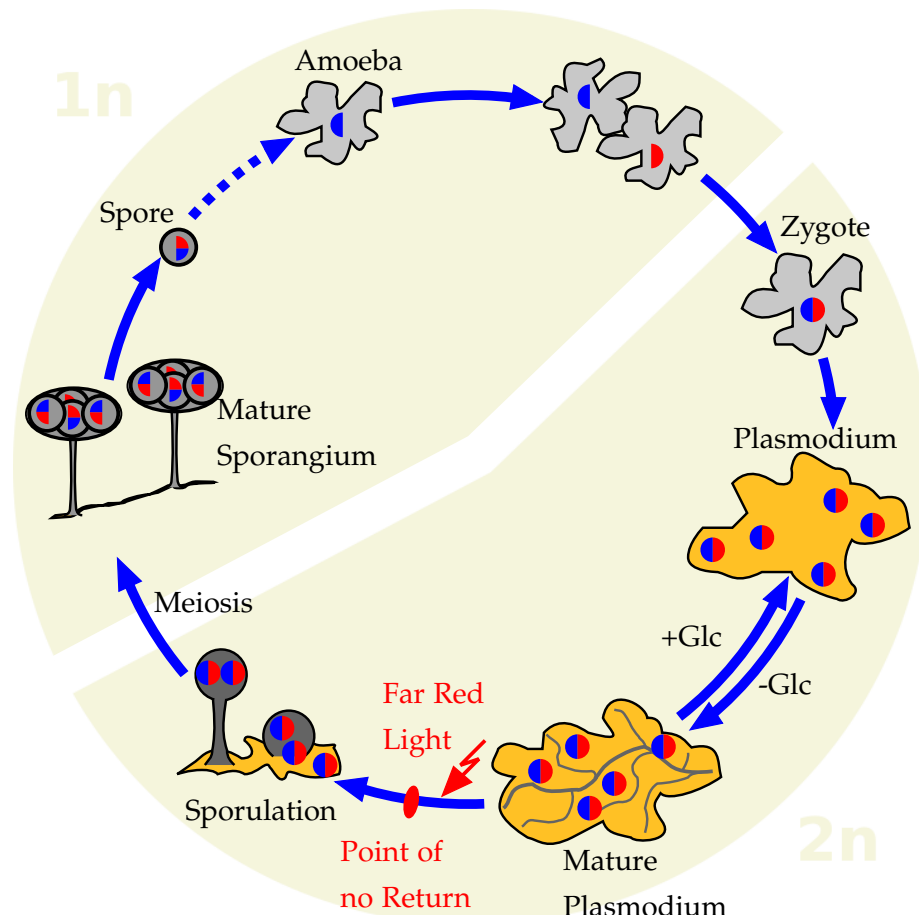


Abbildung 1.1: *Physarum polycephalum* – Entwicklungszyklus  
Markus Haas (unveröffentlicht), Erläuterungen im Text

### 1.1.3 *Physarum polycephalum* als Modellorganismus

Die Analyse von Differenzierungsprozessen in eukaryotischen Zellen ist von zentraler Bedeutung für das Verständnis von intrazellulären Signalkaskaden. Die Untersuchung dieser komplexen Prozesse wird dadurch erschwert, dass sich die Zellen vieler Organismen in unterschiedlichen Stadien von Wachstum und Differenzierung befinden (Sauer, Babcock und H. P. Rush, 1969).

Der Organismus *Physarum polycephalum* weist jedoch eine Vielzahl an Eigenschaften auf, die ihn für die Analyse von Zelldifferenzierungsprozessen prädestinieren. So sind Wachstum und Differenzierung in den Plasmodien eindeutig voneinander getrennt und die Zellkernpopulationen verhalten sich perfekt synchron in Bezug auf ihren Zellzyklus und Differenzierung (E. Guttus, S. Guttus und Rusch, 1961, H. P. Rush u. a., 1966). *Physarum polycephalum* kann als Plasmodium bei ausreichendem Nahrungsangebot zu annähernd unbegrenzter Größe heranwachsen (Burland u. a., 1993). Von einem solchen Makroplasmodium können makroskopische Proben für die Protein-

oder RNA-Analyse entnommen werden, ohne ablaufende Differenzierungsvorgänge zu stören (Marwan, Sujatha und Starostzik, 2005). Das spontane Fusionieren zweier Plasmodien desselben Fusionstyps bei Zellkontakt (Poulter und Dee, 1968) ermöglicht die Bildung eines Heterokaryons aus Zellen, die sich ursprünglich in ihrem Genotyp unterscheiden. Diese Fusionszelle kann genutzt werden, um Regulationseffekte zu analysieren, die durch somatische Komplementation entstanden sind (Marwan, 2003).

Die für diese Arbeit verwendeten Stämme von *Physarum polycephalum* tragen die temperatursensitive *gadAH*-Mutation (greater asexual differentiation) im *matA*-Locus (Starostzik und Marwan, 1998). Bei einer ausreichend hohen Dichte der Amöbenpopulation sind diese Zellen in der Lage, sich apogam zu multinukleären, haploiden Plasmodien zu entwickeln, ohne mit einer anderen Amöbe zu fusionieren (Wheals, 1970 und Roger W. Anderson und Truitt, 1983). Dieser Prozess wird als Selfing bezeichnet. Das Verhalten von haploiden und diploiden Plasmodien ähnelt sich in vielerlei Hinsicht. So kann die Sporulation ebenfalls in haploiden Plasmodien induziert werden, wobei es zur Bildung von entwicklungsfähigen Sporen kommt. Die meisten Sporen haploider Plasmodien sind jedoch steril, da sie eine meiotische Reifeteilung durchlaufen, die in Tochterzellen mit unvollständigem Genom resultiert. Lebensfähige Sporen entstehen hingegen aus dem geringen Prozentsatz von diploiden Zellkernen, die aufgrund von Endoreduplikation einen verdoppelten Satz identischer Chromosomen tragen (Laffler und Dove, 1977). Das haploide Wachstum von Plasmodien wird ab einer Temperatur von 30 °C inhibiert und die Amöben treten wieder in den diploiden Wachstumszyklus ein (R. W. Anderson u. a., 1989).

Eine Gegenüberstellung des diploiden und haploiden Entwicklungszyklus von *Physarum polycephalum* ist in Abb. 1.2 dargestellt. Die in dieser Arbeit verwendeten Stämme sind haploid.

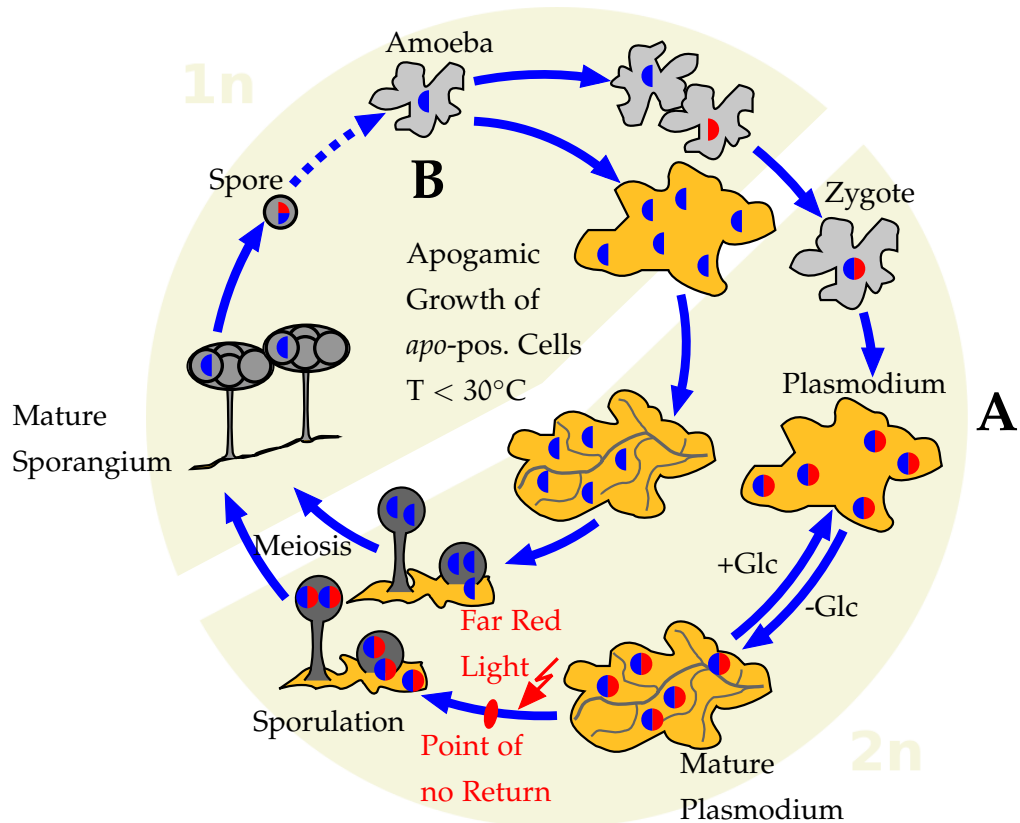


Abbildung 1.2: *Physarum polycephalum* – Vergleich der Entwicklungszyklen  
 A: Natürlicher Entwicklungszykluszyklus, B: Entwicklungszyklus im Labor  
 Markus Haas unveröffentlicht, Erläuterungen im Text

Die Sporulation in *Physarum polycephalum* kann experimentell mit geringem Aufwand durch Hungern der Plasmodien und anschließender Belichtung mit dunkelrotem Licht induziert werden (John W. Daniel und Harold P. Rush, 1961).

#### 1.1.4 Sporulation in *Physarum polycephalum*

Hungern Plasmodien für mindestens fünf Tage, so erreichen sie einen Zustand, der als Sporulationskompetenz bezeichnet wird (Golderer u. a., 2001). Die Sporulation kann anschließend über die Stimulation eines von drei Rezeptorsystemen in *Physarum polycephalum* induziert werden. Die sensorische Kontrolle erfolgt dabei über ein Hungersignal und einen Lichtimpuls oder Hitzeschock. *Physarum polycephalum* verfügt über zwei unterschiedliche Photorezeptoren, die ihn empfindlich für sichtbares Licht machen (Starostzik und Marwan, 1995b) und (Starostzik und Marwan, 1995a). Der erste dieser beiden Photorezeptoren ist empfindlich gegenüber Blaulicht, wobei der zweite Rotlicht detektiert. Wird einer der drei Rezeptortypen über einen ausreichend langen Zeitraum zusätzlich zum Hungersignal stimuliert, wird die Sporulation induziert (vgl. Abb. 1.3).



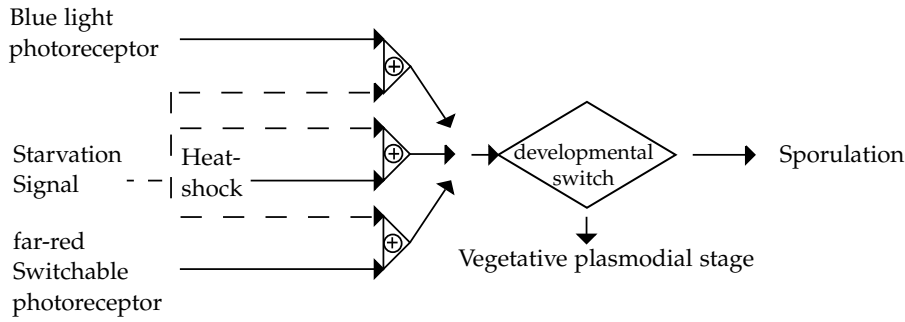


Abbildung 1.3: Sensorische Regulation der Sporulation in *Physarum polycephalum* nach Starostzik und Marwan, 1995b

Die sensorische Regulation der Sporulation erfolgt in *Physarum polycephalum* über drei verschiedene Rezeptortypen. Einen Photorezeptor für Blaulicht, einem Phytochrom-Photorezeptor und einem Hitzeschock-sensitiven Element. Wird einer der drei Rezeptortypen zusätzlich zu einem Hungersignal angeregt, so kann die Sporulation induziert werden.

Direkt nach der Belichtung treten die Plasmodien in die so genannte prämorphogenetische Phase ein, in der keine morphologischen Veränderungen sichtbar sind. Ungefähr sechs Stunden nach der Induktion der Sporulation überschreitet das Plasmodium den PNR und verliert sein unbegrenztes replikatives Potential. Ein Abstoppen des Sporulationsvorganges durch Zuführen von Nahrung ist an dieser Stelle nicht mehr möglich (Chapman und Coote, 1982). Die Morphogenese setzt etwa zehn Stunden nach der Belichtung ein. Das Plasmodium beginnt seine Zytoplasmavenen zu verdicken und knotenartige Strukturen zu bilden, die zu Sporangien heranwachsen. In diesen Sporangien entwickeln sich durch Meiose haploide Sporen (Marwan, 2003). Der zeitliche Verlauf der Sporulation ist in Abb. 1.4 dargestellt.

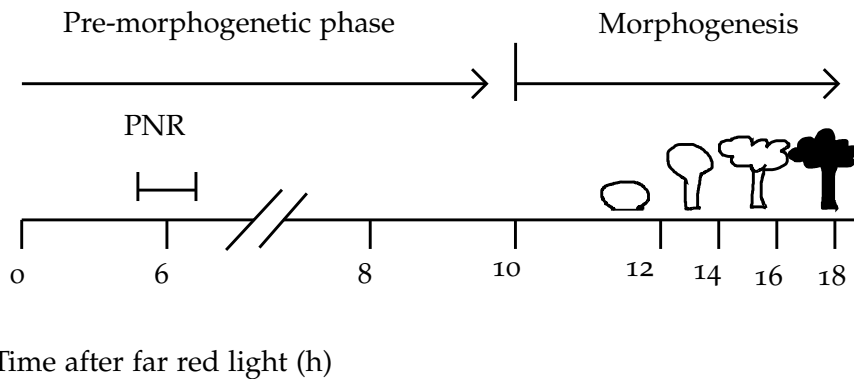


Abbildung 1.4: Zeitverlauf der Sporulation in *Physarum polycephalum* nach Starostzik und Marwan, 1995b

Die Sporulation in *Physarum polycephalum* ist ein dynamischer und hoch regulierter Prozess, der durch die Wechselwirkung einer Vielzahl von Genen und deren Genprodukten gekennzeichnet ist. Um diesen Prozess analysieren und rekonstruieren zu können, reicht es nicht aus die reine Genomsequenz des Organismus zu kennen, da daraus nicht ersichtlich wird, wie die einzelnen Gene und Proteine interagieren. Um zu verstehen, wie die Sporulation funktioniert wird und wie sie gesteuert wird, ist es erforderlich herauszufinden, wie die differentiell exprimierten Gene reguliert werden. Dazu wurden in dieser Arbeit die Transkriptmengen von 35 Genen in einer Genexpressionsanalyse mit dem Express-Profiling Verfahren gemessen und analysiert. Die erhaltenen Daten können nun genutzt werden, um das Genexpressionsverhalten der analysierten Stämme zu charakterisieren. Weiterhin tragen die hier gewonnenen Daten einen Teil dazu bei, das Regulationsnetzwerk der Sporulation in *Physarum polycephalum* in Zukunft rekonstruieren zu können.

#### 1.1.5 Fusion von *Physarum polycephalum* Plasmodien

Plasmodien sind in der Lage spontan zu fusionieren, wenn sie miteinander in physischen Kontakt treten. Dabei ist es jedoch essentiell, dass die Fusionspartner denselben Fusionstyp aufweisen. Die Plasmodien bauen an der Kontaktstelle eine Zytoplasmaverbindung auf. Über Diese Verbindung wird das gesamte Zytoplasma aus beiden Zellen, einschließlich der darin suspendierten Zellkerne, infolge der starken Zytoplasmaströmung vermischt und verteilt. Nach erfolgter Durchmischung der Zytoplasmen beider Fusionspartner synchronisieren sich die Zellkerne spontan hinsichtlich ihres Zellzyklus und der Genexpressionsmuster (H. P. Rush u. a., 1966, Walter u. a., 2013). Die so entstandene Fusionszelle verhält sich nach Abschluss des Fusionsvorganges wie eine homogen zusammengesetzte Riesenzelle. Die Kernmembranen der Zellkerne beider Zellkernpopulationen aus beiden Plasmodien bleiben jedoch während des Vorganges der Fusion erhalten.

Werden ein mit Licht stimuliertes Plasmodium und ein nicht-stimuliertes Plasmodium fusioniert, so wird die Entscheidung zur Sporulation des Fusionsplasmodiums eine Alles oder Nichts-Entscheidung sein und vom physiologischen Zustand der Fusionspartner abhängen (Lamparter und Marwan, 2001 und Starostzik und Marwan, 1995a). Werden zwei genetisch unterschiedliche Mutanten miteinander fusioniert, so kann es zu einer Komplementation der Gendefekte kommen. Der Komplementationseffekt beruht dann darauf, dass ein Fusionspartner das funktionsfähige, im anderen Partner defekte, Genprodukt beisteuert und umgekehrt. So können Blockaden im Genregulationsnetzwerk des Fusionsplasmodiums überwun-

den werden und der Differenzierungsvorgang dennoch in normaler Weise ablaufen. Trotz dieser Erkenntnis sind die Abläufe im Zellinneren, die zur Bereitschaft zur Differenzierung führen, noch unbekannt. Die Untersuchung der genregulatorischen Abläufe in einer Fusionszelle kann Aufschluss darüber geben, in welchem Maße sich der durch die Belichtung eines Fusionspartners initiierte Prozess über das Fusionsplasmodium ausbreitet und ob durch die Fusion Komplementationeffekte entstehen.

Der Ablauf eines solchen Fusionsexperimentes ist in Abb. 1.5 dargestellt.

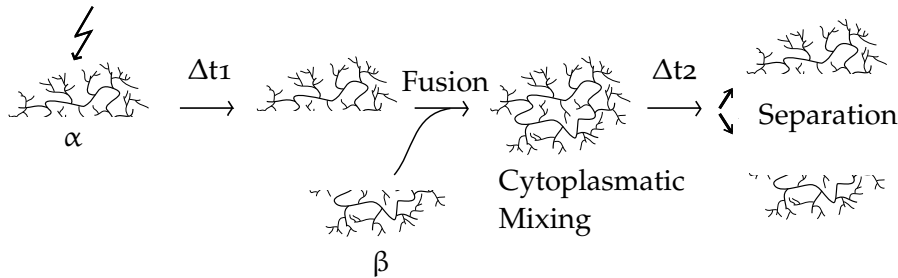


Abbildung 1.5: Fusionsexperiment in *Physarum polycephalum*, modifiziert nach Marwan, 2003

*Ein Plasmodium einer Sporulationsmutante von Physarum polycephalum (a) wird mit Rotlicht belichtet, um die Sporulation zu initiieren. Nach einem bestimmten Zeitintervall nach der Belichtung wird das induzierte Plasmodium in zwei Hälften geteilt und mit einem uninduzierten Plasmodium einer anderen Sporulationsmutante (b) fusioniert. Das so entstandene Fusionsplasmodium wird erneut nach einem definierten Zeitintervall in seine Ursprungshälften geteilt und die RNA beider Hälften separat analysiert.*

## 1.2 EXPRESS-PROFILING-VERFAHREN

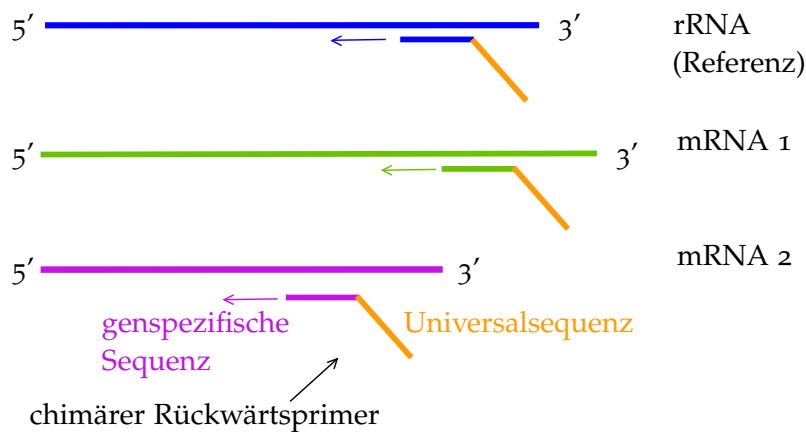
Das eXpress-Profiling ist ein Verfahren zur Durchführung von Multiplex-Genexpressionsanalysen und kommt zum Beispiel im von der Firma Beckman Coulter in Kooperation mit der Althea Technologies Inc. entwickelten GeXP-System zur Anwendung (Rothe u. a., 2005). Dieses System basiert auf einer RT-PCR-Reaktion mit anschließender Kapillarelektrophorese und ermöglicht es, bis zu 35 Fragmente simultan zu analysieren (Hayashi u. a., 2005).

### 1.2.1 RT-PCR-Reaktion

Um die Transkriptmengen der 35 Gene analysieren zu können, muss die isolierte RNA zuerst in einer Reverse Transkriptase-Reaktion in ssDNA umgeschrieben werden. Die RT-Reaktion läuft unter der Verwendung von chimären Rückwärtsprimern ab, die für jedes Gen in einer individuellen Konzentration vorliegen. Die optimalen Konzentrationen der chimären Primer wurden in Vorexperimenten ermittelt und gewährleisten, dass die zu analysierenden Gene in gleichen Mengen amplifiziert werden (Hoffmann u. a., 2012). Diese chimären Primer tragen eine Universalsequenz, die in den weiteren Reaktionsschritten noch von Bedeutung ist. Zusätzlich wird der Reaktion eine Referenz-RNA als interner Standard zugegeben. Diese Referenz ermöglicht es, alle Proben im Anschluss an die Quantifizierung durch Normierung auf den Referenz-Peak vergleichbar zu machen. Der Ablauf der RT-Reaktion ist in Abb. 1.6, A dargestellt.

Die in der RT-Reaktion synthetisierten ssDNA-Fragmente werden anschließend in einer PCR-Reaktion amplifiziert. Die ersten Zyklen der PCR laufen unter der Verwendung von genspezifischen, chimären Vorwärtsprimern ab (vgl. Abb. 1.6, B). Im Anschluss verläuft die Reaktion unter Verwendung von fluoreszenzmarkierten Universalprimern, die im Gegensatz zu den chimären Primern im Überfluss vorliegen. Diese Primer binden an einen Universal-Tag, der den chimären Vorwärts- und Rückwärtsprimern am 5'-Ende anhängt. Somit wird gewährleistet, dass die Fragmente mit gleichbleibender Effizienz amplifiziert werden und ihre relativen Mengen zueinander vor und nach der PCR-Reaktion gleich sind (vgl. Abbildung 1.7). Die Fluoreszenzmarkierung der Universalprimer ermöglicht die Detektion und Quantifizierung der Fragmente im Anschluss an die RT-PCR-Reaktion während der kapillarelektrophoretischen Auftrennung.

A) Reverse Transkription



B) ab PCR-Zyklus 1

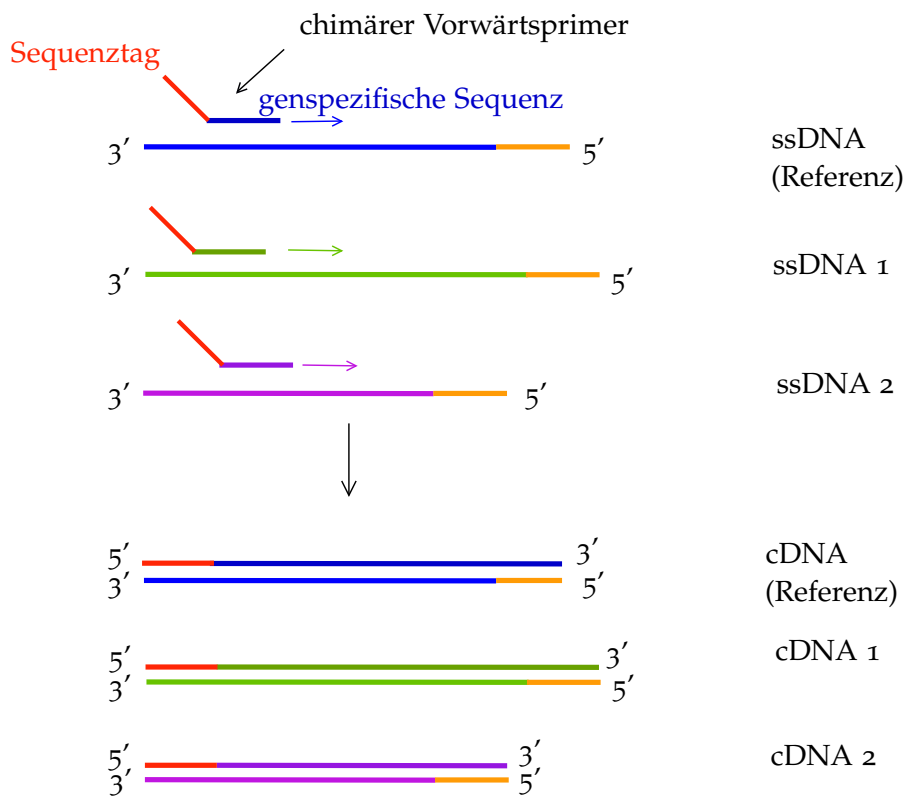


Abbildung 1.6: eXpress-Profilung: RT-PCR-Reaktion, modifiziert nach Rothe u. a., 2005

A) Die zu analysierende RNA ( $mRNA_1$  und  $mRNA_2$ ) wird unter Verwendung von chimären Rückwärtsprimern mit angehängtem Universal-Tag in ssDNA-Fragmente umgeschrieben. Als interner Standard wird zusätzlich eine Referenz-RNA ( $mRNA$  Referenz) mitgeführt. B) Die ersten Zyklen der PCR-Reaktion zur Synthese von cDNA-Fragmenten laufen unter der Verwendung von chimären Vorwärtsprimern ab.

## Ab PCR-Zyklus 2-3

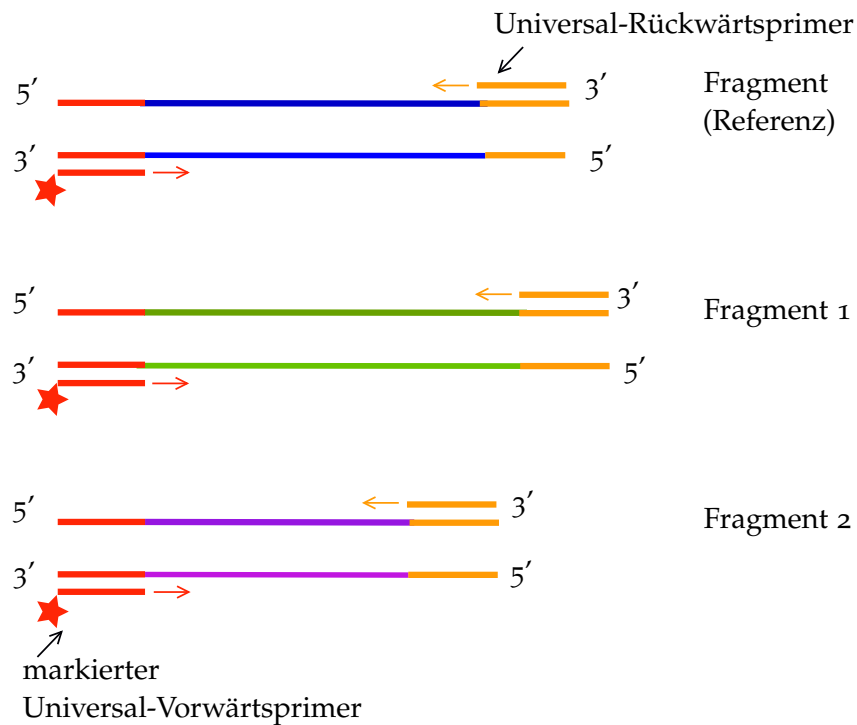


Abbildung 1.7: eXpress-Profiling: PCR-Reaktion ab Zyklus 2-3, modifiziert nach Rothe u. a., 2005

C) Da die Universalprimer im Vergleich zu den chimären Primern im Überschuss vorliegen, laufen alle weiteren Zyklen unter Verwendung dieses Primers ab, wodurch die RNA-Mengen vor und nach der PCR-Reaktion im Verhältnis zueinander konstant bleiben. Die Fluoreszenzmarkierung (Stern) des Universalprimers ermöglicht im Anschluss an die Reaktion die Detektion und Quantifizierung der Transkriptmengen in der Kapillarelektrophorese.

### 1.2.2 Quantifizierung der Fragmente

Um die RNA-Mengen der analysierten Gene berechnen zu können, müssen die Fragmente zuerst in einer Kapillarelektrophorese aufgetrennt und quantifiziert werden.

Die Proben wurden dazu in einem elektrischen Feld in eine Kapillare geladen und nach ihren Fragmentgrößen separiert. Die Detektion der Fragmente erfolgte über die Fluoreszenzmarkierung des Universalprimers an einem Detektor, der sich am Ende der Kapillare befindet. Die Fluoreszenzintensitäten der einzelnen Fragmente wurden in Abhängigkeit ihrer spezifischen Laufzeit in einem so genannten Elektropherogramm dargestellt. Aus den somit erhaltenen Peakflächen können anschließend die spezifischen RNA-Mengen berechnet werden (vgl. Kap. 5.14.5). Die Zuordnung der Transkripte zu den Fragmenten erfolgte über die Umrechnung ihrer Laufzeiten in der Kapillare in

die fragmentspezifischen Längen. Dazu wurde eine Eichkurve aus einem, der Probe separat zugegebenen, DNA-Größenstandard erstellt. Die Umrechnung der Laufzeiten in Fragmentgrößen erfolgte anschließend über die Gerätesoftware (vgl. Kap. 5.14.5). Ein Beispiel für ein solches Elektropherogramm ist in Abb. 1.8 dargestellt.

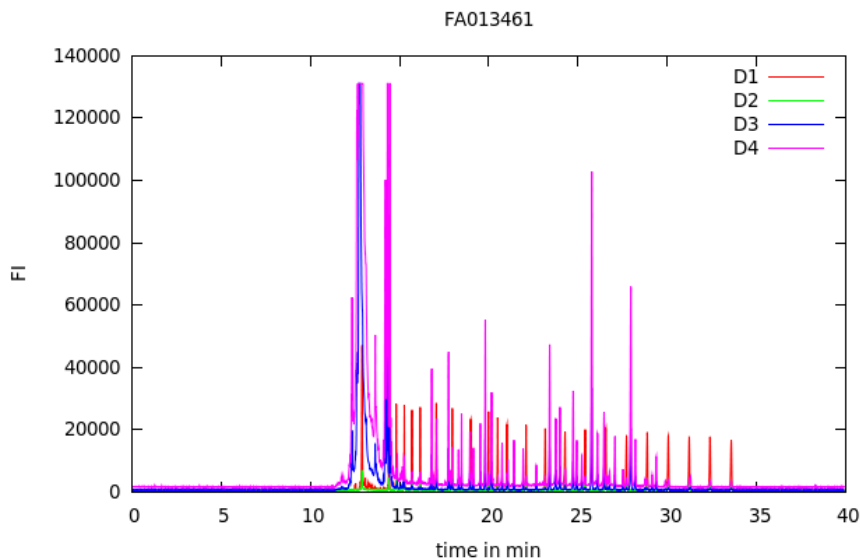


Abbildung 1.8: Quantifizierung der Fragmente – Elektropherogramm

*Die detektierten Fluoreszenzintensitäten werden in einem Elektropherogramm in Abhängigkeit ihrer spezifischen Laufzeit aufgetragen. Die Fragmentpeaks der Proben sind in violett und die Peaks des DNA-Größenstandards in rot dargestellt.*

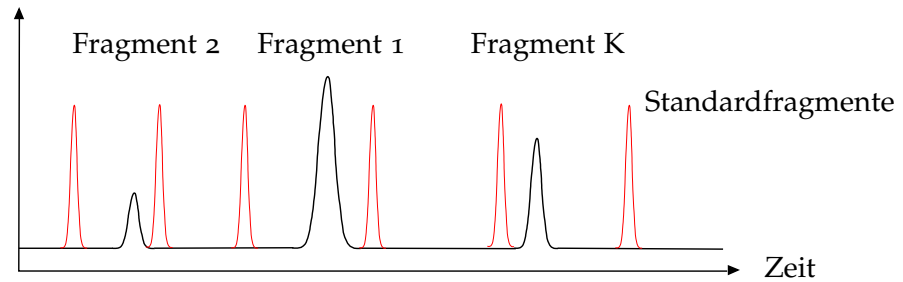
Da die Beladung der Kapillare von Probe zu Probe variieren kann, wird in die RT-PCR-Reaktion jeder Probe zusätzlich eine bestimmte Menge von 16S rRNA aus *Halobacterium salinarum* zugegeben. Dadurch wird eine Normierung der Proben auf die Standard-RNA ermöglicht, was Differenzen in der Beladung der Kapillare ausgleicht und einen relativen Vergleich der Transkriptmengen von Probe zu Probe ermöglicht (vgl. Abb. 1.9).

Zur Berechnung der RNA-Mengen, aus den in der Kapillarelektrophorese erhaltenen Peakflächen der Fragmente, musste zuerst eine Standardkurve erstellt werden. Dazu wurde eine Verdünnungsreihe aus einem RNA-Pool aller Proben mit bekannten Konzentrationen gemessen. Die Peakflächen der betrachteten Gene wurden auf den Peak der Referenz-RNA normiert und doppellogarithmisch über die RNA-Mengen aufgetragen. Für jedes Gen wurde mittels linearer Regression die entsprechende Regressionsgerade berechnet. Die Anstiege der Geraden aller Gene wurden anschließend gemittelt und mit diesem mittleren Anstieg wurde ein neuer Schnittpunkt mit der Or-

dinatenachse ermittelt. Diese gemittelte Geradengleichung dient nun zur Berechnung der RNA-Mengen (vgl. Kap. 5.14.5, Abb. 5.3, links).

### Kapillarelektrophoretische Analyse

Fluoreszenzintensität



Umrechnung der Laufzeit in  
Fragmentgrößen über den mitgeführten

Fluoreszenzintensität

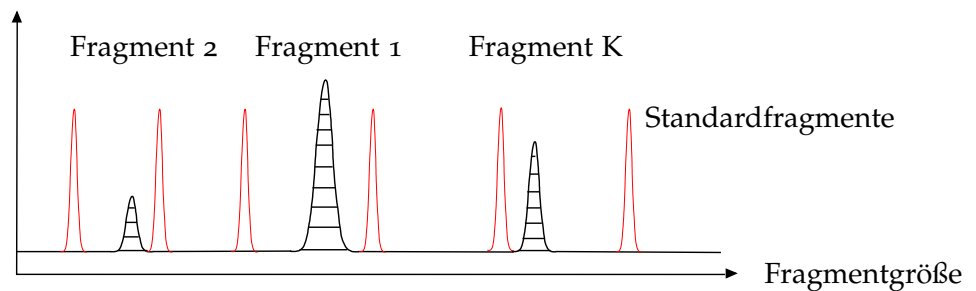


Abbildung 1.9: eXpress-Profilung – kapillarelektrophoretische Auftrennung  
Rothe u. a., 2005

*Fragment-Peaks sind in schwarz dargestellt, die Peaks des DNA-Größenstandards in rot.*

*Die Genexpression lässt sich mit Hilfe der kapillarelektrophoretischen Auftrennung über den Vergleich mit Kontrollgenen (K) ermitteln. Ohne Induktion ist Gen 1 am stärksten exprimiert. Nach Induktion zeigt sich, dass sich die Expressionsstärke von Gen 1 im Vergleich zum Kontroll-Gen verringert hat, wohingegen die Expressionsstärke von Gen 2 gestiegen ist.*



### 1.3 WADDINGTON MODELL DER EPIGENETISCHEN LANDSCHAFTEN

Die 1957 von Conrad Hal Waddington veröffentlichte Theorie zu den epigenetischen Landschaften (EL) (Waddington, 1957) ist ein intuitives Modell zum Verständnis der Entwicklung einer Zelle von einem undifferenzierten Zustand zu einem differenzierten und spezialisierten Zelltyp (Goldberg, Allis und Bernstein, 2007). Diese Landschaften stellen eine visuelle Metapher einer Vielzahl von entweder/oder-Entscheidungsprozessen dar, die das Schicksal einer Zelle in Bezug auf ihre weitere Entwicklung bestimmen. Waddingtons's epigenetische Landschaften beschreiben eine Berg- und Tal-Landschaft, wobei jedes Tal einen häufig beschrittenen Weg zu einem stabilen Differenzierungszustand darstellt. Die Täler dieser Landschaften teilen sich immer wieder in kleinere Unterbereiche auf, wobei die Zelle letzten Endes in einem von mehreren abschließenden Tälern verharren wird. Diese Täler symbolisieren einen endgültig ausdifferenzierten Entwicklungszustand (James E. Ferrell, 2012). Die als Kugel symbolisierte Zelle bewegt sich auf Trajektorien bergab durch diese Landschaft. Dabei bestimmen externe Stimuli, wie induktive Einflüsse und interne Faktoren, wie die Expression homöotischer Gene, welches Tal, beziehungsweise welchen stabilen Zustand die Zelle wählen wird. Eine leicht lesbare Darstellung dieses Konzeptes, einschließlich einer möglichen physikalisch-chemischen Interpretation, ist in James E. Ferrell, 2012 zu finden. Eine Zeichnung von Waddington's epigenetischer Landschaft ist in Abb. 1.10 darstellt.

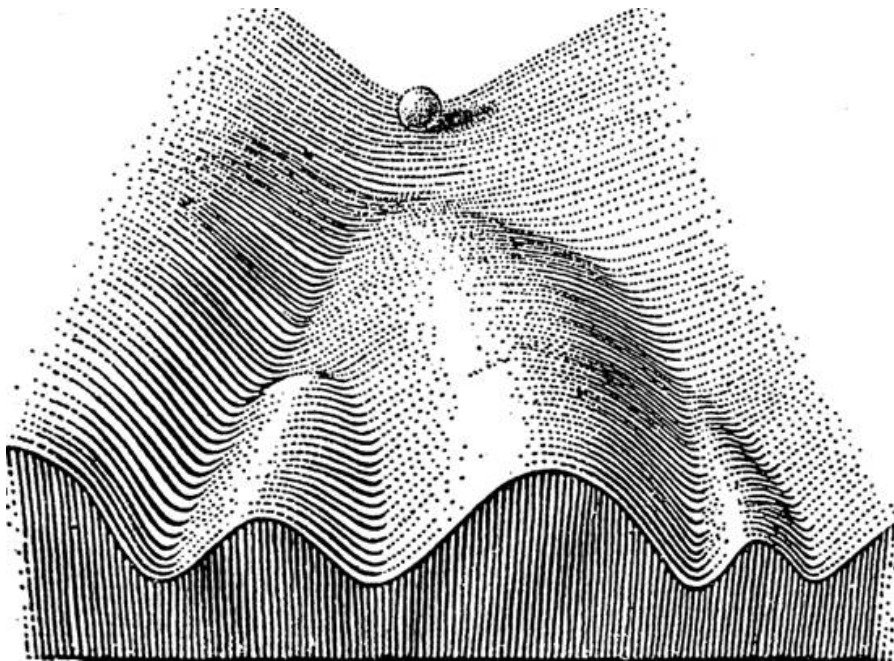


Abbildung 1.10: Epigenetische Landschaften nach Waddington, 1957  
*Erläuterungen im Text*

Waddington's Überlegungen führten aufgrund ihrer physikalisch-chemischen Interpretierbarkeit und dem bekannten Verhalten dynamischer Systeme zu weitaus mehr als nur zu einer Metapher. James E. Ferrell, 2012 und andere geben den drei Dimensionen der Landschaft eine physikalische Interpretation. So repräsentiert die  $x$ -Achse eine zeitabhängige Zustandsvariable, welche mit dem Output des regulatorischen Systems vergleichbar ist, der die Differenzierung vorantreibt. Die  $y$ -Achse hingegen symbolisiert die Zeit, in der die Zelle den Differenzierungsvorgang durchläuft, wohingegen die vertikale  $z$ -Achse das Systempotential darstellt. Dieses Systempotential ist ein Analogon zu einem elektrischen Potential oder einem Gravitationsfeld und stellt eine Funktion des Outputs und der Zeit dar. Weiterhin beschreibt James E. Ferrell, 2012, dass die Oberfläche dieser Potentiallandschaft bestimmt wird durch Gene, RNAs, Proteine und Metabolite, die gemeinschaftlich die Dynamik der Regulatoren steuern, die das Zellschicksal bestimmen. Das Zusammenspiel von Waddingtons Metapher der epigenetischen Landschaft und einem systemtheoretischen Ansatz wird auch als Epigenetische-Attraktor-Landschaft (EAL) bezeichnet. In diesem Zusammenhang muss klargestellt werden, dass der Begriff „epigenetisch“ in seiner ursprünglichen Bedeutung als "über den Genen stehend" begriffen wird. Er darf nicht mit der in der Molekularbiologie üblichen Bezeichnungsweise für die kovalente Modifikation der genomischen DNA durch Methylierung oder mit der Acetylierung von Histonen verwechselt werden, die beide die Expressionsstärke von Genen beeinflussen.

Diese Theorie der epigenetischen Landschaften dient aktuell als Grundlage vieler Modellierungsarbeiten, die darauf abzielen, die zelluläre Differenzierung besser verstehen zu können. In W. Wang, 2013 wurden vier Schritte beschrieben, die zur Rekonstruktion von EALs auf der Grundlage von genregulatorischen Netzwerken (GRN) essentiell sind.

1. Etablierung eines genregulatorischen Netzwerkes aus experimentellen Daten
2. Modellierung der Attraktor- (und Quasipotential-) Landschaft
3. Rechnergestützte Vorhersage der Zellzustandsantwort auf spezifische Störeinflüsse
4. Analyse der vorherrschenden Wege von Zellschicksalsentscheidungen

Davila-Velderrain, Martinez-Garcia und Alvarez-Buylla, 2015 stellten mehrere Ansätze vor, mit denen epigenetische Attraktor-Landschaften aus Genregulationsdaten modelliert werden können.

Beispielhaft wurde die Rekonstruktion stochastischer EALs auf der Grundlage von Booleschen Genregulationsnetzwerken und die Modellierung stochastischer EALs aus kontinuierlichen GRNs beschrieben. Zhou und Li, 2016 stellen in ihrer Arbeit ebenfalls mehrere Möglichkeiten zur Modellierung epigenetischer Landschaften für komplexe Systeme mit mehreren Ruhelagen vor. Neben dem Ansatz zur Darstellung der Potentiallandschaft von Wang (J. Wang, Xu und E. Wang, 2008 und J. Wang, K. Zhang u. a., 2010), der Modellierung über die Zerlegung stochastischer Differentialgleichung und dem A-Typ Integral (Ao, 2004 und Zhu u. a., 2004) wurde auch das Freidlin-Wentzell-Potential (Freidlin und Wentzell, 1984) als Möglichkeit zur Rekonstruktion der Potentiallandschaft beschrieben. Das Freidlin-Wentzell-Theorem stellt ein Resultat der Theorie der großen Abweichungen stochastischer Prozesse dar und scheint nach aktuellem Stand der Forschung eine probate Methode zur Modellierung genregulatorischer Netzwerke zu sein. Für eine rigorose Validierung dieser verschiedenen theoretischen Ansätze fehlen allerdings nach wie vor experimentelle Daten in hinreichender Qualität. Eine wichtige Möglichkeit solche Daten zu ermitteln, besteht darin, die Antwort des Systems auf experimentelle Perturbation zu analysieren. Hier setzt die vorliegende Doktorarbeit ein.

Mithilfe dieser Modellierungsansätze können, die Validität des Modells vorausgesetzt, Voraussagen darüber getroffen werden, wie die An- oder Abwesenheit bestimmter Gene darüber entscheidet, welchem Pfad die Zelle in dieser Landschaft folgt, beziehungsweise wie sie das Schicksal einer Zelle beeinflussen. Um modellbasierte, realistische Voraussagen zu machen, die auch auf einem Verständnis der Systemdynamik beruhen, ist es erforderlich, die Kräfte, die die Differenzierung steuern und die Grenzen, die stabile Differenzierungszustände voneinander abtrennen, auch auf molekularer Ebene zu verstehen und zu quantifizieren. Dadurch erhofft man sich, die Effizienz von Ent- und Transdifferenzierung vorherzusagen und optimale Routen der Zelldifferenzierung identifizieren zu können (Bhattacharya, Q. Zhang und Andersen, 2011).

Konkret sollen in dieser Arbeit die Transkriptmengen von 35 Genen, die am Prozess der Sporulation des Myxomyceten *Physarum polycephalum* beteiligt sind, quantifiziert werden. Anhand dieser Daten, die sowohl von Wildtypplasmidien, als auch von Sporulationsmutanten gewonnen wurden, soll das der Sporulation zugrundeliegende Reaktionsnetzwerk ausgewertet und analysiert werden. Langfristiges Ziel ist es, die somit gewonnenen Daten zu verwenden, um die von Waddington inspirierte Quasipotential-Landschaft der zellulären Reprogrammierung zu rekonstruieren.



Teil II

DIE ARBEIT



---

## ERGEBNISSE

---

Als Modell zur Analyse der zellulären Differenzierung wurde in dieser Arbeit der Sporulationsprozess des Myxomyceten *Physarum polycephalum* herangezogen. Um die molekularen Interaktionen zu analysieren, die den Differenzierungsprozess der Sporulation steuern, wurden die individuellen Genexpressionsmuster zweier unterschiedlicher Sporulationsmutanten des Organismus und deren Fusionszellen quantifiziert und untersucht (vgl. Kapitel 5.5 Tab. 5.5). Diese Mutanten wurden durch chemische Mutagenese aus Wildtypplasmoiden erzeugt, kultiviert und anschließend auf ihren Phänotyp hinsichtlich des Sporulationsverhaltens gescreent. Veränderungen im Sporulationsverhalten der Mutantenstämme können eine verminderte Bereitschaft zur Sporulation nach Belichtung in einem kompetenten Plasmodium oder der Erwerb der Fähigkeit zur spontanen Sporulation sein. Ein spontan sporulierendes Plasmodium ist in der Lage den Differenzierungsvorgang nach Erreichen der Sporulationskompetenz zu durchlaufen, ohne durch ein Lichtsignal induziert worden zu sein. Für die in dieser Arbeit durchgeführten Analysen wurden von den genannten Mutantenstämmen jene ausgewählt, die einen stabilen veränderten Phänotyp aufwiesen (Rätzl u. a., 2013).

Es wird davon ausgegangen, dass die veränderte Bereitschaft zur Sporulation in diesen Plasmodien ursächlich mit einer durch die Mutagenese hervorgerufenen Veränderung in einem der sporulationsrelevanten Gene im Zusammenhang steht. Dass dies tatsächlich der Fall ist, wurde durch Segregationsanalysen nach Rückkreuzung mit einem Wildtyp-Stamm gezeigt (W. Marwan, persönliche Mitteilung). Durch die Analyse der, im Vergleich zum Wildtyp veränderten, Genexpressionsmuster dieser Mutanten kann auf die Funktion des betroffenen Gens geschlossen und gegebenenfalls alternative Signalwege des Differenzierungsvorgangs untersucht werden.

Eine weitere Art der Analyse des Regulationsnetzwerkes ist die Verschmelzung dieser genetisch veränderten Zellen zu einem Fusionsplasmodium. Die Analyse der Genexpressionsmuster an einem Fusionsplasmodium zweier Mutanten mit Sporulationsdefekt ermöglicht

es, den Defekt im vorliegenden Regulationsnetzwerk durch Komplementation der entsprechenden Gene zu überbrücken, während das Signal durch das Netzwerk fließt (Marwan, 2006). Dadurch kann der Zeitpunkt, an dem die Mischung der Genprodukte vonstatten geht, gezielt gesteuert und der Weg, den das Signal durch das Netzwerk nimmt, Schritt für Schritt nachvollzogen werden (Marwan, 2006).

Zur Analyse der molekularen Mechanismen, die den Vorgang der Sporulation in *P. polycephalum* steuern, wurde aus Transkriptomdaten von Barrantes u. a., 2010 ein Set aus 35 Genen zusammengestellt, welche während des Differenzierungsvorganges differentiell reguliert werden. Zur Rekonstruktion des Differenzierungsvorganges wurden die Transkriptmengen dieser 35 Gene (vgl. Kap. 5.25) mit dem eXpress-Profiling-System analysiert. Dazu wurde die Gesamt-RNA aus den Plasmodien isoliert, in einer RT-PCR-Reaktion amplifiziert und anschließend in einer Kapillarelektrophorese quantifiziert (vgl. Kap. 5.14). Aus den resultierenden Daten wurden die RNA-Mengen berechnet, auf deren Grundlage das Regulationsnetzwerk rekonstruiert werden soll.

Anhand eines komplexen Versuchsaufbaues (vgl. Kapitel 2.2.1, Kapitel 2.3.1 und Kapitel 5.9) sollten in dieser Arbeit sowohl die zeitliche Änderung der Genexpressionslevel der Mutanten, als auch der Einfluss von Zellfusionen beider Stämme auf den Differenzierungsvorgang untersucht werden.

## 2.1 PHÄNOTYPISCHE CHARAKTERISIERUNG VON MUTANTENSTÄMMEN DES ORGANISMUS *PHYSARUM POLYCEPHALUM*

Die sporulationsabhängige, zeitliche Veränderung der in dieser Arbeit analysierten Genexpressionslevel ist in Wildtypplasmodien bereits gut untersucht (Hoffmann u. a., 2012 und Rätzl, 2015). Im Vergleich zu der Sporulation der Wildtyp-Plasmodien wurde hier jedoch das Differenzierungsverhalten zweier Sporulationsmutanten auf der Ebene differentiell exprimierter Gene analysiert. Dazu sollte zuerst das Sporulationsverhalten der verwendeten Mutantenstämme charakterisiert und anschließend Unterschiede im Genexpressionsverhalten zwischen Mutante und Wildtyp in Zeitreihenanalysen herausgearbeitet werden.

### 2.1.1 *Sporulationsverhalten der Mutantenstämme*

Da es sich bei beiden analysierten Stämmen um Sporulationsmutanten handelte, sollte zuerst das Sporulationsverhalten der Zellen analysiert werden. Die Sporulationskontrolle erfolgte bei beiden Stämmen ca. 24 Stunden nach Induktion der Differenzierung bei belichteten



Stämmen, beziehungsweise ca. 24 Stunden nach der ersten Probenahme bei unbelichteten Stämmen. Die erste Probenahme entspricht dabei dem Zeitpunkt vor der Induktion der Plasmodien. Es ergaben sich folgende Verhältnisse von sporulierten zu nicht sporulierten Plasmodien (s. Tabelle 2.1). Die Belichtung der Zellen erfolgte unter Rotlicht (FR,  $\lambda \geq 700$  nm,  $13 \text{ W/m}^2$ ) für 30 min.

Tabelle 2.1: Verhältnis von sporulierten zu nicht sporulierten Plasmodien

Stamm	Belichtung FR, 30 min	Sporuliert in %	Nicht sporuliert in %	Stichproben- zahl
N26B5	Ja	60	40	15
N26B5	Nein	0	100	15
N11D4	Ja	0	100	15
N11D4	Nein	0	100	15

Der Stamm N26B5 ist eine stabile Mutante, die eine stark reduzierte Lichtempfindlichkeit aufweist. Plasmodien dieses Stammes sind jedoch bei einer Belichtungsdauer, die im Wildtyp saturierend wirkt, teilweise in der Lage zu sporulieren. Die hier gezeigten Ergebnisse belegen, dass der Stamm N26B5 trotz eines Defektes in der Signalkaskade, die die Sporulation steuert, mit 60 % sporulierten Plasmodien zur Differenzierung fähig ist. Jedoch ist die Sporulationsrate in diesem Stamm im Vergleich zu Wildtypplasmodien deutlich geringer. Hier tritt bei gleicher Belichtungs- und Hungerzeit eine Sporulationsrate von 91,7 % auf (siehe Rätzel, 2015). Ohne vorhergehende Belichtung der Zellen zeigte N26B5 keine Sporulation.

Der Stamm N11D4 war sowohl mit, als auch ohne Belichtung der Zellen nicht in der Lage zu sporulieren.

## 2.2 GENEXPRESSIONSANALYSEN IN ZEITREIHENEXPERIMENTEN

Zur Untersuchung der Entwicklung der Genexpression während eines Differenzierungsvorganges stellen Zeitreihenexperimente eine besonders aussagekräftige und daher häufig verwendete Analysemethode dar. Diese Art von Versuchsaufbau ermöglicht es in fortlaufenden Zeitschritten nach Induktion des Differenzierungsvorganges mit Rotlicht (Far Red Light (FR)) Material der untersuchten Zellen zu entnehmen. Mithilfe der aus diesen Proben isolierten RNA kann im Anschluss die zeitliche Änderung der Genexpression während der zellulären Differenzierung nachvollzogen werden. Daraus können Kandidatengene identifiziert werden, die den Differenzierungsprozess steuern. Der zur Durchführung von Zeitreihenanalysen in *Physarum polycephalum* verwendete Versuchsaufbau ist in zwei Teilversuche gegliedert und in Kapitel 2.2.1, Abbildung 2.1 dargestellt. Aus diesem expe-

rimentellen Setup wurden die in Tabelle 2.2 aufgeführten Proben an den genannten Zeitpunkten entnommen.

Tabelle 2.2: Isolierte Proben für Zeitserien

	Stamm	Belichtung FR, 30 min	Zeitpunkt Probenahme
<b>Teilversuch 1</b>			
	N26B5	Nein	DK
	N26B5	Ja	4 h nach FR
	N26B5	Ja	8 h nach FR
	N11D4	Nein	DK
	N11D4	Nein	4 h nach Start <sup>1</sup>
	N11D4	Nein	8 h nach Start <sup>1</sup>
<b>Teilversuch 2</b>			
	N11D4	Nein	DK
	N11D4	Ja	4 h nach FR
	N11D4	Ja	8 h nach FR
	N26B5	Nein	DK
	N26B5	Nein	4 h nach Start <sup>1</sup>
	N26B5	Nein	8 h nach Start <sup>1</sup>

### 2.2.1 Versuchsaufbau für Zeitreihenexperimente

In diesem experimentellen Setup wurde mit zwei Sporulationsmutanten von *P. polycephalum*, N25B6 und N11D4, gearbeitet. Zu Beginn der Probenahme wurde von allen Plasmodien beider Stämme ein Achtel des Zellmaterials als Dunkelkontrolle (DK) mit einem Glaslöffel von der Agarplatte abgenommen. Das Pellet wurde mit einem, in Stickstoff vorgekühltem Plastikspatel, vom Löffel abgenommen und in einem, mit Flüssigstickstoff gefülltem Cryoröhrchen, schockgefroren. Um die Rückfütterung der Plasmodien mit Zellresten zu verhindern, wurde der abgeerntete Agar mit einem Spatel von den Platten entfernt.

Anschließend wurde Stamm Stamm N26B5 (vgl. Abbildung 2.1) für 30 min mit dunkelrotem Licht ( $\lambda \geq 700$  nm,  $13 \text{ Wm}^2$ ), wie in Marwan, 1998 beschrieben, belichtet, um die Sporulation zu induzieren. Der Stamm N11D4, vgl. Abbildung 2.1 verblieb uninduziert. Vier Stunden nach der Belichtung wurde von den Plasmodien beider Stämme erneut ein Achtel des Zellmaterials wie beschrieben abgenommen und eingefroren. Acht Stunden nach Belichtung wurde erneut ein Ach-

<sup>1</sup> Start ist der Zeitpunkt der Induktion der belichteten Proben

tel jedes Plasmodiums beider Stämme abgenommen und eingefroren. Der Rest des Zellmaterials verblieb als Sporulationskontrolle auf den Platten.

Zusätzlich wurde ein Kontrollexperiment durchgeführt. In diesem Experiment wurde Stamm N11D4 belichtet und Stamm N26B5 verblieb unbelichtet.

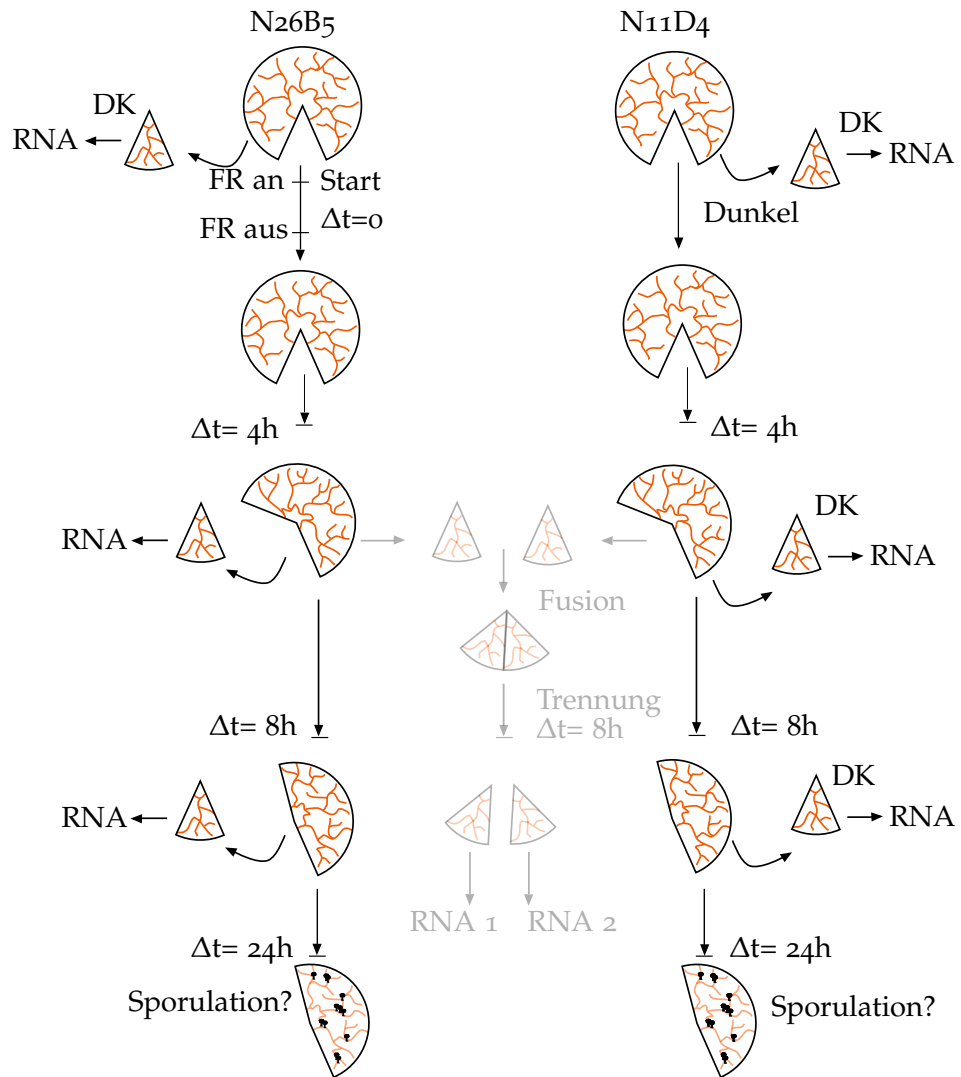


Abbildung 2.1: Probenahmeschema für Zeitreihenexperimente

Rechts und links: Dargestellt ist das Probenahmeschema zur Analyse von Zeitreihenexperimenten. (Mitte, transparent: Probenahmeschema für Fusionsexperimente, vgl. Kapitel 2.3). Das komplette Versuchsschema ist in Kapitel 5.9, Abbildung 5.1 dargestellt.

### 2.2.2 Identifikation zellspezifischer Trajektorien in Mutantenstämmen mithilfe der Hauptkomponentenanalyse

Um die Änderung der Genexpressionsniveaus der untersuchten Plasmodien in übersichtlicher und anschaulicher Form darzustellen, wurden die gemessenen Daten mithilfe der Principle Component Analysis (PCA), auch Hauptkomponentenanalyse, wie in Kapitel 5.15.3 beschrieben, untersucht. Die PCA ist ein mächtiges Werkzeug in der Biostatistik um große Datensätze, wie sie oftmals für Genexpressionsanalysen üblich sind, in ihrer Dimensionalität auf

lineare Merkmalskombinationen zu reduzieren, die die größten Schwankungen der Attribute eines Datensatzes verursachen. Diese Linearkombinationen werden auch Hauptkomponenten genannt (Hubert und Engelen, 2004).

In diesem Teil der Arbeit wurden die Proben der Zeitreihenanalyse beider Stämme, sowohl belichtet als auch unbelichtet, mithilfe der PCA untersucht. Die Genexpressionslevel wurden jeweils unmittelbar vor der Belichtung, als auch vier Stunden und acht Stunden nach Induktion mit dunkelrotem Licht, untersucht (vgl. Tabelle 2.2). Die sogenannten Loadings, d.h. die Koordinaten der untersuchten Plasmodien im dimensionsreduzierten Raum, sind für den Stamm N26B5 in Abbildung 2.2 dargestellt. Die Ergebnisse der Analyse zeigten für die sporulierten Plasmodien des Stammes N26B5 (Abb. 2.2, 1A und 2A) keine klare Abgrenzung zwischen den Datenpunkten der Dunkelkontrolle und denen, die vier Stunden nach Induktion gemessen wurden. Zum Zeitpunkt um acht Stunden nach Belichtung der Plasmodien konnte jedoch ein deutlicher Trend der Datenpunkte in den rechten unteren Bereich des PCA-Plots beobachtet werden, der weder in den belichteten, nicht sporulierten Zellen dieses Stammes (Abb. 2.2, 1B und 2B), noch in den unbelichteten Plasmodien von N26B5 auftrat (Abb. 2.2, 1C und 2C). Weiterhin konnte beobachtet werden, dass sich die Datenpunkte in den belichteten,  $spo^+$ -Plasmodien (Abb. 2.2, 1B und 2B) deutlich auf den Wert um vier Stunden nach Belichtung fokussieren, während in den Datenpunkten der unbelichteten Plasmodien (Abb. 2.2, 1C und 2C) diese Fokussierung nicht stattfindet und die Datenpunkte deutlich weiter streuen. Dieser Bereich der Fokussierung wurde in Abb. 2.2, 1A-C mit einem blauen Kreis manuell markiert. Diese Ergebnisse indizieren, dass es sich bei der Region des PCA-Plots, in den die  $spo^+$ -Plasmodien in Abbildung 2.2, 1A nach acht Stunden abdriften, um einen Zustand handelt, der ausschließlich von sporulierenden Plasmodien erreicht wurde und der somit spezifisch für die Sporulation zu sein scheint. Nichtsporulierende Plasmodien verbleiben in einem zweiten, scheinbar stabilen oder zumindest metastabilen, Zustand, welcher auf der Genexpressionsebene circa vier Stunden nach der Induktion eingenommen wird. Die hier identifizierten Genexpressionszustände, stellen einen Hinweis auf die Existenz der von Waddington postulierten epigenetischen Landschaften dar (Waddington, 1957). In den folgenden Kapiteln dieser Arbeit sollen diese beschriebenen Landschaften nachgewiesen und ihre Eigenschaften soweit wie möglich nachvollzogen werden.

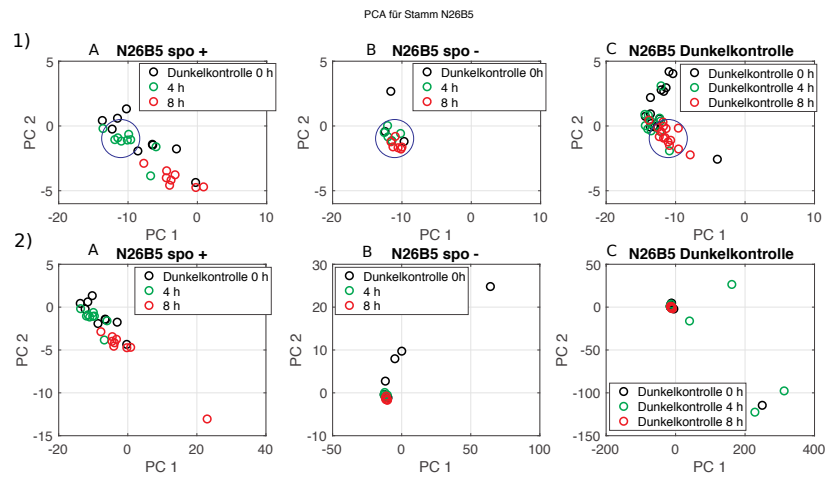


Abbildung 2.2: Ergebnisse der Hauptkomponentenanalyse für den Mutantenstamm N26B5

Dargestellt sind jeweils die ersten zwei Hauptkomponenten der PCA-Analyse für den Mutantenstamm N26B5, wobei Dunkelkontrollen zu 0 h in schwarz, Proben zu 4 h in grün und zu 8 h nach Induktion in rot dargestellt sind. Die hier abgebildeten Datensätze entstammen derselben PCA-Analyse. Dabei decken die beiden dargestellten Hauptkomponenten insgesamt 78,31 % der Varianz innerhalb des Datensatzes ab. Mit einem blauen Kreis ist der Bereich markiert, auf den sich die Datenpunkte nach 4 Stunden fokussieren. 1) Dargestellt sind die Bereiche, in denen die meisten Datenpunkte liegen. 2) Darstellung aller Datenpunkte. A) sporulations-positive Plasmodien des belichteten Stammes N26B5, B) sporulations-negative Plasmodien des belichteten Stammes N26B5 und C) unbelichteter Stamm N26B5.

Weiterhin sollte das Differenzierungsverhalten des Stammes N11D4 mithilfe der Hauptkomponentenanalyse charakterisiert werden. Die Ergebnisse der PCA für diese Sporulationsmutante sind in Abbildung 2.3 dargestellt.

Für den Mutantenstamm N11D4 konnte der, für die sporulierten Plasmodien der Mutante N26B5 definierte, Drift in die sporulationspezifische Region des PCA-Plots nicht beobachtet werden (vgl. Abb. 2.3, 1A und 2A). Diese Ergebnisse belegen somit auch die in den Experimenten beobachtete Unfähigkeit dieses Stammes zur Sporulation. Es schienen jedoch einige der Plasmodien nach acht Stunden einen alternativen Zustand oder Differenzierungspfad einzunehmen. Dieser Zustand ist durch einen Drift in die rechte, obere Region des PCA-Plots gekennzeichnet. Das Erreichen der sporulationspezifischen Region konnte jedoch, zumindest in diesem Zeitintervall, auch nicht über diesen alternativen Weg erreicht werden. Die zuvor in den induzierten Plasmodien des Stammes N26B5 beobachtete Fokussierung der Datenpunkte auf den Vier-Stunden-Zustand wurde ebenfalls in

den induzierten Zellen von N11D4 beobachtet. Die nicht induzierten Plasmodien dieser Mutante zeigten dieses Verhalten nicht. Hier war erneut eine starke Streuung der Datenpunkte zu erkennen (vgl. Abb. 2.3, 1B und 2B). Auffällig ist hierbei, dass die Dunkelkontrollwerte in Abb. 2.3, 1A deutlich weniger streuen als die Dunkelkontrollwerte in Abb. 2.3, 1B. Diese Streuung könnte dadurch zustande gekommen sein, dass diese Werte aus zwei zeitlich versetzten Telexperimenten stammen. Sowohl eine geringfügig veränderte Lagerbedingung der Zellen als auch unterschiedliche Zellzyklusstadien könnten diese Unterschiede verursachen.

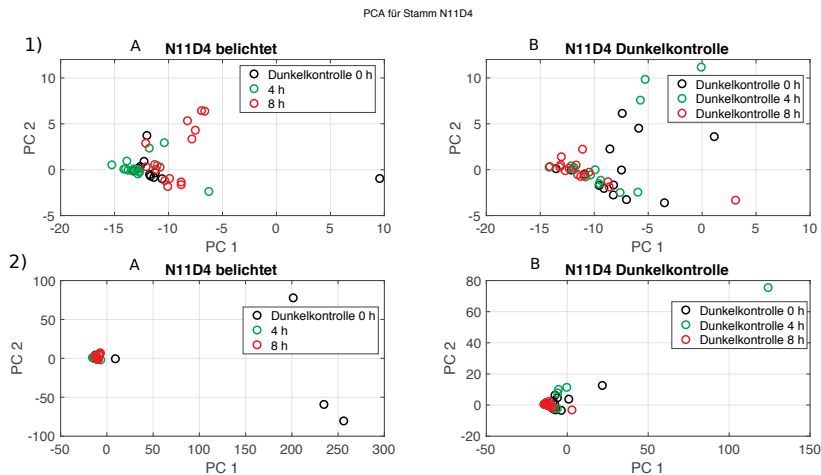


Abbildung 2.3: Ergebnisse der Hauptkomponentenanalyse für den Mutantenstamm N11D4

*Dargestellt sind jeweils die ersten zwei Hauptkomponenten der PCA-Analyse für den Mutantenstamm N11D4, wobei Dunkelkontrollen zu 0 h in schwarz, Proben zu 4 h in grün und zu 8 h nach Induktion in rot dargestellt sind. Die abgebildeten Datenpunkte stammen aus derselben PCA, wobei die hier dargestellte 1. und 2. Hauptkomponente zusammen 78,31 % der Varianz in diesem Datensatz erklären. 1) Dargestellt sind die Bereiche, in denen sich die meisten Datenpunkte befinden. 2) Dargestellt sind alle Datenpunkte. A) belichteter Stamm N11D4, B) unbelichteter Stamm N11D4. In diesem Versuch sporulierte keines der Plasmodien.*

Zusätzlich wurden die individuellen Trajektorien, die die einzelnen Plasmodien in den PCA-Plots einnehmen, dargestellt (Abb. A.1, A.2, A.3 und A.4 im Anhang). Es konnte beobachtet werden, dass sich jedes Plasmodium auf einer individuellen Trajektorie auf seinen spezifischen Endpunkt zubewegt. Dieses Verhalten ist unabhängig von der Fähigkeit zur Sporulation.

Beispielhaft sind in Abbildung 2.4 die Trajektorien von jeweils drei sporulierten und drei nicht sporulierten Plasmodien des belichteten Stammes N26B5 dargestellt. Obwohl sich alle sporulierten Plasmodien in denselben Endzustand bewegen, folgt jede einzelne Zelle ihrer

individuellen Trajektorie in diese spezifische Region. Die Trajektorien unterscheiden sich dabei deutlich voneinander.

Noch stärker ausgeprägt ist dieses Verhalten in den nicht induzierten Zellen der Mutante N11D4 in Abbildung 2.5 zu beobachten. Hier sind sowohl der Start- als auch Endpunkt der durch die PCA berechneten Trajektorien deutlich voneinander verschieden. Dabei verlaufen die Kurven sogar in entgegengesetzte Richtung.

Schlussendlich kann festgehalten werden, dass sich jedes einzelne Plasmodium während der zellulären Differenzierung auf einem individuellen Pfad bewegt, der sich sichtbar von den Pfaden anderer Zellen unterscheidet. Diese Unterschiede sind dabei unabhängig von der Entscheidung, ob die Sporulation erfolgt oder nicht. Die Trajektorien der induzierten Plasmodien verlaufen im Vergleich zu den nicht induzierten Zellen deutlich zielgerichteter und geradliniger. Die in der PCA analysierten Datenpunkte der sporulations-positiven Plasmodien bewegen sich zielgerichtet in eine sporulationsspezifische Region des Zustandsraumes, wohingegen sich die Daten der sporulations-negativen Zellen auf den Zustand fokussieren, der in etwa vier Stunden nach der Belichtung der Zellen eingenommen wird. Plasmodien, die nicht induziert wurden, zeigen ein eher ungerichtetes Verhalten in den PCA-Plots. Sie streben weder in einen definierten, differenzierungsspezifischen Zustand noch zeigen die berechneten Trajektorien ein einheitliches Verhalten betreffend ihres Anfangs- und Endpunktes.

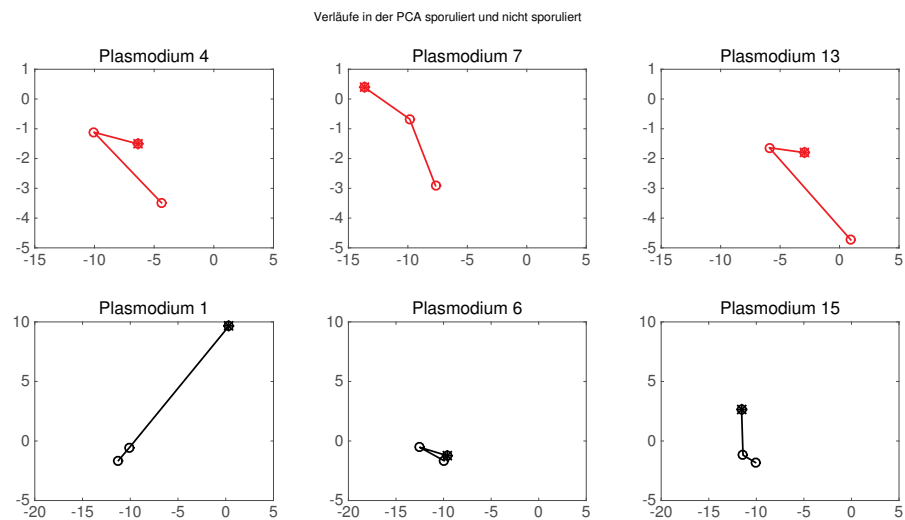


Abbildung 2.4: Vergleich der PCA-Trajektorien von sporulierten und nicht sporulierten Plasmodien der Mutante N26B5

*Dargestellt sind die individuellen Trajektorien der Plasmodien für Stamm N26B5 (induziert) im PCA Plot über alle analysierten Zeitpunkte (0 h, 4 h, 8 h). Der Startpunkt zu 0 h ist mit einem Stern (\*) markiert. Sporulierte Plasmodien sind in rot und nicht sporulierte Plasmodien in schwarz dargestellt.*



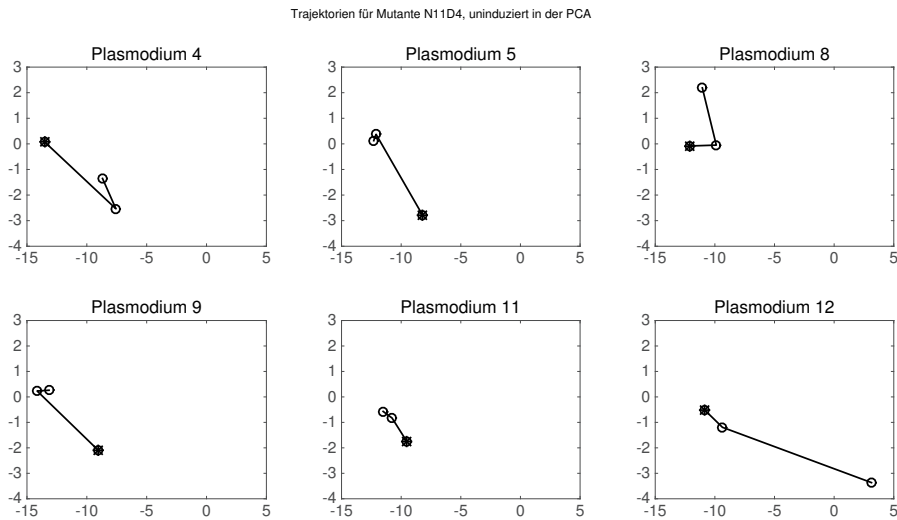


Abbildung 2.5: Vergleich der PCA Trajektorien der Mutante N11D4

*Dargestellt sind die individuellen Trajektorien der Plasmodien für Stamm N11D4 (uninduziert) im PCA Plot über alle analysierten Zeitpunkte (0 h, 4 h, 8 h). Der Startpunkt zu 0 h ist mit einem Stern (\*) markiert.*

### 2.2.3 Identifizierung von sporulationsrelevanten Genen unter Zuhilfenahme von Signifikanzanalysen

In Vorarbeiten von Rätzel, 2015 und Hoffmann u. a., 2012 konnten bereits Gene identifiziert werden, deren spezifische Expression typisch für den Vorgang der Sporulation in Wildtyp-Plasmodien des Organismus *Physarum polycephalum* war. In dieser Arbeit wurde das spezifische Genexpressionsmuster der zwei betrachteten Mutantenstämme analysiert. Dabei sollten Unterschiede zu dem bisher identifizierten Genexpressionsmuster des Wildtyps aufgezeigt und gegebenenfalls alternative Signalwege rekonstruiert werden.

Die Analyseergebnisse der PCA zeigten deutliche Lageunterschiede zwischen sporulierten und nicht-sporulierten Plasmodien im dimensionsreduzierten Raum des PCA-Plots. Um zu untersuchen welche Änderungen der Genexpressionsniveaus diese Lageunterschiede verursachen, wurden die gemessenen Expressionslevel aller Plasmodien mithilfe eines Signifikanztests auf ihre Unterscheidbarkeit überprüft. Für unverbundene Proben, wie zum Beispiel der Vergleich von zwei verschiedenen Stämmen, wurde der Mann-Whitney-Test verwendet. Für verbundene Proben, wie Zeitreihenanalysen derselben Plasmodien, kam der Wilcoxon-Vorzeichen-Rangtest zur Anwendung (vgl. Kap. 5.15.1 und 5.15.2).

Zur Durchführung dieser Analysen wurden die Expressionslevel jedes Stammes von Analysezeitpunkt zu Analysezeitpunkt für jedes Gen mithilfe der oben genannten Signifikanztests verglichen und die

Ergebnisse farbig aufgetragen. Die Durchführung dieser Signifikanzanalysen ist in Abbildung 2.6 beispielhaft dargestellt. Mithilfe des Wilcoxon-Vorzeichen-Rangtest wird für zwei ausgewählte Datensätze verglichen, ob sich die Transkriptmengen der einzelnen Gene zwischen beiden Datensätzen signifikant unterscheiden. Dabei werden je Gen die Transkriptmengen aller Plasmodien mithilfe der in Kapitel 5.15.1 und Kapitel 5.15.2 dargestellten Teststatistiken verglichen. Diese Ergebnisse werden anschließend, wie in Abb. 2.6 abgebildet, farbig dargestellt. Um die Unterschiede in den Expressionsleveln der betrachteten Datensätze quantifizieren zu können, wurden zusätzlich die Quotienten der Mediane je Gen zwischen beiden Datensätzen berechnet. Das heißt, sowohl von Datensatz 1 als auch von Datensatz 2 wurde genweise der Median über die Expressionslevel aller Plasmodien berechnet. Anschließend wurde der Quotient dieser Mediane ermittelt und in einer Tabelle, äquivalent zu den Auftragungen des Signifikanztests, dargestellt.

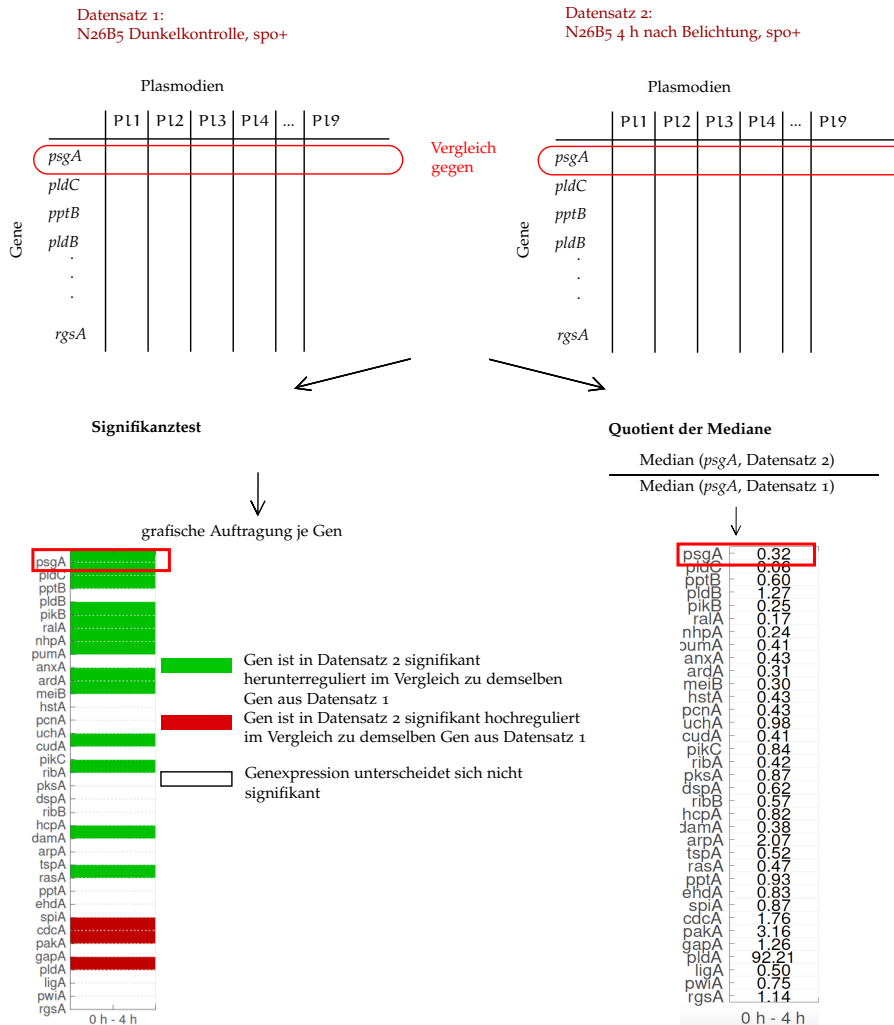


Abbildung 2.6: Durchführung von Signifikanzanalysen am Beispiel der sporulierten Plasmodien des Stammes N26B5

Hier dargestellt ist ein Vergleich zwischen den Dunkelkontrollen der sporulierten Plasmodien des Stammes N26B5 und den Proben, die vier Stunden nach Belichtung ebenfalls an sporulierten Plasmodien gemessen wurden. Diese zwei Datensätze werden mithilfe der jeweiligen Signifikanztests für jedes Gen separat verglichen. Verringern sich die Transkriptmengen zu vier Stunden nach FR im Vergleich zur Dunkelkontrolle mit einem Signifikanzniveau (entsprechend einer Irrtumswahrscheinlichkeit) von 5 % für bestimmte Gene signifikant, so wird das entsprechende Feld in der grafischen Auftragung grün dargestellt. Findet eine signifikante Erhöhung zum Zeitpunkt vier Stunden nach Belichtung statt, so wird das entsprechende Feld rot eingefärbt. Konnte keine signifikante Änderung zwischen beiden Vergleichsdatsätzen ermittelt werden, so werden diese Gene weiß markiert. Zusätzlich wird der Quotient der Mediane für jedes Gen beider Vergleichsdatsätze berechnet und tabellarisch aufgetragen.

Für den Stamm N26B5 wurden die Analysen sowohl mit den Proben der unbelichteten als auch mit den Proben der belichteten Plasmodien durchgeführt, wobei letztere in sporulierte und nicht-sporulierte Zellen unterteilt wurden. Dabei wurden jeweils Vergleiche der Zeitschritte zwischen Dunkelkontrolle und vier Stunden nach Induktion, zwischen vier Stunden und acht Stunden nach Induktion und zwischen der Dunkelkontrolle und acht Stunden nach Induktion durchgeführt. Diese Ergebnisse sind in Abbildung 2.7 dargestellt. Für den Zeitschritt zwischen Dunkelkontrolle (0 h) und vier Stunden nach Belichtung wurden folgende Gene in den  $spo^+$ -Plasmodien signifikant herunterreguliert (vgl. Abb. 2.7, A): *psgA*, *pldC*, *pptB*, *pikB*, *ralA*, *nhpA*, *pumA*, *ardA*, *meiB*, *cudA*, *ribA*, *damA* und *rasA*. Zusätzlich wurden in diesem Zeitabschnitt die Expressionslevel von drei Genen, *cdcA*, *pakA* und *pldA*, als signifikant erhöht gekennzeichnet.

Im nächsten Zeitschritt von vier zu acht Stunden nach Belichtung ist eine deutliche Abnahme der Anzahl an herunterregulierten Genen zu verzeichnen, wohingegen sich die Anzahl der hochregulierten Gene drastisch erhöht. So werden in diesem Zeitschritt die Gene *pldB*, *pikB*, *anxA*, *hstA* und *uchA* herunterreguliert, während die Expressionslevel von *ardA*, *pksA*, *damA* und *tspA* bis *rgsA* (vgl. Abbildung 2.7) signifikant ansteigen. Über den gesamten Zeitraum von der Dunkelkontrolle zu acht Stunden nach Belichtung konnten zwei Gruppen von Genen identifiziert werden, welche während des Sporulationsvorganges differentiell reguliert wurden. Signifikant herunterreguliert wurden:

- *psgA*, *pldC*, *pptB*, *pldB*, *pikB*, *ralA*, *nhpA*, *pumA*, *anxA*, *meiB*, *hstA*, *pcnA*, *uchA*, und *ribB*

wobei folgende Gruppe von Genen signifikant hochreguliert wurde:

- *arpA*, *pptA*, *ehdA*, *spiA*, *cdcA*, *pakA*, *gapA*, *pldA*, *ligA*, *pwiA* und *rgsA*.

Die übrigen Gene wurden in diesem Zeitraum nicht differentiell reguliert. Für die Sporulations-negativen Zellen des Stammes N26B5 konnte beobachtet werden, dass sich die differentiell regulierten Gene im ersten Zeitschritt von der Dunkelkontrolle bis hin zu vier Stunden nach Belichtung nur geringfügig von denen der sporulations-positiven Zellen unterscheiden (vgl. Abb. 2.7, B). Einige der im ersten Zeitschritt herunterregulierten Gene sind hier nicht reguliert (*pptB*, *pikB*, *cudA* und *rasA*), wohingegen die Gene *pcnA* und *ligA* in den sporulations-negativen Zellen zusätzlich als herunterreguliert gekennzeichnet wurden. Zusätzlich wurden in Abbildung 2.7, B die Gene *arpA* und *ehdA* als signifikant hochreguliert eingestuft. Im zweiten Zeitschritt von vier zu acht Stunden nach Belichtung zeigte sich, dass ein Großteil der Gene, welche bereits in den sporulations-positiven Zellen als sporulationsrelevant identifiziert werden konnten, hier nicht differentiell reguliert wurde. So konnte in diesen Plasmodien

sowohl keine Herunterregulation der Gene *pikB*, *anxA* und *hstA* als auch kein Anstieg der Expressionslevel in den Genen *damA*, *tspA*, *rasA*, *pptA*, *pakA*, *gapA*, *pldA* und *rgsA* nachgewiesen werden. Unter Betrachtung der Ergebnisse der Signifikanzanalyse der sporulationsnegativen Plasmodien über den gesamten Analysezeitraum von der Dunkelkontrolle bis hin zu acht Stunden nach Induktion, konnten folgende Gene als differentiell reguliert identifiziert werden:

- herunterreguliert: *psgA*, *nhpA* und *rgsA*
- hochreguliert: *ardA*, *arpA*, *pptA*, *cdcA*, *pakA*, *pldA* und *ligA*.

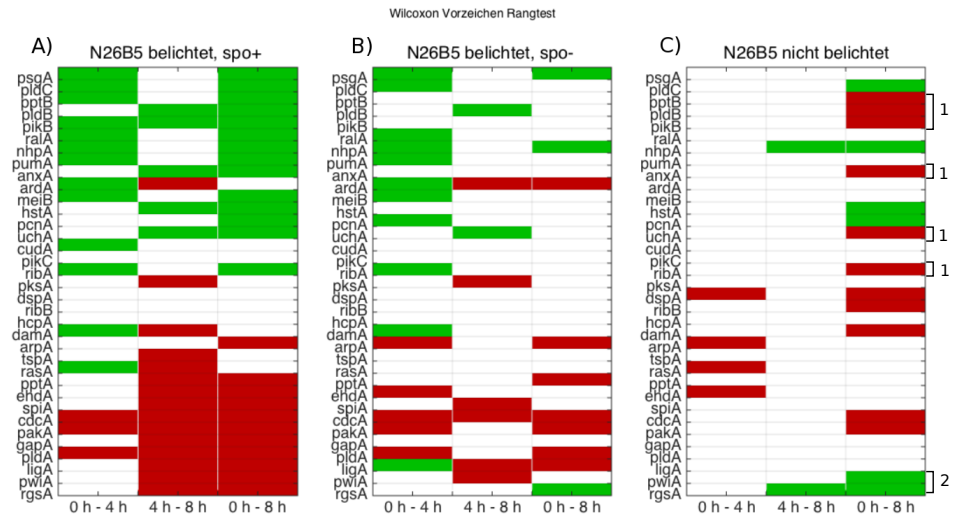
Diese Ergebnisse bestätigen somit noch einmal die Resultate der vorhergehenden PCA-Analyse (vgl. Abbildung 2.2), welche aufzeigte, dass sich die Genexpressionslevel der nicht-sporulierten Zellen bis zu vier Stunden nach Induktion auf nahezu dieselbe Weise entwickeln wie die Genexpressionslevel der sporulierten Zellen. Diese verharren jedoch im Anschluss auf diesem Niveau und sind nicht zu einer Entwicklung in den Genexpressionszustand nach acht Stunden nach Induktion der Differenzierung in der Lage. Die Plasmodien des nicht belichteten Stammes N26B5 zeigten von der DK zu vier Stunden und von vier zu acht Stunden nach Beginn der Analyse nur eine geringfügige Änderung der Expressionslevel der analysierten Gene (vgl. Abb. 2.7, C). Lediglich über den gesamten Analysezeitraum von der DK zu acht Stunden nach Induktion der Zellen konnten Unterschiede in der Genexpression festgestellt werden. Auffällig ist hierbei, dass ein Großteil der Gene, die während der Sporulation herunterreguliert werden sollten, in diesen Zellen signifikant hochreguliert sind (z.B. *pptB*, *pldB* und *pikB*, vgl. Abb. 2.7 (a) C, markiert mit "1"), wohingegen die Gene *rgsA* und *pwiA* herunterreguliert sind, obwohl für eine erfolgreiche Sporulation eine Hochregulation notwendig wäre (vgl. Abb. 2.7 (a) C, markiert mit "2"). Somit wird durch die entgegengesetzte Entwicklung der Genexpressionslevel und die ausbleibende differentielle Regulation einer Vielzahl von sporulationsrelevanten Genen in den nicht belichteten Plasmodien des Stammes N26B5 die Sporulation möglicherweise verhindert. Diese hier beobachtete, inverse Regulation der Genexpressionslevel deutet auf einen Defekt in einem der sporulationsrelevanten Gene hin. Die hier getroffenen Beobachtungen weisen darauf hin, dass die Herunterregulation der Gene

- *pptB*, *pldB*, *pikB*, *ralA*, *pumA*, *anxA*, *meiB*, *uchA* und *ribA*

in den Plasmodien des Mutantenstammes N26B5 wichtig für das Vorschreiten der Sporulation zu sein scheinen, wohingegen eine Hochregulation der Gene

- *ehdA*, *spiA*, *gapA*, *pwiA* und *rgsA*

für das Durchlaufen des Differenzierungsvorganges notwendig erscheint.



(a) Wilcoxon-Vorzeichen-Rangtest für N26B5

x-fache Änderungen der Genexpressionslevel der Vergleichsgruppen

N26B5 belichtet, spo+				N26B5 belichtet, spo-				N26B5 nicht belichtet			
Gene	0h-4h	4h-8h	0h-8h	Gene	0h-4h	4h-8h	0h-8h	Gene	0h-4h	4h-8h	0h-8h
psgA	0.32	0.81	0.26	psgA	0.29	0.73	0.21	psgA	1.26	1.07	1.35
pldC	0.06	0.83	0.05	pldC	0.24	1.42	0.34	pldC	0.42	1.59	0.67
pptB	0.60	0.81	0.49	pptB	0.95	0.80	0.76	pptB	0.82	1.71	1.39
pldB	1.27	0.23	0.30	pldB	2.90	0.29	0.86	pldB	1.10	1.91	2.10
pikB	0.25	0.19	0.05	pikB	0.67	1.44	0.97	pikB	1.13	2.46	2.78
ralA	0.17	1.08	0.18	ralA	0.39	1.49	0.58	ralA	1.26	1.61	2.02
nhpA	0.24	1.18	0.28	nhpA	0.15	0.05	0.01	nhpA	1.41	0.03	0.04
purhA	0.41	0.67	0.28	purhA	0.44	1.73	0.76	purhA	1.36	1.26	1.72
anxA	0.43	0.34	0.15	anxA	0.87	0.91	0.79	anxA	0.99	1.77	1.76
ardA	0.31	4.77	1.50	ardA	0.19	6.78	1.25	ardA	0.97	1.97	1.91
meiB	0.30	1.44	0.44	meiB	0.56	2.72	1.53	meiB	1.08	1.76	1.91
hstA	0.43	0.65	0.28	hstA	0.12	0.18	0.02	hstA	0.37	0.53	0.20
pcnA	0.43	1.23	0.52	pcnA	0.18	1.14	0.21	pcnA	0.54	1.57	0.85
uchA	0.98	0.65	0.63	uchA	1.84	0.46	0.84	uchA	1.01	1.80	1.82
cudA	0.41	1.04	0.43	cudA	0.79	1.61	1.26	cudA	1.24	1.14	1.42
pikC	0.84	0.96	0.80	pikC	0.79	0.98	0.77	pikC	0.97	1.27	1.23
ribA	0.42	0.92	0.32	ribA	0.67	1.74	0.82	ribA	1.10	2.29	2.23
pkSA	0.87	0.51	1.32	pkSA	0.89	1.76	1.57	pkSA	0.90	1.45	1.31
dspA	0.62	1.51	0.94	dspA	1.50	1.50	2.24	dspA	1.26	1.75	2.20
ribB	0.57	1.21	0.69	ribB	1.29	1.27	1.64	ribB	1.23	1.90	2.33
hcpA	0.82	1.50	1.21	hcpA	0.90	1.92	1.11	hcpA	1.22	0.83	1.01
damA	0.38	1.98	1.23	damA	0.90	1.92	1.73	damA	1.02	2.19	2.23
arpA	2.07	1.15	2.38	arpA	3.15	0.66	2.08	arpA	1.68	1.25	2.11
tspA	0.52	2.46	1.28	tspA	0.76	1.46	1.11	tspA	0.46	1.69	0.79
rasA	0.47	0.83	0.89	rasA	1.78	0.81	4.99	rasA	1.10	0.97	1.40
pptA	0.33	4.91	4.59	pptA	2.3	3.25	7.01	pptA	0.21	0.90	1.09
ehdA	0.83	1.98	1.64	ehdA	1.63	0.98	1.59	ehdA	1.50	1.29	1.94
spiA	0.87	3.38	2.96	spiA	0.65	4.11	2.69	spiA	1.38	1.00	1.37
cdcA	1.76	3.80	6.35	cdcA	2.25	1.57	3.54	cdcA	1.46	1.59	2.36
pakA	3.16	3.64	1.51	pakA	4.37	0.61	3.86	pakA	1.49	2.27	3.39
gapA	1.26	3.70	4.66	gapA	1.67	2.09	3.49	gapA	1.30	1.16	1.51
pldA	92.21	1.58	146.11	pldA	48.87	1.35	65.86	pldA	0.97	1.20	1.17
ligA	0.50	8.12	4.03	ligA	0.69	2.97	1.92	ligA	1.09	0.92	0.97
pwIA	0.75	10.31	7.77	pwIA	0.93	3.29	0.26	pwIA	0.84	0.92	0.57
rgsA	1.14	3.71	4.23	rgsA	0.82	0.47	0.88	rgsA	1.01	0.58	0.58

(b) x-fache Änderungen der Expressionswerte

Abbildung 2.7: Ergebnisse des Wilcoxon-Vorzeichen-Rangtests für N26B5

Die Ergebnisse des Wilcoxon-Vorzeichen-Rangtests sind für den Stamm N26B5 dargestellt. Ermittelt wurden jeweils die signifikanten Genexpressionsänderungen zwischen zwei Zeitpunkten der Analyse. Hier, zwischen der Dunkelkontrolle (0 h) und 4 Stunden bzw. 4 Stunden und 8 Stunden und der Dunkelkontrolle und 8 Stunden nach Start des Experimentes. (a) Änderungen, die mit einem Signifikanzniveau von 5% als signifikant hochreguliert eingestuft wurden, sind in rot dargestellt. Unter den gleichen Annahmen signifikant herunterregulierte Gene sind in grün gekennzeichnet. Gene, deren Expressionslevel sich nicht signifikant änderten, wurden nicht eingefärbt. (b) Dargestellt sind die zu (a) zugehörigen x-fachen Änderungen der Genexpressionslevel zwischen den zwei betrachteten Datensätzen.

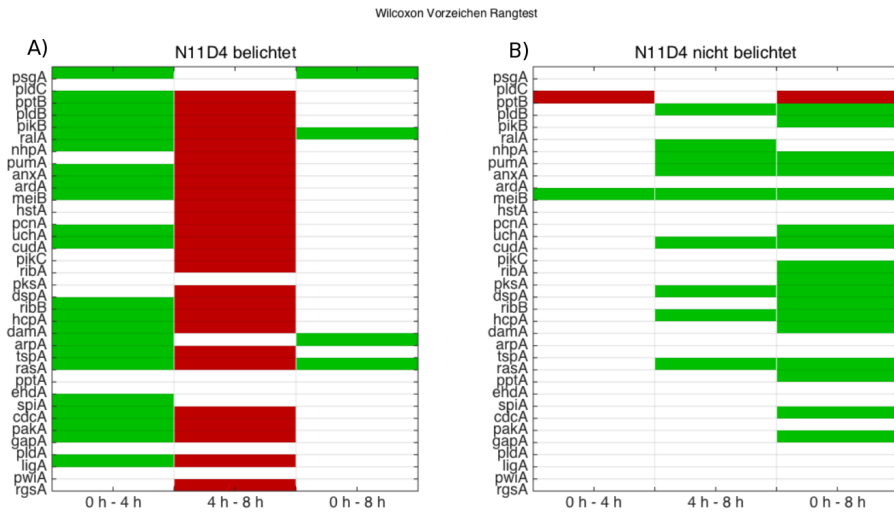
Zum Vergleich mit den vorhergehenden Analysen wurde hier der Wilcoxon-Vorzeichen-Rangtest für den Stamm N<sub>11</sub>D<sub>4</sub> durchgeführt. Es wurden sowohl belichtete, als auch unbelichtete Plasmodien untersucht. Dabei wurden die Genexpressionslevel der folgenden Zeitabschnitte verglichen: Dunkelkontrolle bis vier Stunden nach Belichtung, vier Stunden bis acht Stunden nach Belichtung und Dunkelkontrolle bis acht Stunden nach Belichtung. Die Signifikanztests wurden ebenfalls nach dem in Abb. 2.6 dargestellten Schema durchgeführt.

Die Analyseergebnisse der belichteten Plasmodien (vgl. Abbildung 2.8, A) unterschieden sich dabei sichtbar von denen der Sporulationsmutante N<sub>26</sub>B<sub>5</sub>. Für N<sub>11</sub>D<sub>4</sub> konnte im ersten Zeitschritt von der Dunkelkontrolle zu vier Stunden nach Induktion der Differenzierung ein deutliches Herunterregulieren von 22 der 35 Gene beobachtet werden, wobei keines der Expressionslevel der analysierten Gene angestiegen ist. Im zweiten Zeitschritt von vier Stunden zu acht Stunden nach Induktion wurde der entgegengesetzte Effekt beobachtet. Die Expressionslevel stiegen hier signifikant in 26 von 35 Genen an. Dieses Herunterregulieren der Transkriptmengen im ersten Zeitschritt, gefolgt von einem sich anschließenden Anstieg der Expressionslevel führt dazu, dass sich die Genexpressionsstärke über den gesamten Analysezeitraum kaum ändert. Vergleicht man die differentiell regulierten Gene beider Sporulationsmutanten über das gesamte Zeitintervall, so zeigt sich folgendes Bild. In N<sub>11</sub>D<sub>4</sub> werden ausschließlich die Gene *psgA* und *ralA* signifikant herunterreguliert, welche bereits in N<sub>26</sub>B<sub>5</sub> als sporulationsrelevant gekennzeichnet wurden. Das Gen *arpA* wird hier herunter- statt heraufreguliert und es erfolgt zusätzlich eine Herunterregulation des Gens *rasA*, die in N<sub>26</sub>B<sub>5</sub> nicht auftritt. Alle übrigen sporulationsrelevanten Gene, die in der Mutante N<sub>26</sub>B<sub>5</sub> identifiziert werden konnten, sind in N<sub>11</sub>D<sub>4</sub> nicht reguliert.

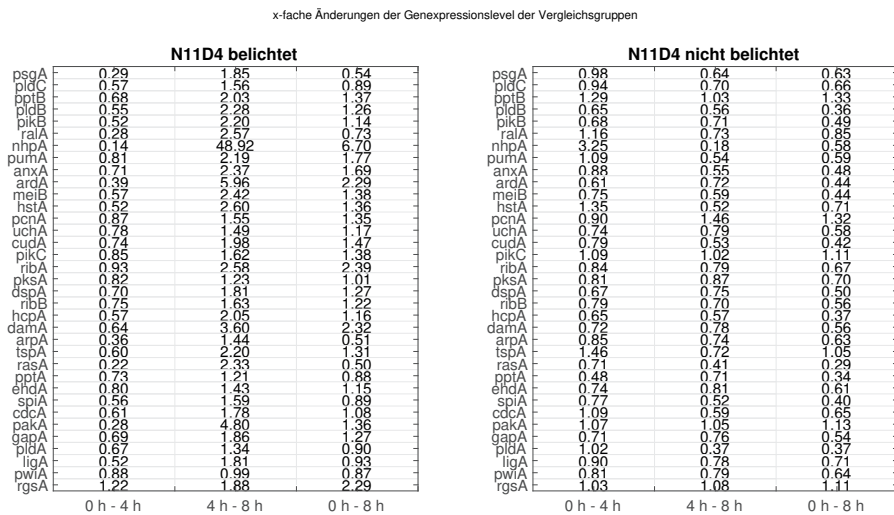
In den nicht belichteten Plasmodien desselben Stammes (vgl. Abbildung 2.8, B) konnte im ersten Zeitintervall zwischen der DK und vier Stunden in nur zwei Genen eine signifikante Änderung der Expressionslevel beobachtet werden (*pptB* und *meiB*). Eine Regulation dieser Gene lässt sich allerdings nicht in den uninduzierten Plasmodien von N<sub>26</sub>B<sub>5</sub> im selben Zeitschritt wiederfinden. Im zweiten Intervall zwischen vier und acht Stunden nach Belichtung wurden 9 von 35 Genen herunterreguliert. Abgesehen von der Herunterregulation des Gens *nhpA* lässt sich auch dieses Regulationsmuster nicht in den Genexpressionsdaten von N<sub>26</sub>B<sub>5</sub> wiederfinden. Betrachtet man den gesamten Zeitraum der Analyse, so konnte festgestellt werden, dass mit Ausnahme des Gens *pptB* in den nicht belichteten Plasmodien keines der analysierten Gene differentiell hochreguliert wurde. Es konnte lediglich eine Herunterregulation von 17 von 35 Genen beobachtet

werden, wobei das Regulationsmuster in keinem der betrachteten Gene mit dem des uninduzierten Stammes N26B5 übereinstimmt. Die für die Sporulation in der Mutante N26B5 typischen Regulationsmuster konnten in dem Stamm N11D4 weder in den belichteten noch in den unbelichteten Zellen beobachtet werden. Stattdessen zeigte sich in den belichteten Zellen bereits in den frühen Stadien nach Induktion zwar eine heftige alternative Reaktion auf den Stimulus, welche scheinbar jedoch nicht den sporulationsspezifischen Signalweg aktiviert. Möglicherweise handelt es sich bei dieser Entwicklung der Genexpressionsniveaus in der Mutante N11D4 um den in der PCA in Abb. 2.3 beschriebenen Drift der belichteten Plasmodien in den alternativen rechten oberen Bereich des PCA-Plots. Die unbelichteten Plasmodien dieses Stammes zeigen aufgrund der fehlenden Induktion mit Rotlicht nur eine geringe Änderung der Genexpression. Das ist ein Hinweis darauf, dass die sporulationsspezifische Signalkaskade in diesen Zellen nicht aktiviert wurde.





(a) Wilcoxon-Vorzeichen-Rangtest für N11D4



(b) x-fache Änderungen der Expressionswerte

Abbildung 2.8: Ergebnisse des Wilcoxon-Vorzeichen-Rangtests für N11D4

Die Ergebnisse des Wilcoxon-Vorzeichen-Rangtests sind für den Stamm N11D4 dargestellt. Ermittelt wurden jeweils die signifikanten Genexpressionsänderungen zwischen zwei Zeitpunkten der Analyse. Hier, zwischen der Dunkelkontrolle (0 h) und 4 Stunden bzw. 4 Stunden und 8 Stunden und der Dunkelkontrolle und 8 Stunden nach Start des Experimentes. (a) Änderungen, die mit einem Signifikanzniveau von 5% als signifikant hochreguliert eingestuft wurden, sind in rot dargestellt. Unter den gleichen Annahmen signifikant herunterregulierte Gene sind in grün gekennzeichnet. Gene, deren Expressionslevel sich nicht signifikant änderten, wurden nicht eingefärbt. (b) Dargestellt sind die zu (a) zugehörigen x-fachen Änderungen der Genexpressionslevel zwischen den zwei betrachteten Datensätzen.

#### 2.2.4 Vergleich der Expressionsprofile mit Wildtyp-Plasmodien zur Analyse von Regulationsunterschieden im Differenzierungsnetzwerk

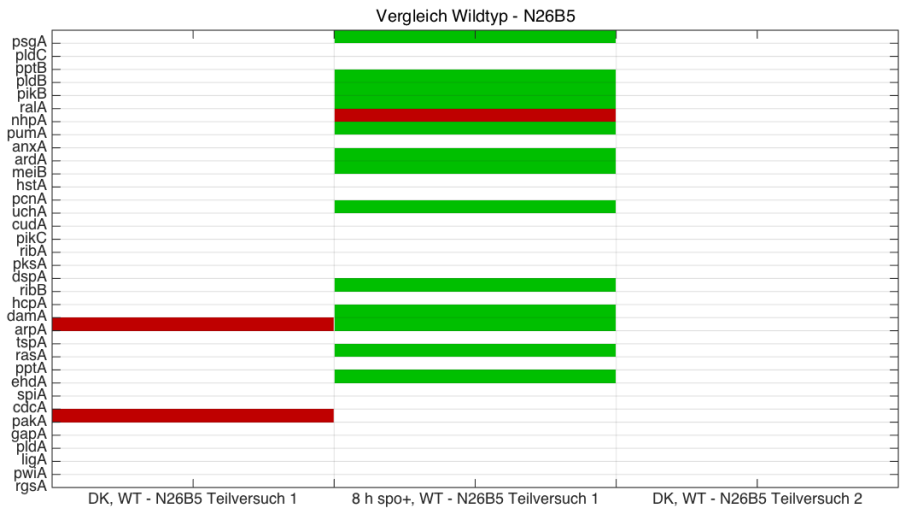
Um Unterschiede in der Genexpression zwischen den analysierten Sporulationsmutanten und dem Wildtyp von *Physarum polycephalum* herauszuarbeiten, wurde der Mann-Whitney-U-Test angewandt. Dabei wurden die Daten des Wildtyps #31 (vgl. Tabelle 5.5) und beider Mutanten an unterschiedlichen Analysezeitpunkten verglichen. Die hier betrachteten Wildtyp-Daten wurden vollständig in der Doktorarbeit von Frau Viktoria Rätzel (Rätzel, 2015) erstellt, analysiert und in dieser Arbeit lediglich zum Vergleich herangezogen.

Das experimentelle Vorgehen zur Gewinnung der Wildtyp-Daten ist identisch mit dem Setup, welches zur Gewinnung der in dieser Arbeit vorgestellten Daten der Mutantenstämme N11D4 und N26B5 verwendet wurde (vgl. Kapitel 5.8.2 und 5.9). Da unter diesen Voraussetzungen alle Plasmodien des Wildtyp-Vergleichsdatensatzes sporulierten, können die folgenden Vergleiche der Expressionslevel zwischen Wildtyp und Mutante ausschließlich zwischen den Proben der Dunkelkontrollen und der sporulierten Zellen nach 8 Stunden erfolgen. Um eine Vergleichbarkeit dieser unterschiedlichen Datensätze zu erreichen, wurden sowohl die Wildtypdaten, als auch die Daten der Mutantenstämme auf den Median ihrer Dunkelkontrollen normiert. Dabei wurde der Median für jedes Gen separat über alle im Datensatz enthaltenen Plasmodien berechnet. Die Signifikanzanalysen wurden anschließend ebenfalls nach dem in Abb. 2.6 dargestellten Schema durchgeführt. Alle hier dargestellten signifikanten Änderungen der Genexpressionslevel beziehen sich auf die Mutantenstämme.

Der Vergleich zwischen dem Wildtyp und der Sporulationsmutante N26B5 zeigte für die Dunkelkontrollen der Teilversuche #1 und #2 keine oder nur geringfügige Unterschiede in den Expressionsleveln (vgl. Abbildung 2.9). Es ist lediglich in Teilversuch #1 eine signifikante Hochregulation der Gene *arpA* und *pakA* in der Sporulationsmutante N26B5 im Vergleich zum Wildtyp zu erkennen. Die sporulierten Plasmodien zum Zeitpunkt um acht Stunden nach Belichtung weisen jedoch eine Vielzahl von Genen auf, die in der Mutante, im Vergleich zum Wildtyp, deutlich geringer exprimiert sind. Diese signifikanten Abweichungen betreffen insgesamt 14 von 35 Genen:

- herunterreguliert: *psgA*, *pldB*, *pikB*, *ralA*, *pumA*, *ardA*, *meiB*, *uchA*, *ribB*, *damA*, *arpA*, *rasA* und *ehdA*
- hochreguliert: *nhpA*.

Dabei handelt es sich bei den rot markierten Genen um jene, die in der Mutante N26B5 als sporulationsspezifisch reguliert markiert wurden.



(a) Mann-Whitney-U-Test – Vergleich N26B5 und WT

Gene	DK, N26B5 Teilversuch 1 - WT	8 h spo+, N26B5 Teilversuch 1 - WT	DK, N26B5 Teilversuch 2 - WT
psgA	0.51	1.37	0.19
pldC	1.20	1.01	0.63
pptB	1.46	0.49	0.88
pldB	0.72	0.33	0.21
pikB	1.05	0.18	0.39
ralA	1.16	0.74	0.21
nhpA	0.60	0.55	9.17
pumA	0.84	0.20	0.35
anxA	1.62	1.31	0.74
ardA	0.98	0.90	0.31
meiB	1.29	2.40	0.34
hstA	0.98	0.28	0.93
pcnA	1.00	1.09	1.04
uchA	0.54	0.85	0.16
cudA	1.45	0.74	0.67
pikC	1.00	0.43	0.68
ribA	1.42	1.25	0.21
pksA	0.74	0.74	0.34
dspA	1.54	0.89	0.53
ribB	1.71	1.17	0.49
hcpA	1.00	1.37	0.85
damA	1.53	1.33	0.30
arpA	2.28	1.11	0.64
tspA	1.00	0.93	0.88
rasA	0.92	0.18	0.29
pptA	6.92	5.40	2.61
ehdA	1.07	0.79	0.32
spiA	0.73	0.84	0.74
cdcA	2.58	4.17	1.05
pakA	1.57	3.92	0.47
gapA	1.16	1.03	0.75
pldA	1.00	12.20	0.66
ligA	1.03	0.80	0.70
pwiA	0.78	1.37	0.64
rgsA	1.21	0.42	1.05

(b) x-fache Änderungen der Expressionswerte

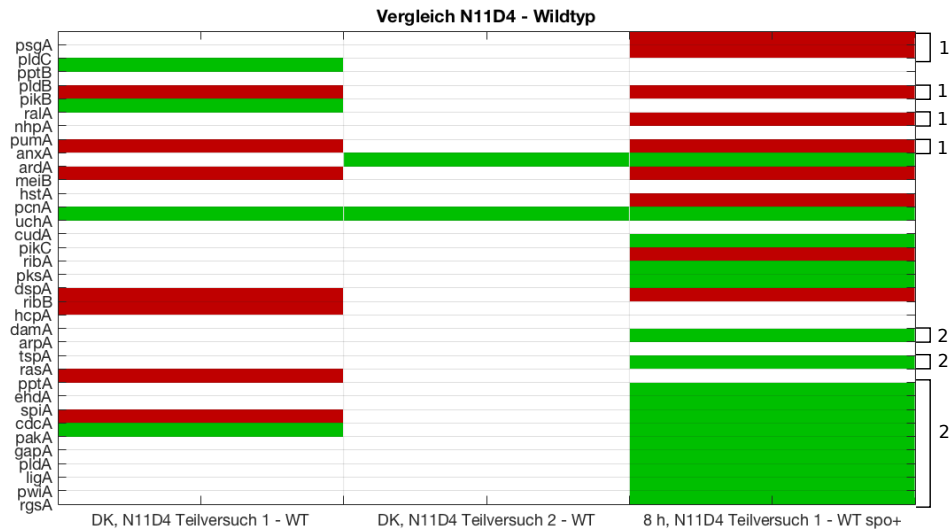
Abbildung 2.9: Ergebnisse des Mann-Whitney-U-Tests zum Vergleich der Mutante N26B5 mit dem Wildtyp

Die Ergebnisse des U-Tests sind hier für den Vergleich der Expressionslevel zwischen der Mutante N26B5 und dem Wildtyp dargestellt. Untersucht wurden die Unterschiede der Dunkelkontrolle und der Proben um 8 h nach Belichtung. (a) Änderungen in der Mutante N26B5, die mit einem Signifikanzniveau von 5% als signifikant hochreguliert eingestuft wurden, sind in rot dargestellt. Unter den gleichen Annahmen signifikant herunterregulierte Gene in N26B5 sind in grün gekennzeichnet. Gene, deren Expressionslevel sich zwischen Mutante und Wildtyp nicht signifikant änderten, wurden nicht eingefärbt. (b) Dargestellt sind die zu (a) zugehörigen x-fachen Änderungen der Genexpressionslevel zwischen den zwei betrachteten Stämmen.

Weiterhin wurde ein Vergleich der Wildtyp-Daten mit den Daten der Mutante N11D4 durchgeführt. Dabei wurden jeweils die Dunkelkontrollen des Stammes N11D4 aus beiden Teilversuchen mit den Dunkelkontrollwerten des Wildtyps verglichen. Weiterhin wurde ein Vergleich der  $spo^-$  Zellen von N11D4 zum Zeitpunkt acht Stunden nach Belichtung mit den  $spo^+$  Zellen des Wildtyps zum Zeitpunkt acht Stunden nach Belichtung durchgeführt.

Die Vergleiche der beiden Dunkelkontrollen des Stammes N11D4 mit dem Wildtyp zeigen trotz identischer experimenteller Handhabung deutliche Unterschiede in ihren Expressionsniveaus auf (vgl. Abbildung 2.10). In Teilversuch 1 konnte eine Vielzahl von Genen ermittelt werden, deren Expressionslevel sich signifikant vom Wildtyp-Niveau unterscheidet. Die Gene *pikB*, *anxA*, *meiB*, *ribB*, *hcpA*, *pptA* und *cdcA* wurden in dieser Analyse in der Mutante N11D4 als signifikant erhöht eingestuft, wobei die Gene *pptB*, *ralA*, *uchA* und *pakA* als signifikant erniedrigt markiert wurden. Die Ergebnisse der Signifikanzanalyse für den Vergleich der Daten aus Teilversuch 2 ergaben lediglich eine signifikante Erniedrigung der Expressionslevel der Gene *ardA* und *uchA* in der Mutante N11D4 im Vergleich zum Wildtyp. Diese deutlichen Unterschiede in den Genexpressionsleveln der beiden Dunkelkontrollen könnten durch das experimentelle Setup zustande gekommen sein. Die Probenahme wurde mit den Plasmodien aus Teilversuch 1 (N26B5 (♂) und N11D (DK)) gestartet. Mit einem Zeitversatz von zwei Stunden wurde anschließend Teilversuch 2 (N11D4 (♂) und N26B5 (DK)) gestartet (vgl. Abb. 2.1). Die Unterschiede in der Genexpression könnten durch unterschiedliche Kultivierungsbedingungen, bedingt durch die Probenahme der Plasmodien aus Teilversuch 1 oder die längere Inkubationsdauer der Zellen aus Teilversuch 2, entstanden sein.

Die Vergleiche der belichteten,  $spo^-$ -Plasmodien des Stammes N11D4 und der belichteten,  $spo^+$ -Plasmodien des Wildtyps zum Zeitpunkt acht Stunden nach Belichtung zeigen eine Regulation der hier betrachteten Gene, die sich gegensätzlich zu den sporulierten Plasmodien des Wildtyps verhält. So sind zum Beispiel die Gene *psgA*, *plda*, *pikB*, *nhpA* und *anxA* in N11D4 im Vergleich zum Wildtyp signifikant erhöht (vgl. Abb. 2.10, markiert mit "1"), wohingegen die Gene *arpA*, *rasA*, *ehdA*, *spiA*, *cdcA*, *pakA*, *gapA*, *plda*, *ligA*, *pwiA* und *rgsA* im Vergleich zu den Wildtypplasmodien signifikant erniedrigt sind (vgl. Abb. 2.10, markiert mit "2"). Diese Analysen belegen, dass sich sowohl die Genexpressionswerte der Dunkelkontrolle in der Mutante N11D4, als auch die Genexpressionswerte zum Zeitpunkt um acht Stunden nach Belichtung, deutlich von denen des Wildtyps unterscheiden. Diese signifikanten Unterschiede könnten ursächlich mit der Sporulationsdefizienz der Mutante N11D4 im Zusammenhang stehen.



(a) Mann-Whitney-U-Test – Vergleich N<sub>11</sub>D<sub>4</sub> und WT

Gene	DK, N11D4 Teilversuch 1 - WT	DK, N11D4 Teilversuch 2 - WT	8 h, N11D4 Teilversuch 1 - WT spo+
psgA	0.95	0.32	1.76
pldC	2.07	1.46	21.48
pptB	0.52	0.58	0.55
pldB	0.84	0.44	0.85
pikB	2.50	1.24	5.14
ralA	0.46	0.30	0.78
nhpA	0.39	0.54	11.86
pumA	1.30	0.61	0.95
anxA	3.03	1.69	15.65
ardA	0.96	0.51	0.71
meiB	1.40	0.70	4.16
hstA	0.32	0.40	0.54
pcnA	0.80	0.77	2.17
uchA	0.27	0.15	0.44
cudA	1.80	0.88	1.56
pikC	0.79	0.66	0.49
ribA	1.01	0.34	1.86
pksA	0.80	0.49	0.38
dspA	1.24	0.74	0.57
ribB	2.22	1.16	1.40
hcpA	2.00	1.28	1.65
damA	1.24	0.41	1.10
arpA	1.52	1.22	0.13
tspA	0.74	0.79	0.76
rasA	1.37	1.12	0.13
pptA	8.48	3.64	0.55
ehdA	0.95	0.48	0.25
spiA	2.72	1.87	0.65
cdcA	1.68	1.19	0.33
pakA	0.36	0.30	0.09
gapA	2.16	1.64	0.39
pldA	0.59	0.50	0.04
ligA	0.96	0.72	0.13
pwIA	0.76	0.64	0.13
rgsA	0.53	0.49	0.09

(b) x-fache Änderungen der Expressionswerte

Abbildung 2.10: Ergebnisse des Mann-Whitney-U-Tests zum Vergleich der Mutante N<sub>11</sub>D<sub>4</sub> mit dem Wildtyp

Die Ergebnisse des U-Tests sind hier für den Vergleich der Expressionslevel zwischen der Mutante N<sub>11</sub>D<sub>4</sub> und dem Wildtyp dargestellt. Untersucht wurden sowohl die Genexpressionsunterschiede der Dunkelkontrollen als auch die Unterschiede zwischen den belichteten, nicht sporulierten Zellen von N<sub>11</sub>D<sub>4</sub> zu acht Stunden nach Induktion und den sporulierten Zellen des Wildtyps nach acht Stunden. (a) Änderungen in der Mutante N<sub>11</sub>D<sub>4</sub>, die mit einem Signifikanzniveau von 5% als signifikant hochreguliert eingestuft wurden, sind in rot dargestellt. Unter den gleichen Annahmen signifikant herunterregulierte Gene in N<sub>11</sub>D<sub>4</sub> sind in grün gekennzeichnet. Gene, deren Expressionslevel sich zwischen Mutante und Wildtyp nicht signifikant änderten, wurden nicht eingefärbt. (b) Dargestellt sind die zu (a) zugehörigen x-fachen Änderungen der Genexpressionslevel zwischen den zwei betrachteten Stämmen.

### 2.3 ZEITAUFGELÖSTE SOMATISCHE KOMPLEMENTATION AN SPORULATIONS-DEFIZIENTEN MUTANTEN

Der Aufbau der zellulären Differenzierungskontrollnetzwerke ist vermutlich sehr komplex, wodurch sich die realistische Modellierung der regulatorischen Netzwerke als schwierig gestaltet. Aus diesem Grund kommt zur praktischen Rekonstruktion der intrazellulären Signalwege meist ein breites Spektrum der Methoden der klassischen Genetik zur Anwendung. Eine Möglichkeit Differenzierungskontrollnetzwerke zu untersuchen, sind zeitaufgelöste somatische Komplementationsanalysen (Marwan, 2003). Dabei verschmelzen zwei unterschiedliche Mutanten eines Organismus durch Berührung und bilden eine Fusionszelle. Durch die sehr starke Protoplasmaströmung vermischen sich nach der Fusion die Zytoplasmen der beiden Fusionspartner. Dadurch können sich die in beiden Fusionspartnern unterschiedlichen genetischen Defekte in der fusionierten Zelle ergänzen (komplementieren), wodurch dann die Ausprägung des Wildtyp-Phänotypes erfolgen kann. Die Erzeugung des Wildtyp-Phänotypes hängt dabei natürlich davon ab, welche Mutanten miteinander fusioniert werden. Dieses Verfahren ermöglicht die Rekonstruktion des zugrundeliegenden Differenzierungsnetzwerkes aus einem vollkommen neuen Blickwinkel. Der Komplementationszeitpunkt in einem solchen Versuch kann beliebig variiert werden und somit kann der Weg, den das eingespeiste Signal durch das Netzwerk nimmt, Schritt für Schritt nachvollzogen werden (Marwan, 2003).

Zur Durchführung dieser Analysen wurden die Zellen der Mutantenstämme N26B5 und N11D4 wie in Kapitel 2.3.1 beschrieben, induziert, fusioniert und das Zellmaterial für die eXpress-Profiling-Analysen geerntet und eingefroren. Aus dem in Abbildung 2.11 beschriebenen experimentellen Setup wurden die in Tabelle 2.3 aufgeführten Proben aus den resultierenden Fusionsplasmoiden entnommen, wobei beide Hälften der Fusionszelle separat geerntet wurden.

Tabelle 2.3: Isolierte Proben für Fusionsanalysen

	Stamm	FR 30 min	Fusion mit	Fusion in h nach FR	Probenahme in h nach Fusion
Teilversuch 1					
	N26B5	Ja	N11D4	4	4
	N11D4	Nein	N26B5	4	4
Teilversuch 2					
	N11D4	Ja	N26B5	4	4
	N26B5	Nein	N11D4	4	4

Die Analyse der Genexpressionslevel dieser Fusionsplasmodien sollte Aufschluss darüber geben, inwiefern die durch die Mutationen verursachten Defekte in den Signalkaskaden der verwendeten Stämmen durch Komplementationeffekte überbrückt werden können.

### 2.3.1 Probenahme für Fusionsanalysen

In diesem experimentellen Setup wurde mit zwei Sporulationsmutanten von *P. polycephalum*, N25B6 und N11D4, gearbeitet. Zur Induktion der Sporulation wurde Stamm A (Stamm N26B5, siehe Abbildung 2.11) für 30 min mit dunkelrotem Licht ( $\lambda \geq 700$  nm, 13 Wm<sup>2</sup>), wie in Marwan, 1998 beschrieben, belichtet, während Stamm B (Stamm N11D4, vgl. Abbildung 2.11) uninduziert verblieb. Vier Stunden nach der Belichtung wurde von den Plasmodien beider Stämme je ein Achtel samt Agar von der Petrischale entnommen und auf einer neuen Petrischale zur Fusion zusammengebracht. Dabei wurden die beiden Agarstücke relativ auf eine Weise zueinander verschoben, dass große Adern der beiden Plasmodien möglichst nahe zusammengebracht wurden. Dadurch sollte erreicht werden, dass die Fusion möglichst schnell erfolgte. Acht Stunden nach Belichtung (bzw. vier Stunden nach Fusion) wurden die Fusionsplasmodien an der ursprünglichen Fusionsstelle getrennt und das Zellmaterial separat für die RNA-Isolation abgenommen.

Zusätzlich wurde ein Kontrollexperiment durchgeführt. In diesem Experiment wurde der Stamm N11D4 belichtet und Stamm N26B5 verblieb unbelichtet.

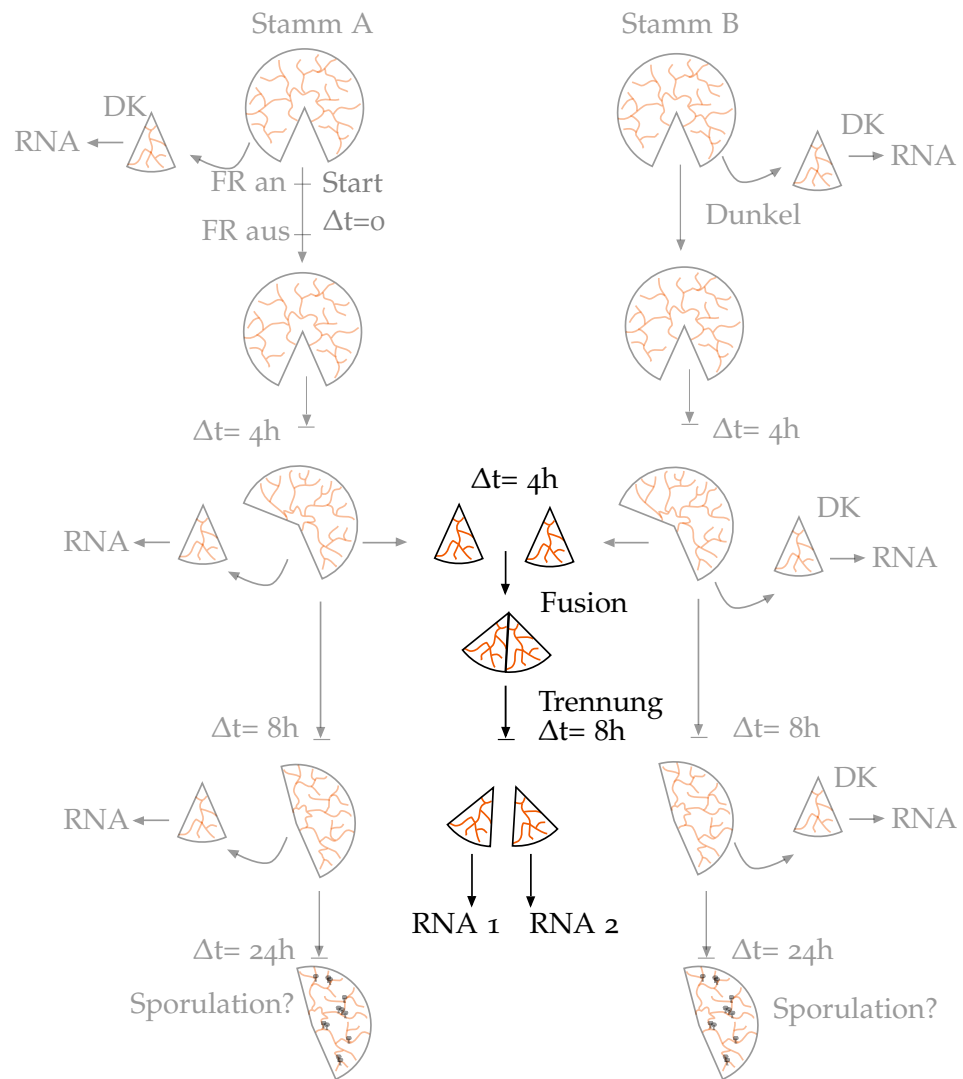


Abbildung 2.11: Probenahmeschema für Fusionsanalysen

Mitte: Dargestellt ist das Probenahmeschema zur Analyse von Fusionsanalysen. Rechts und links (transparent): Probenahmeschema für Zeitreihenanalysen, vgl. Kapitel 2.2. Das komplette Versuchsschema ist in Kapitel 5.9, Abbildung 5.1 dargestellt.

### 2.3.2 Hauptkomponentenanalyse an Fusionsplasmidien

Zur Untersuchung des Genexpressionsverhaltens der Fusionsplasmidien wurde eine Hauptkomponentenanalyse (vgl. Kap. 5.15.3) durchgeführt, um das allgemeine Verhalten der Zellen im dimensionsreduzierten Zustandsraum betrachten zu können.

Die Analyse zeigte deutliche Unterschiede im Verhalten der Fusionsplasmidien aus Teilversuch #1 und Teilversuch #2. Dabei setzten sich die Fusionsplasmidien in Teilversuch #1 aus einem Teil des belichte-



ten ( $\frac{1}{2}$ ) Stammes N26B5 und dem unbelichteten (DK) Stamm N11D4 zusammen (vgl. Abbildung 2.12, 1A und 2A). In Teilversuch #2 wurde die Mutante N11D4 belichtet und anschließend mit einem Teil der uninduzierten Mutante N26B5 fusioniert. Es konnte beobachtet werden, dass sich die berechneten Daten der Fusionszellen aus Teilversuch #1 deutlich stärker im PCA-Plot auf einen Punkt fokussierten als die Fusionszellen des Umkehrversuches (vgl. Abbildung 2.12, 1B und 2B). Die Fokussierung der Datenpunkte der belichteten Zellen wurde bereits in den Proben des Stammes N26B5 in Kapitel 2.2.2 beobachtet. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass das Verhalten der Fusionsplasmodien nach Synchronisation der Zellkerne dem Expressionslevel der Mutante N26B5 deutlich ähnlicher ist als dem der Mutante N11D4.

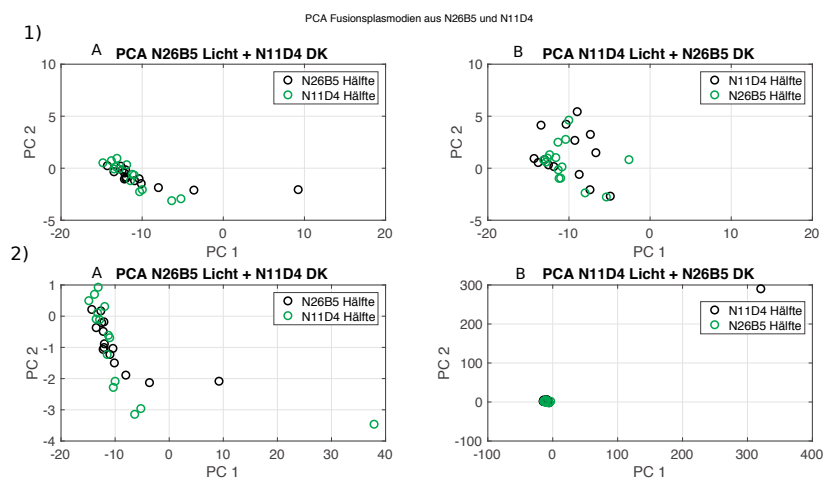


Abbildung 2.12: Hauptkomponentenanalyse für Fusionsplasmodien

Dargestellt sind die in der Hauptkomponentenanalyse berechneten Loadings der Fusionsplasmodien für beide Teilversuche. Die belichtete Fusionshälfte ist jeweils in schwarz, die unbelichtete in grün dargestellt. Die hier abgebildeten Datenpunkte entstammen derselben PCA-Analyse. 1) Dargestellt ist der Bereich, in dem die meisten Datenpunkte liegen. 2) Dargestellt sind alle Datenpunkte der Analyse. A) Abgebildet sind die Datenpunkte der Fusionsanalyse mit N26B5 $\frac{1}{2}$  + N11D4 (DK). B) Abgebildet sind die Datenpunkte der Fusionsanalyse aus N11D4 $\frac{1}{2}$  + N26B5 (DK).

### 2.3.3 Differentielle Ausprägung von Genexpressionszuständen an Fusionsplasmodien

Die Fusion zweier Sporulationsmutanten des Organismus *Physarum polycephalum* kann mit einer spontanen Synchronisation der Zellkernpopulationen beider Fusionspartner und somit mit der Entstehung eines einheitlichen Genexpressionslevels in beiden Teilen des konstruierten Heterokaryons verbunden sein (Walter u. a., 2013).

Es sollte nun überprüft werden, inwiefern die zeitaufgelöste somatische Komplementation der beiden untersuchten Mutanten möglich ist und in welchem Maße sich die Genexpressionslevel der Fusionsplasmodien von denen der Ausgangsplasmodien unterscheiden. Dazu wurden die Genexpressionsdaten der beiden Hälften eines Fusionsplasmodiums mit den Genexpressionsdaten der Plasmodien verglichen, aus denen sich das spezifische Fusionsplasmodium zusammensetzt (vgl. Kapitel 2.2). Diese Plasmodien werden weiterhin als Ausgangsplasmodien bezeichnet. Es wurden die Genexpressionsdaten der Ausgangsplasmodien zum Zeitpunkt acht Stunden nach Induktion verwendet. Während der Durchführung von Genexpressionsanalysen kann es aufgrund der kleinen Pipettierolumina zu Pipettierungenauigkeiten kommen. Um diese Fehler vor der Analyse auszugleichen, wurden sowohl die Transkriptmengen der Fusionshälften, als auch die Transkriptmengen der Ausgangsplasmodien, normiert. Da selbst Referenzgene wie *ribB*, die während der Sporulation kaum differentiell reguliert werden, in ihren Transkriptmengen schwanken können, wurde für jedes analysierte Plasmodium der Median über alle 35 Gene ermittelt. Anschließend wurden die Transkriptmengen dieser 35 Gene für jedes Plasmodium auf den zuvor berechneten, spezifischen Median normiert. Um sämtliche Pipettier- und Messungenauigkeiten auszugleichen, wurde eine zweite Normierung durchgeführt. Dabei wurden die Daten in Gruppen eingeteilt, die sich jeweils aus den beiden Hälften einer Fusionszelle und den Expressionsdaten der Fusionszellen (acht Stunden nach Induktion) zusammensetzten. Es wurde nun der Median für jedes Gen über alle Mitglieder der jeweiligen Gruppe gebildet und jedes Gen auf seinen spezifischen Median normiert. Die so erhaltenen relativen Transkriptmengen von beiden Hälften des Fusionsplasmodiums und der beiden Ausgangsplasmodien wurden anschließend in den Abbildungen 2.14 bis 2.19 aufgetragen.

Für den möglichen Ausgang eines solchen Komplementationsexperiments wurden zwei unterschiedliche Szenarien erwartet. Im Falle eines erfolglosen Fusionsversuches ohne spontane Synchronisation der Expressionslevel der beiden Fusionshälften wurde erwartet, dass sich die Transkriptmengen der beiden Teile des Fusionsplasmodiums nahezu identisch wie die jeweiligen Ausgangsplasmodien verhalten,

aus denen das fusionierte Plasmodium erzeugt wurde (vgl. Abbildung (2.13), C). Im Fall einer erfolgreichen Fusion der Mutantenstämme würde man erwarten, dass sich die Expressionslevel der zwei Hälften des Heterokaryons wie eine Mischung aus den Transkriptmengen der Ausgangsplasmodien verhalten und sich voneinander kaum unterscheiden (vgl. Abbildung (2.13), A).

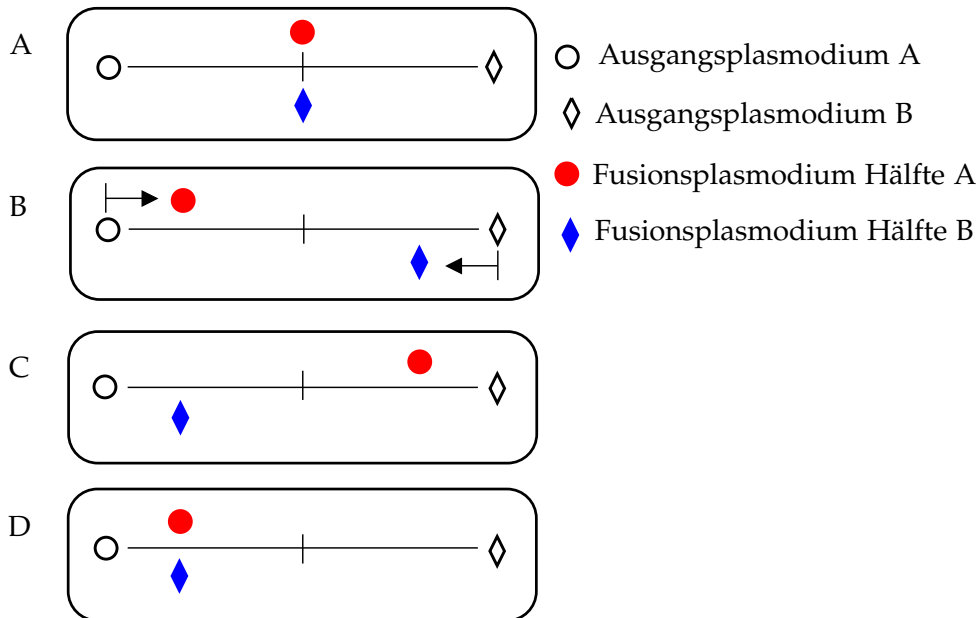


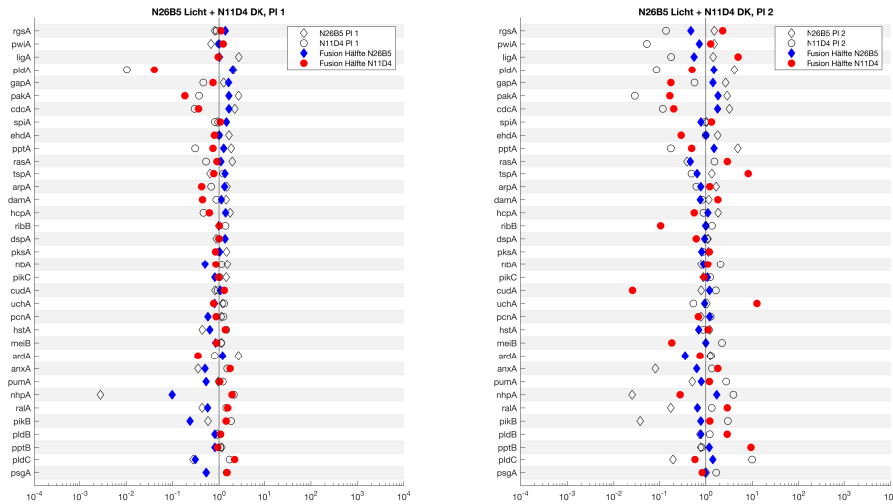
Abbildung 2.13: Genexpressionszustände in Fusionsplasmodien

*Dargestellt sind die unterschiedlichen Genexpressionszustände in Fusionsplasmodien. A): Die Hälften des Fusionsplasmodium verhalten sich wie eine Mischung der Transkriptmengen ihrer Ausgangsp. B) Die Transkriptmengen der Fusionsplasmodien verhalten sich nahezu identisch zu den Transkriptmengen der Ausgangsp. Es fand keine Fusion statt oder der Zustand der Mischung wurde noch nicht erreicht. C) Die Transkriptmengen der Fusionsplasmodienhälften unterscheiden sich deutlich voneinander und entsprechen nahezu den Expressionswerten des jeweils anderen Ausgangsp. Diesem Effekt könnte eine Beeinflussung der Fusionspartner zugrunde liegen. D) Die Expressionslevel der Fusionsplasmodienhälften sind nahezu identisch, nähern sich jedoch den Transkriptmengen eines der beiden Ausgangsp. an. Dieser Effekt lässt auf eine Dominanz eines der beiden Fusionspartner schließen.*

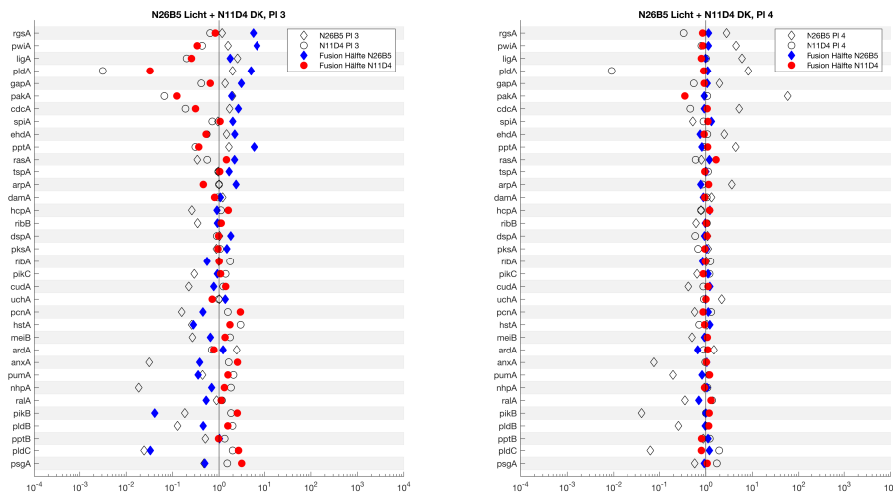
Nach Aufbereitung der RNA-Proben und Quantifizierung der Transkriptmengen konnte eine eventuell vorhandene Unterschiedlichkeit der Expressionszustände in den analysierten Fusionsplasmodien beobachtet werden. In Abbildung 2.16 (a), Pl 13 ist ein Beispiel für einen erfolglosen Fusionsversuch dargestellt. Es ist deutlich zu erkennen, dass sich die Expressionslevel der beiden Fusionshälften (rot, blau) stark in ihrer Ausprägung voneinander unterscheiden, wobei sie eine

sehr große Ähnlichkeit zu ihren jeweiligen Ausgangsplasmodien (schwarz) aufwiesen. Ein anderes Szenario zeigt Abbildung 2.15 (a), Pl 8. Hier sind die Expressionslevel der Fusionshälften nahezu identisch und scheinen einen Mittelwert aus den Transkriptmengen der Ausgangsplasmodien einzunehmen. Dieses Ergebnis deutet auf eine erfolgreiche Fusion und somit eine anschließende Synchronisation der Zellkernpopulationen beider Fusionspartner hin. Somit konnte gezeigt werden, dass die somatische Komplementation mit den hier verwendeten Sporulationsmutanten prinzipiell analysierbar wäre und ein solches experimentelles Setup in weiteren Analysen zur Rekonstruktion des Differenzierungsnetzwerkes in *Physarum polycephalum* genutzt werden kann.

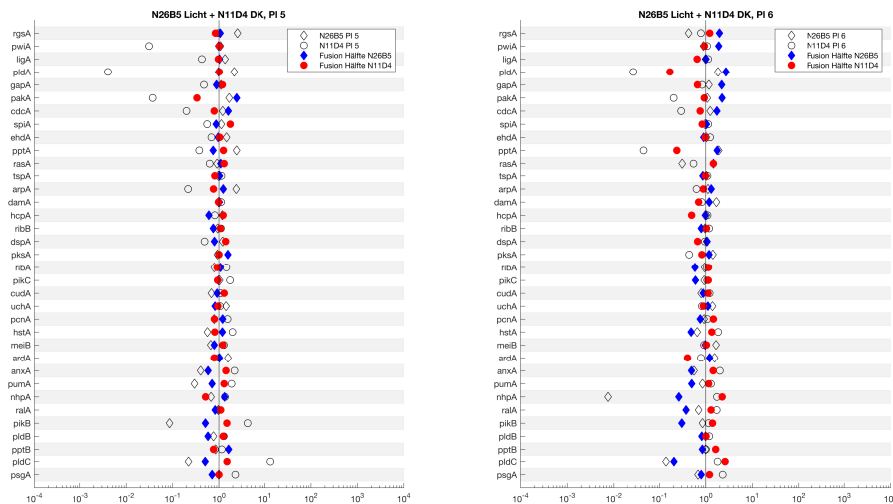
Die weitergehende Analyse der Fusionsplasmodien zeigte weitere Genexpressionszustände, die die untersuchten Fusionszellen einnehmen konnten. In Abbildung 2.14 (b), Pl 4 ist exemplarisch eines der Fusionsexperimente dargestellt, in denen erneut deutlich die Synchronisation der Zellkerne und die damit verbundene Anpassung der Expressionslevel beider Fusionshälften zu erkennen ist. Jedoch entspricht das Expressionsniveau der Fusionshälften nicht wie bisher beobachtet einer exakten Mischung der Expressionslevel der Ausgangsplasmodien. Vielmehr ähnelt das Verhalten in diesen Zellen dem des unbelichteten Stammes N11D4. Weiterhin konnten in den analysierten Fusionszellen solche beobachtet werden, die in ihrer Genexpression dem belichteten Stamm N26B5 ähnelten (vgl. Abbildung 2.15, (b), Pl 10). Diese Analyseergebnisse lassen darauf schließen, dass die Fusionszellen, die in den hier beschriebenen experimentellen Setups konstruiert wurden, kein einheitliches Expressionsverhalten nach der Fusion ausweisen. Vielmehr ist die Expression der hier analysierten Gene von Plasmodium zu Plasmodium deutlich verschieden, wobei es auch hier mehrere stabile Zustände zu geben scheint, in denen die Expressionslevel der Fusionszellen nach erfolgreicher Synchronisation der Zellkernpopulationen verweilen können (vgl. Abbildung 2.13).



(a) Genexpressionsunterschiede in Fusionsplasmodium 1 & 2



(b) Genexpressionsunterschiede in Fusionsplasmodium 3 & 4



(c) Genexpressionsunterschiede in Fusionsplasmodium 5 & 6

Abbildung 2.14: Genexpressionsunterschiede in Fusionsplasmodien N26B5 (♀) + N11D4 (DK)

*Dargestellt sind die normierten Transkriptmengen der beiden Hälften des Fusionsplasmodiums zuzüglich der Daten der Ausgangsplasmodien. Die Fusionsplasmodienhälften sind in rot bzw. blau und die Transkriptmengen der Ausgangsplasmodien in schwarz dargestellt.*

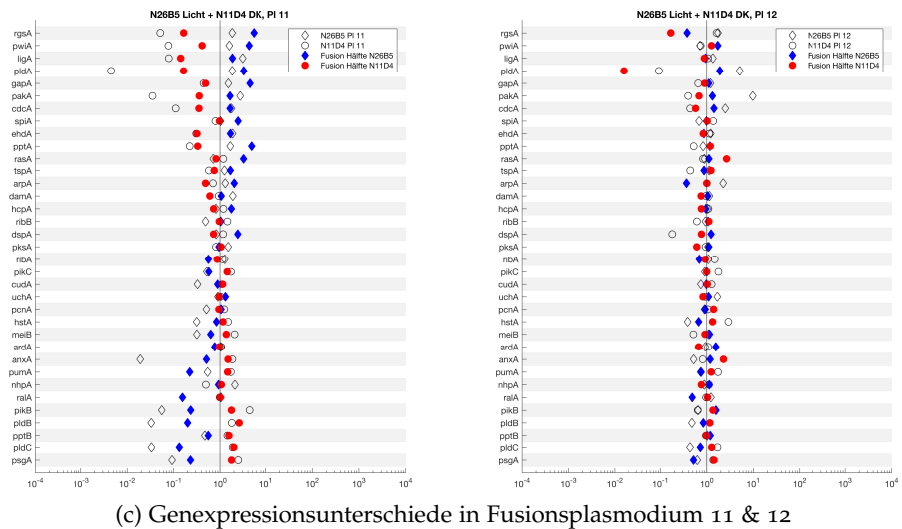
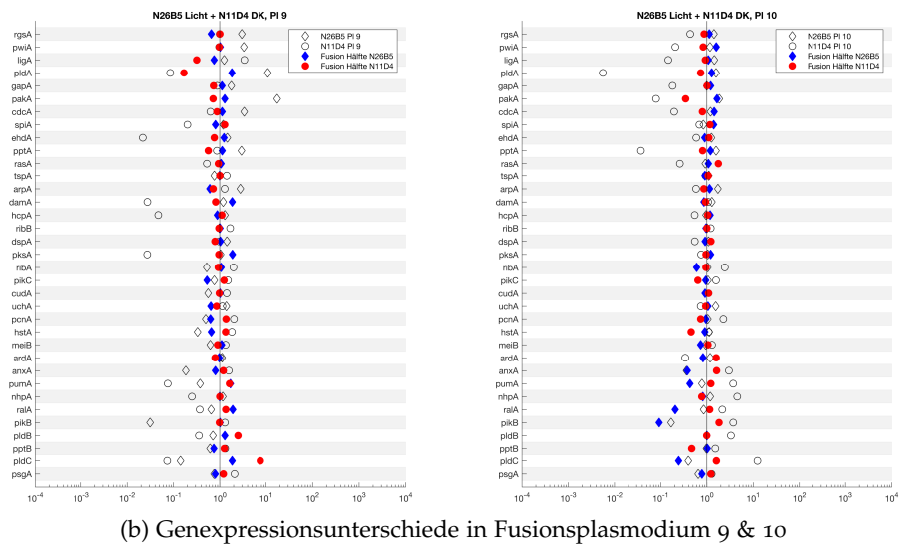
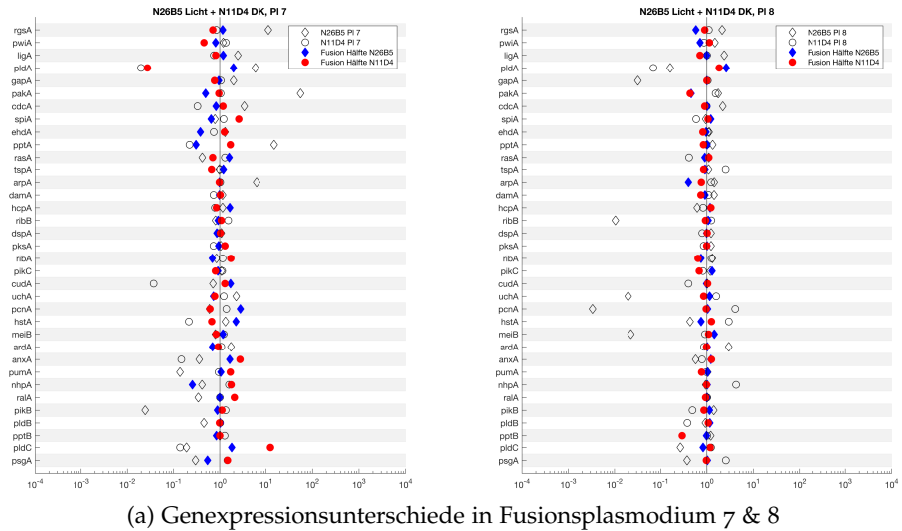
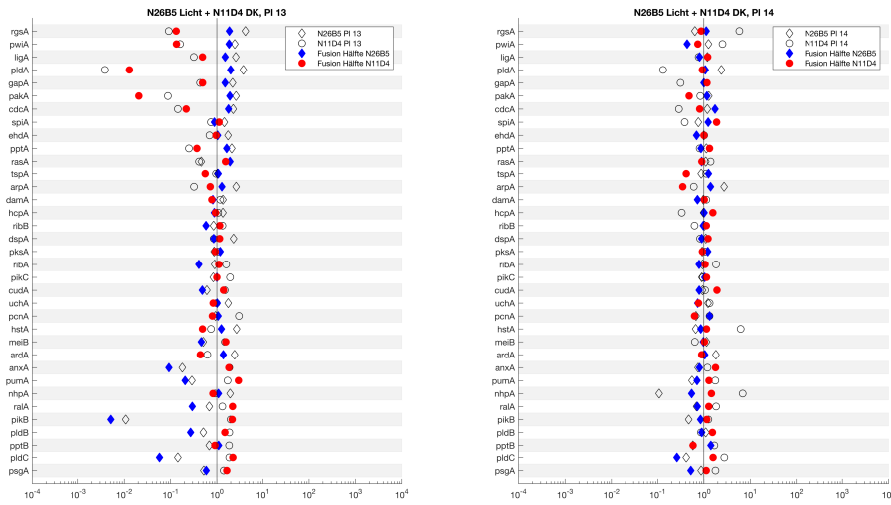
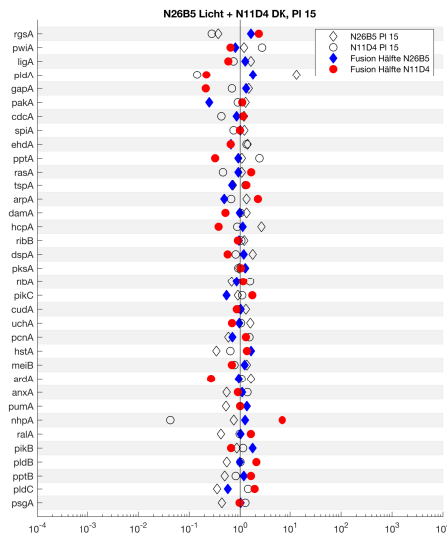


Abbildung 2.15: Genexpressionsunterschiede in Fusionsplasmodien N26B5 (♀) + N11D4 (DK)

Dargestellt sind die normierten Transkriptmengen der beiden Hälften des Fusionsplasmodiums zuzüglich der Daten der Ausgangsplasmodien. Die Fusionsplasmodienhälften sind in rot bzw. blau und die Transkriptmengen der Ausgangsplasmodien in schwarz dargestellt.



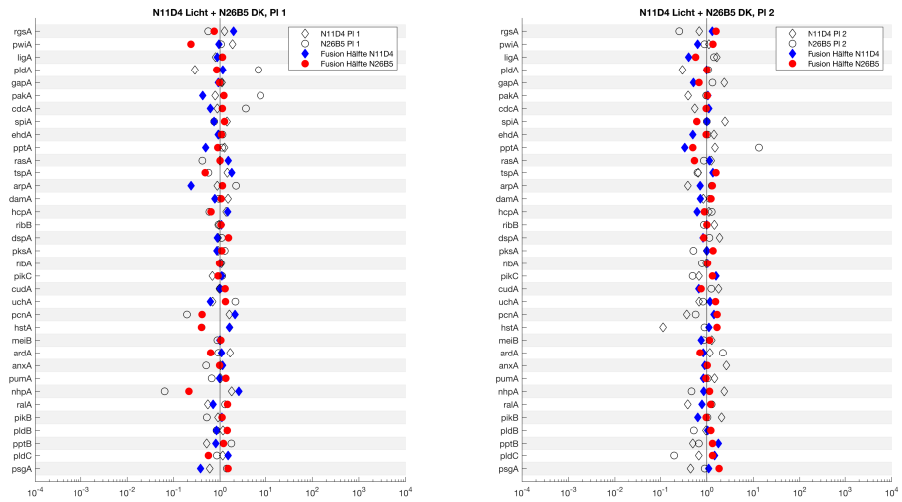
(a) Genexpressionsunterschiede in Fusionsplasmodium 13 & 14



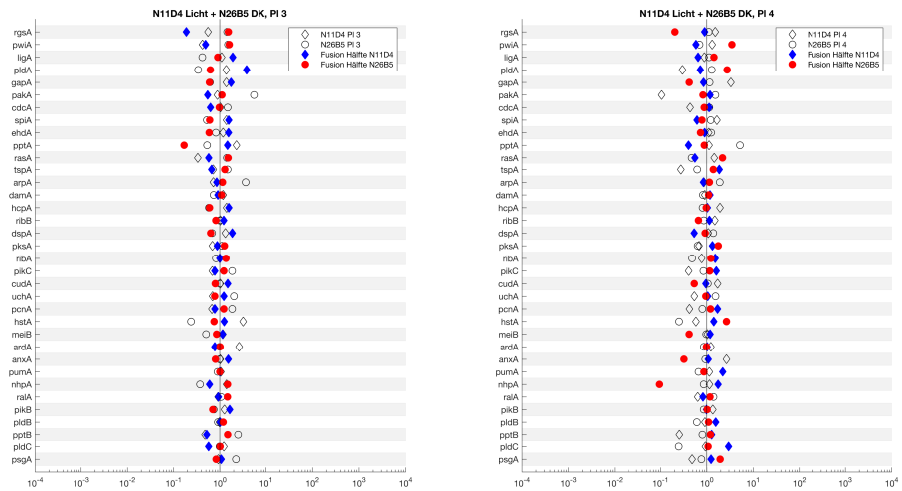
(b) Genexpressionsunterschiede in Fusionsplasmodium 15

Abbildung 2.16: Genexpressionsunterschiede in Fusionsplasmodien N26B5 (♀) + N11D4 (DK)

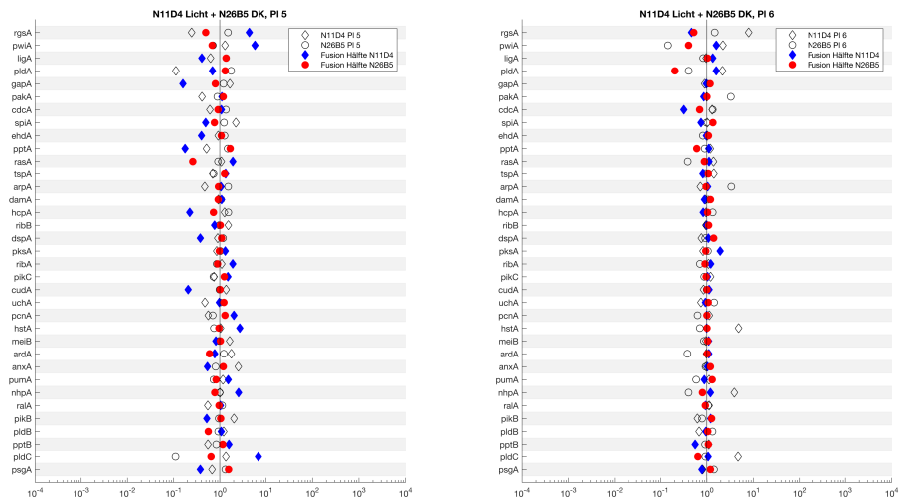
Dargestellt sind die normierten Transkriptmengen der beiden Hälften des Fusionsplasmodiums zuzüglich der Daten der Ausgangsplasmodien. Die Fusionsplasmodienhälften sind in rot bzw. blau und die Transkriptmengen der Ausgangsplasmodien in schwarz dargestellt.



(a) Genexpressionsunterschiede in Fusionsplasmodium 1 & 2



(b) Genexpressionsunterschiede in Fusionsplasmodium 3 & 4

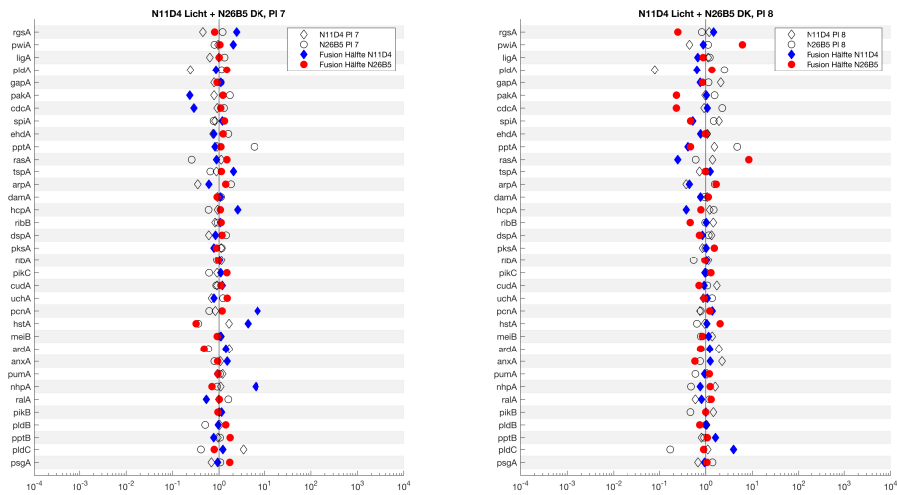


(c) Genexpressionsunterschiede in Fusionsplasmodium 5 & 6

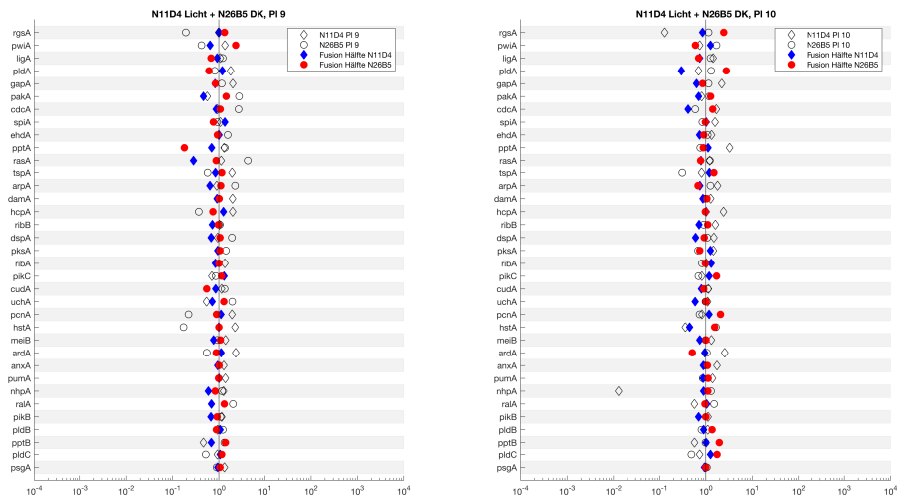
Abbildung 2.17: Genexpressionsunterschiede in Fusionsplasmodium N11D4 (♢) + N26B5 (DK)

Dargestellt sind die normierten Transkriptmengen der beiden Hälften des Fusionsplasmodiums zuzüglich der Daten der Ausgangsplasmodiumen. Die Fusionsplasmodiumhälften sind in rot bzw. blau und die Transkriptmengen der Ausgangsplasmodiumen in schwarz dargestellt.

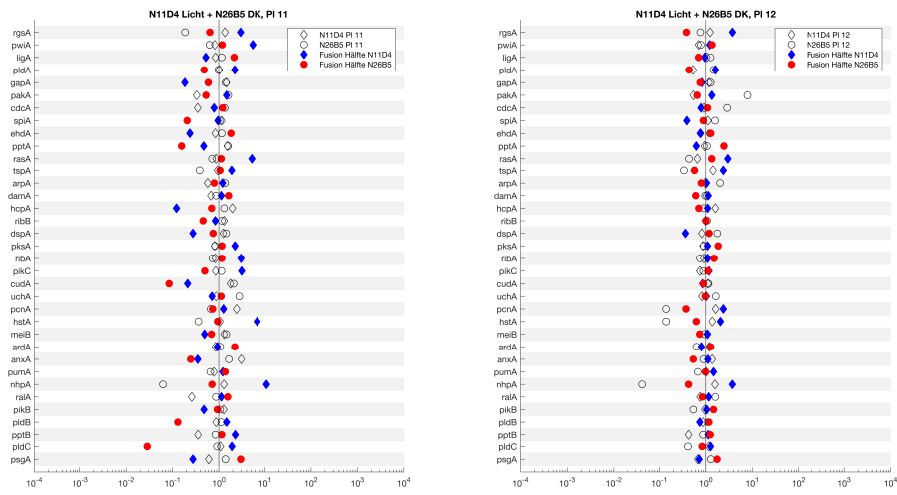




(a) Genexpressionsunterschiede in Fusionsplasmodium 7 & 8



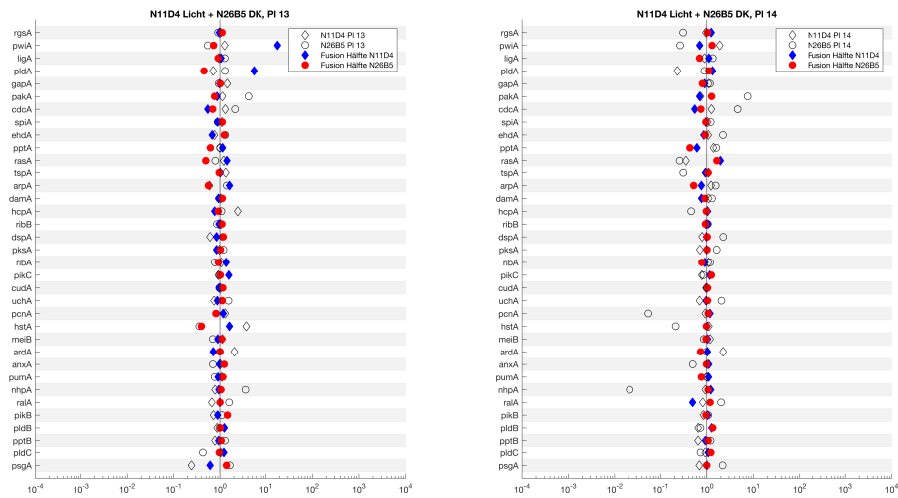
(b) Genexpressionsunterschiede in Fusionsplasmodium 9 & 10



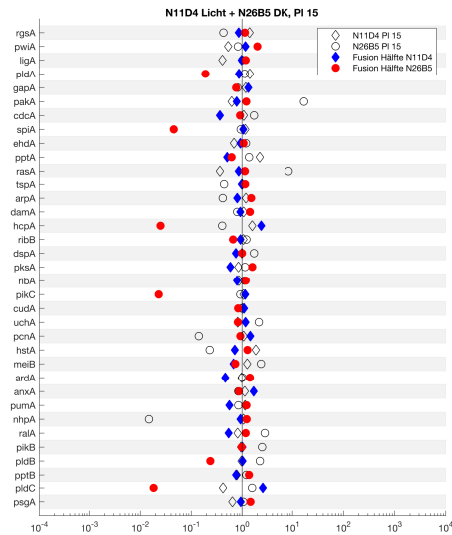
(c) Genexpressionsunterschiede in Fusionsplasmodium 11 & 12

Abbildung 2.18: Genexpressionsunterschiede in Fusionsplasmodien N11D4 (♢) + N26B5 (DK)

Dargestellt sind die normierten Transkriptmengen der beiden Hälften des Fusionsplasmodiums zuzüglich der Daten der Ausgangsplasmodien. Die Fusionsplasmodienhälften sind in rot bzw. blau und die Transkriptmengen der Ausgangsplasmodien in schwarz dargestellt.



(a) Genexpressionsunterschiede in Fusionsplasmodium 13 & 14



(b) Genexpressionsunterschiede in Fusionsplasmodium 15

Abbildung 2.19: Genexpressionsunterschiede in Fusionsplasmodien N11D4 (1/2) + N26B5 (DK)

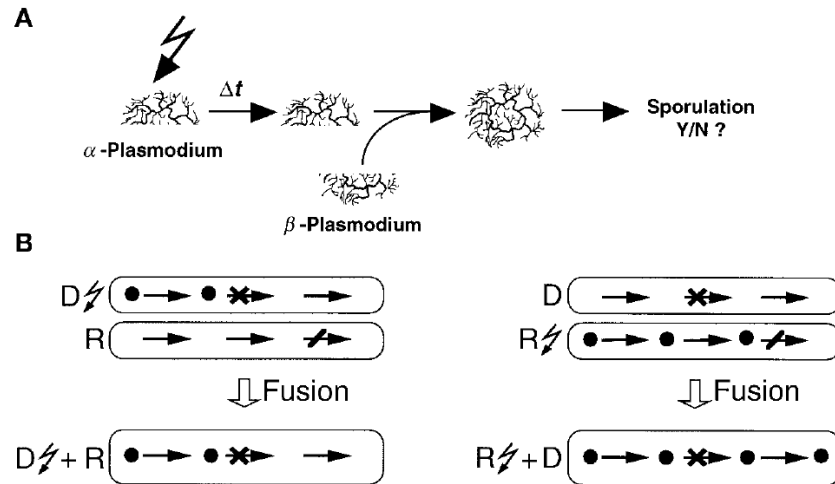
Dargestellt sind die normierten Transkriptmengen der beiden Hälften des Fusionsplasmodiums zuzüglich der Daten der Ausgangsplasmodien. Die Fusionsplasmodienhälften sind in rot bzw. blau und die Transkriptmengen der Ausgangsplasmodien in schwarz dargestellt.

#### 2.3.4 *Analyse auf Komplementationeffekte zur Rekonstruktion des Differenzierungsnetzwerkes*

Ein Ansatz zur Modellierung der Netzwerkarchitektur zur Kontrolle der Sporulation in einem Fusionsplasmodium wurde bereits in Marwan, 2003 dargestellt und analysiert. Diese Überlegungen wurden, analog zu dieser Arbeit, ausgehend von einer Fusion zweier unterschiedlicher Sporulationsmutanten des Modellorganismus getroffen (vgl. Abb. 2.20, A). Dabei besaß eine der Sporulationsmutanten eine dominant-negative Mutation in der Sporulations-Signalkaskade, wohingegen der zweite Fusionspartner einen durch eine rezessive Mutation hervorgerufenen Block in der Signalkaskade trug. Wurde ein Plasmodium, das eine dominant-negative Mutation trug, belichtet und anschließend mit einem Plasmodium mit einer rezessiven Mutation fusioniert, so zeigte das entstandene Heterokaryon aufgrund der dominant-negativen Mutation keine Sporulation. Wurde der Umkehrversuch durchgeführt, in dem Plasmodien mit einer rezessiven Mutation induziert und nach einer spezifischen Zeitspanne  $\Delta t$  mit einer Zelle mit dominanter Mutation fusioniert wurde, so stieg die Wahrscheinlichkeit der Sporulation mit zunehmendem  $\Delta t$  (Marwan und Starostzik, 2002). Dieses Phänomen wird laut Marwan, 2003 durch eine Überbrückung des dominant-negativen Blocks hervorgerufen. Diese Überbrückung wird durch die Aktivierung der Signalkaskade des Fusionspartners ermöglicht, der die rezessive Mutation trägt. Findet die Fusion kurze Zeit nach der Aktivierung der Sporulation statt, so wurden noch keine Intermediate downstream des dominant-negativen Blocks gebildet und somit kann der Signalweg zur Sporulation nicht weiter voranschreiten. Wird die Fusion jedoch durchgeführt, nachdem die Signalkaskade in der lichtinduzierten, rezessiven Mutante den dominant-negativen Block überschritten hat, so ist das entstandene Heterokaryon imstande zu sporulieren. Ermöglicht wird dieser Vorgang dadurch, dass die rezessive Mutation durch die Wildtyp-Genprodukte der dominant-negativen Mutation ausgelöscht wird. Der dominant-negative Block bleibt im Fusionsplasmodium zwar erhalten, ist aber nicht mehr in der Lage, die Vorgänge zu blockieren, die downstream in der Signalkaskade ablaufen (Marwan, 2003). Diese Überbrückung ist jedoch nur möglich, wenn sich der dominant-negative Block upstream des rezessiven Blocks befindet. Das Signalschema ist in Abbildung 2.20, B dargestellt.

Diese theoretischen Überlegungen zum Ablauf von Signalprozessen in Fusionsplasmodien sollten nun in dieser Arbeit auf molekularer Ebene experimentell validiert werden. Dazu wurden die gemessenen Expressionsdaten der hier durchgeführten Fusionsexperimente auf Komplementationeffekte untersucht. Anhand der Ausprägung die-

ser Komplementation sollte versucht werden, einen Rückschluss auf die Netzwerkarchitektur zu ziehen. Dabei sollte überprüft werden, ob sich Defekte der beiden Sporulationsmutanten in einer Fusionszelle dominant verhalten. Weiterhin sollte untersucht werden, in wie weit sich die kausale Reihenfolge der durch die jeweilige Mutation blockierten (oder veränderten) Schritte ermitteln lässt.



*the rules of complementation:*

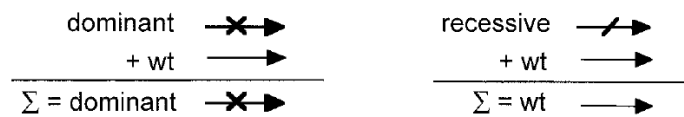


Abbildung 2.20: Komplementationsanalysen zur Rekonstruktion des Sporulationsnetzwerkes aus Marwan, 2003

A) Experimentelles Setup. Das  $\alpha$ -Plasmodium wird zur Induktion der Sporulation belichtet ( $\zeta$ ) und für eine spezifische Zeitspanne ( $\Delta t$ ) in Dunkelheit inkubiert und anschließend mit dem unbelichteten Plasmodium  $\beta$  fusioniert. Das Heterokaryon wird anschließend in Dunkelheit inkubiert, bis eine Entwicklungsentcheidung sichtbar wird.

B) Schema zur zeitabhängigen Signalgebung vor und nach Fusion in zwei Sporulationsmutanten. Punkte symbolisieren die Aktivierung von Intermediaten der Signalkaskade. Blöcke die durch eine dominant-negative Mutation verursacht wurden (X), bleiben auch in der Anwesenheit von Wildtyp-Genprodukten erhalten, wohingegen rezessive Blöcke (/) verschwinden. Der Signalweg kann nur dann vollständig ablaufen, wenn der dominante Block upstream des rezessiven Blocks liegt (rechts) und wenn die Signalkaskade im  $\alpha$ -Plasmodium mit der rezessiven Mutation den dominanten Block aus Plasmodium  $\beta$  bereits überschritten hat, bevor die Fusion durchgeführt wird. Wird Plasmodium  $\beta$  belichtet, so kann keine Sporulation stattfinden (links).

Um die berechneten Genexpressionsdaten der Fusionsplasmodien auf Komplementationeffekte untersuchen zu können, wurden die folgenden Überlegungen zugrunde gelegt.

- Durch eine vollständige, rein physikalische Mischung der Zytoplasmen der beiden Fusionspartner würden die Expressionsstärken der Gene im Fusionsplasmodium dem Mittelwert der Expressionsstärken der beiden Ausgangsplasmodien entsprechen. Dies würde man unabhängig von einer Synchronisation der beiden Zellkernpopulationen erwarten, die Infolge der Fusion auftreten könnte.
- Würden sich die Expressionsstärken der untersuchten Gene in einem Fusionsplasmodium hingegen so verhalten wie im Wildtyp, so würde man von einer Komplementation der beiden Gendefekte der miteinander fusionierten Plasmodien sprechen.
- Alternativ könnten sich die Gendefekte der miteinander fusionierten Plasmodien gegenseitig beeinflussen, so dass ein neues, vom Wildtyp zu unterscheidendes (synthetisches) Systemverhalten entsteht.

Auf Grundlage dieser Annahmen wurden sowohl für jedes Fusionsplasmodium der Mittelwert der Expressionslevel für jedes Gen über beide Fusionsplasmodienhälften, als auch der Mittelwert über beide zugehörigen Ausgangsplasmodien für jedes Gen ermittelt. Anschließend wurde, wie in Gleichung 2.1 dargestellt, der Mittelwert der beiden Hälften der Fusionszellen auf den Mittelwert der Ausgangsplasmodien normiert. Anhand dieser relativen mRNA-Mengen sollten die Gene identifiziert werden, deren Expressionsverhalten in den Fusionszellen deutlich von den unfusionierten Zellen abweicht.

$$\text{rel.mRNA-Menge}_{\text{GenX}} = \frac{\text{Mittelwert Fusionshälften}_{\text{GenX}}}{\text{Mittelwert Ausgangsplasmodien}_{\text{GenX}}} \quad (2.1)$$

Anschließend sollten Grenzwerte für die Signifikanz dieser ermittelten  $x$ -fachen Unterschiede der Expressionslevel festgelegt werden, um auftretende Komplementationeffekte von einer reinen Mischung der Genprodukte mit einer wohldefinierten Irrtumswahrscheinlichkeit abgrenzen zu können. Arbeitsgruppen-interne Erfahrungen haben ergeben, dass Schwankungen in den gemessenen Expressionsleveln von bis zu 50% durch die Messungenauigkeit des verwendeten Kapillarsequencers Ceq8800 der Firma Beckman Coulter verursacht werden. Daher kann davon ausgegangen werden, dass es sich bei relativen Genexpressionsleveln, die sich um einen Wert von  $\geq 1,5$  unterscheiden (vgl. Gleichung 2.1), nicht um Artefakte,

sondern um reale Unterscheide in der Ausprägung der Genexpressionslevel handelt. Messwerte, die unterhalb der Detektionsgrenzen des Kapillarsequencers lagen, wurden für die Analysen durch die entsprechenden Nachweisgrenzen ersetzt. Diese Nachweisgrenzen wurden für jede Probe und jedes Fragment simultan zur Berechnung der Transkriptmengen von der Analysesoftware ermittelt. Dieses Vorgehen verhindert das Auftreten von numerischen Artefakten in den Berechnungen und stellt somit sicher, dass die ermittelten relativen mRNA-Mengen die mindestens vorhandenen Expressionsstärken berücksichtigen.

Mithilfe dieser Auftragungen ließen sich Gene identifizieren, welche sich in der Häufigkeit des Auftretens von Komplementationseffekten deutlich unterschieden. Diese Unterschiede waren abhängig davon, welche Hälfte des Fusionsplasmodiums zur Induktion der Differenzierung belichtet wurde. Zu diesen Genen zählten *ribA*, *psgA*, *pldC*, *pptB*, *pikC*, *pptA*, *spiA*, *cdcA*, *cudA*, *anxA*, *pwiA* und *rgsA*. In Abbildung 2.21 und 2.22 sind die quantitativen Unterschiede der Komplementationseffekte für jedes der analysierten Gene beider Teilveruche dargestellt. Abbildung 2.21 zeigt für Fusionsplasmodien des Typs N26B5  $\frac{1}{2}$  + N11D4 DK deutlich, dass das Gen *pptA* in zwei der 15 analysierten Plasmodien deutlich mehr exprimiert wird als in den Ausgangszellen. Zusätzlich weisen fünf der Fusionszellen in diesem Gen einen Expressionswert auf, der deutlich unterhalb der Ausgangswerte liegt. Vergleicht man diese Werte nun mit der relativen Genexpression für Fusionsplasmodien des Typs N11D4  $\frac{1}{2}$  + N26B5 (DK) (Abbildung 2.22), so sind deutliche Unterschiede festzustellen. Neun der 15 Plasmodien weisen in diesem Versuchsaufbau für das Gen *pptA* einen relativen Genexpressionswert auf, der im Vergleich zu den Ausgangszellen durch Komplementation deutlich herunterreguliert wurde. Anhand dieser Unterschiede in der Ausprägung von Komplementationseffekten in den jeweiligen Genen soll nun auf die Netzwerkarchitektur der verwendeten Sporulationsmutanten rückgeschlossen werden.

Verhältnis Fusionen zu Ausgangsplasmidien Teilversuch 1, N26B5 belichtet

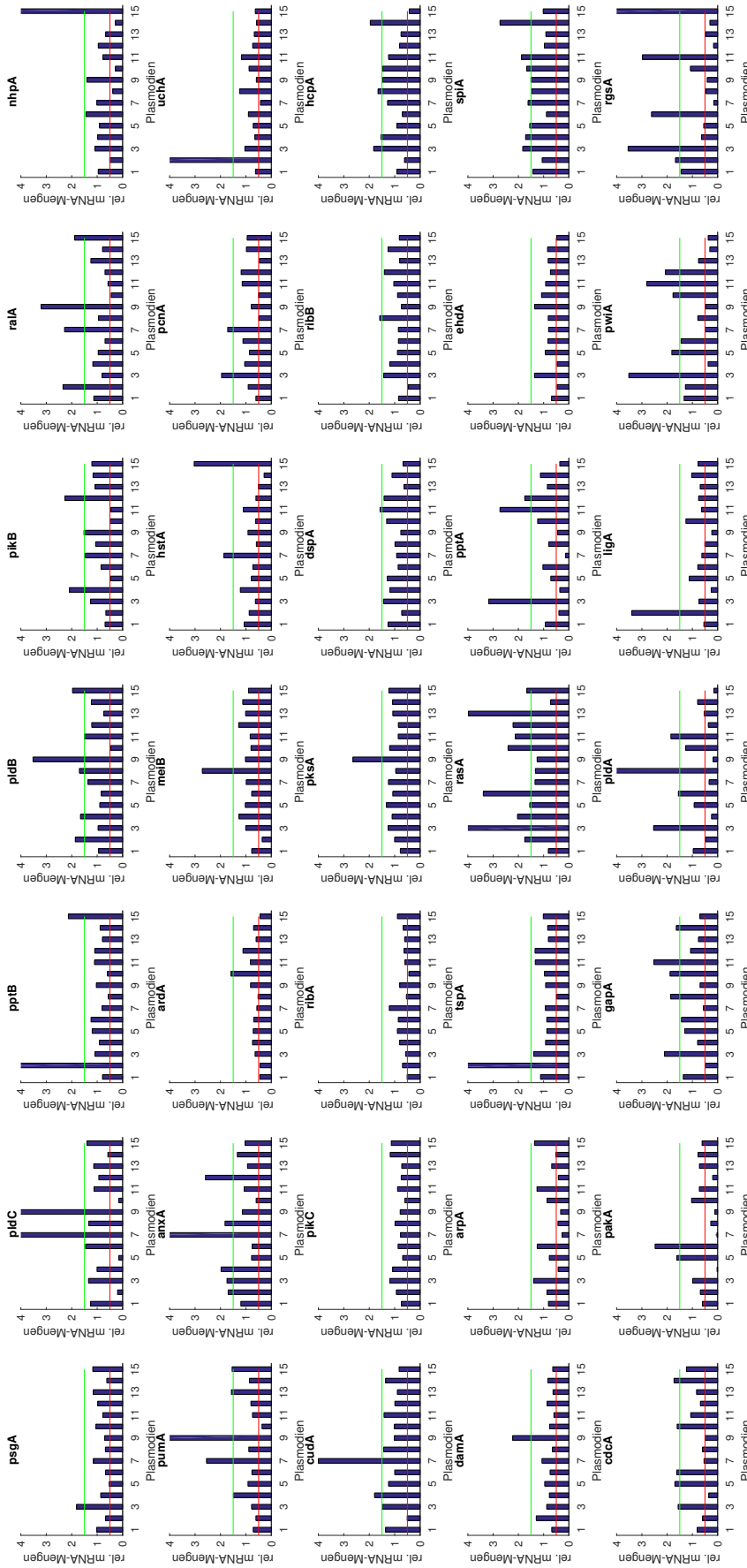


Abbildung 2.21: Komplementationseffekte in Fusionsplasmidien aus Teilversuch 1

Dargestellt sind die nach Gleichung 2.1 berechneten relativen mRNA-Mengen zwischen den Genexpressionsleveln der Fusionszellen und deren Ausgangsplasmidien. Werte mit einer rel. mRNA-Menge von  $>1.5$  und  $<0.5$  werden als Komplementationseffekte gewertet. Gezeigt sind die Analyseergebnisse aller Gene für die Fusionsplasmidien aus Teilversuch #1: N26B5  $\downarrow$  + N11D4 DK

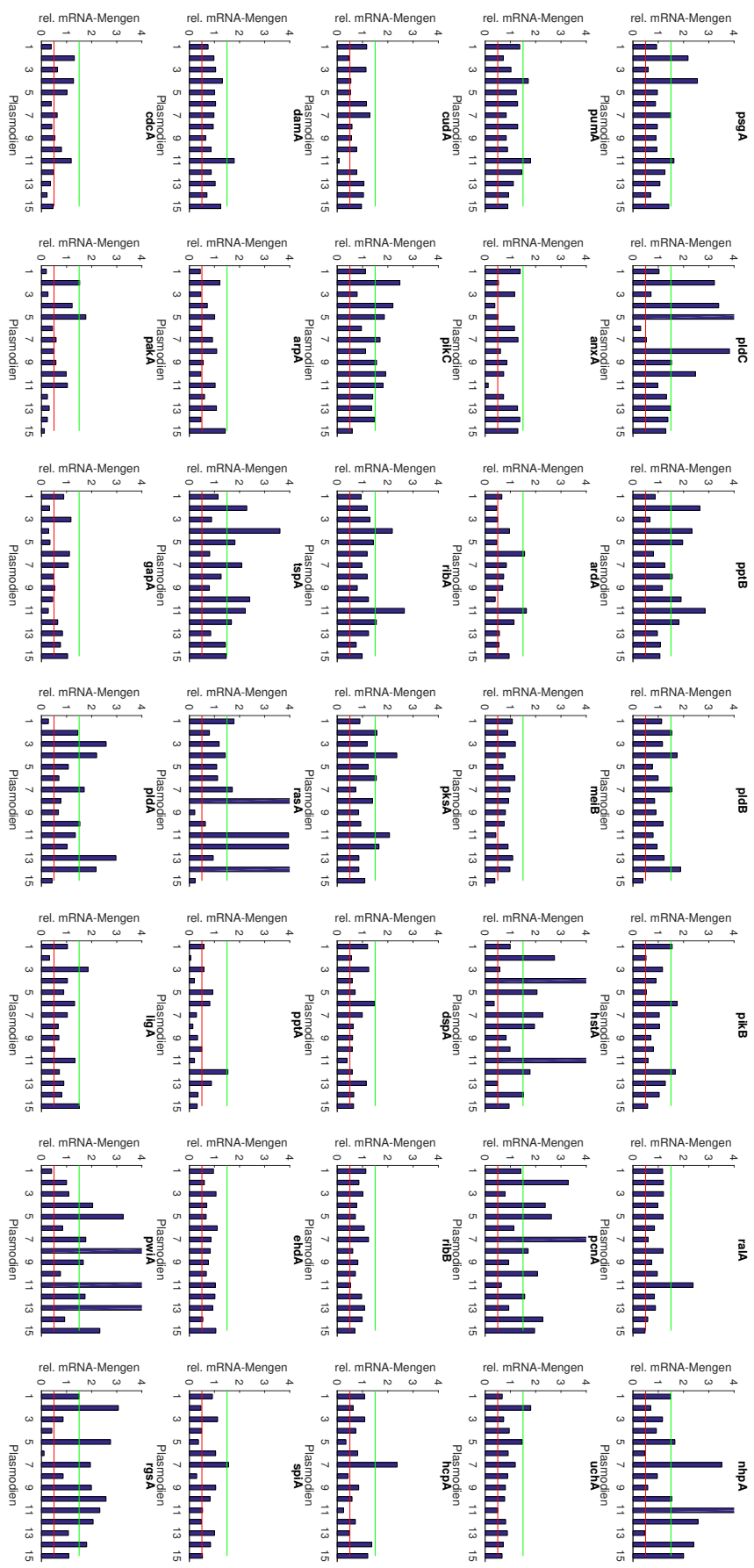


Abbildung 2.22: Komplementationeffekte in Fusionsplasmoiden aus Teilversuch 2

Dargestellt sind die nach Gleichung 2.1 berechneten relativen mRNA-Mengen zwischen den Genexpressionsleveln der Fusionszellen und deren Ausgangsplasmoiden. Werte mit einer rel. mRNA-Menge von  $>1.5$  und  $<0.5$  werden als Komplementationseffekte gewertet. Gezeigt sind die Analyseergebnisse aller Gene für die Fusionsplasmoiden aus Teilversuch #2: N11D4 4 + N26B5 DK



Abbildung 2.23 zeigt unterschiedliche experimentelle Setups zur Identifikation der Hierarchie von Mutationen im Sporulationsnetzwerk. Eine Komplementation ist somit möglich, wenn das Fusionsplasmodium zwei rezessive Mutationen trägt. Dabei ist die Anordnung dieser Mutationen im Netzwerk irrelevant (vgl. Abbildung 2.23, B). Weiterhin können in einer Fusionszelle Komplementationen entstehen, wenn diese eine dominante Mutation trägt, die sich in der Signalkaskade upstream zu einer rezessiven Mutation befindet. Bei Induktion des Stammes, der die rezessive Mutation trägt, kann die dominante Mutation überbrückt und der Gendefekt komplementiert werden (vgl. Abbildung 2.23, C). Würden diese, in Abbildung 2.20 und Abbildung 2.23 dargestellten, theoretischen Überlegungen der unidirektionalen Signalführung tatsächlich zutreffen, so würden nur in einem der beiden Fusionsexperimente, bedingt durch das Überbrücken der dominant-negativen Mutation, Komplementationeffekte auftreten. Bei Durchführung des Umkehrexperimentes wären somit, verursacht durch das Blocken der Signalkaskade durch die dominant-negative Mutation, keine Komplementationseffekte zu erwarten gewesen. Das Auftreten von Komplementationseffekten in beiden experimentellen Setups, die zusätzlich selektiv in bestimmten Genen auftreten, weist auf eine alternative Signalführung in der Regulationskaskade hin.

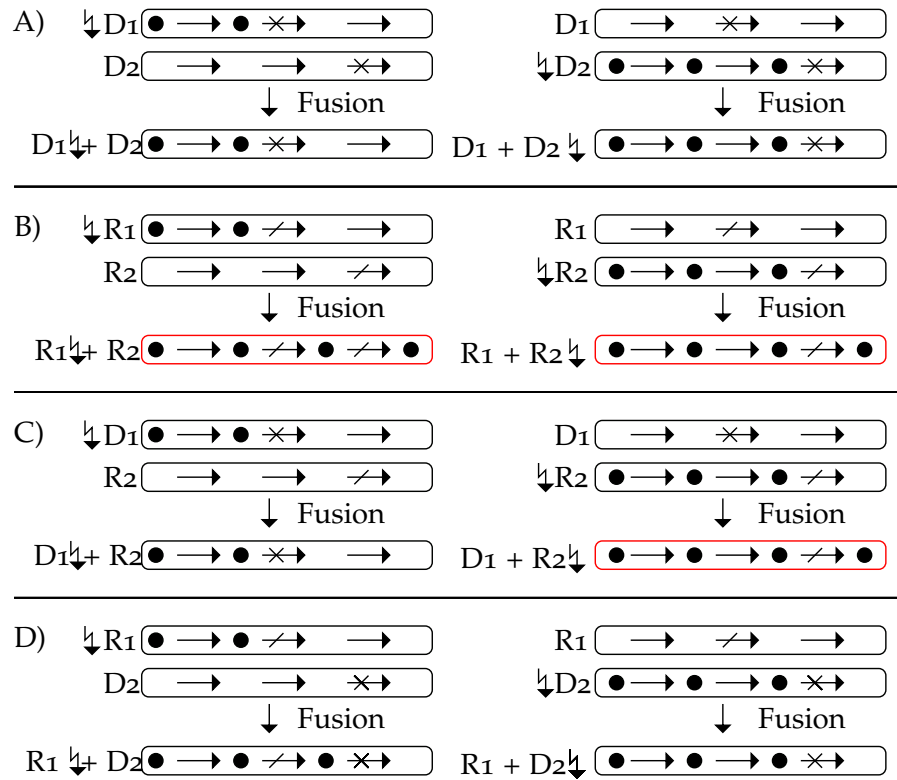


Abbildung 2.23: Analysemethoden zur Aufklärung der Netzwerkstruktur

Schemata zur Identifikation der Hierarchie von Mutationen in der Sporulations-Signalkaskade durch somatische Komplementation.  $D$  symbolisiert eine Mutation, die sich dominant verhält,  $R$  eine Mutation mit einem rezessiven Einfluss. A: Eine Komplementation in einem Fusionsplasmodium mit zwei hintereinander folgenden dominanten Mutationen ist weder durch die Aktivierung des Blocks  $D_1$  noch durch Aktivierung des Blocks  $D_2$  möglich, da der jeweils andere Block das Voranschreiten des Sporulationssignals abblockt. B: In einem Fusionsplasmodium mit zwei aufeinander folgenden rezessiven Mutationen ist eine Komplementation sowohl bei Aktivierung des Blocks  $R_1$ , als auch bei Aktivierung des Blocks  $R_2$  möglich, da das Sporulationssignal über den jeweils anderen Fusionspartner umgeleitet werden kann. C: Folgt in einem Fusionsplasmodium eine rezessive auf eine dominante Mutation, so ist eine Komplementation nur möglich, wenn der rezessive Block aktiviert wird, da die dominante Mutation auf diesem Wege überbrückt werden kann. Andernfalls wird das Signal von der dominanten Mutation unterbrochen. D: Folgt in einem Fusionsplasmodium eine dominante auf eine rezessive Mutation, so in beiden Fällen keine Komplementation möglich, da das Signal durch die dominante Mutation unterbrochen wird. Setups, die eine Komplementation ermöglichen, sind in rot markiert.

Somit scheinen die Gene *ribA*, *psgA*, *pldC*, *pptB*, *pikC*, *pptA*, *spiA* und *cdcA* über einen Signalweg komplementiert zu werden, in dem sich der dominant-negative Block des Stammes N11D4 upstream des rezessiven Blockes von N26B5 befindet. Dabei werden die Gene *cudA*, *anxA*, *pwiA* und *rgsA* über einen Signalweg reguliert, der sich genau umgekehrt verhält. Hier befindet sich die dominant-negative Mutation in N26B5 upstream der rezessiven Mutation des Stammes N11D4. Die hier beobachteten differentiellen Regulationsmuster in den Fusionsplasmidien entsprechen der Regulation, wie sie auch in Wildtyp-Plasmidien auftritt. Der Aufbau dieses Signalnetzwerkes ist in Abbildung 2.24 dargestellt.

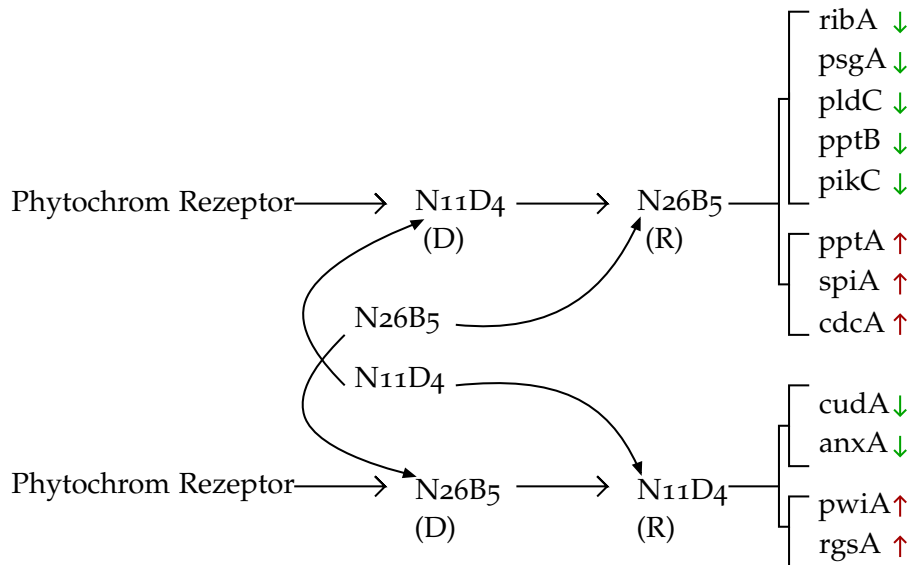


Abbildung 2.24: Ablaufschema für Regulationskaskaden

*Die selektive Regulation sporulationsrelevanter Gene in Physarum polycephalum ist abhängig von der dominanten oder rezessiven Ausprägung der veränderten Blöcke in der Signalkaskade der verwendeten Stämme und deren Lokalisation relativ zueinander. Die gewonnenen Daten weisen darauf hin, dass sich der veränderte Abschnitt eines Mutantenstammes für einige Gene dominant und für andere Gene wiederum rezessiv auswirken kann. Dominante Einflüsse einer Mutante auf die Regulationskaskade sind mit einem (D) gekennzeichnet, wohingegen rezessive Ausprägungen mit einem (R) markiert wurden. Hochregulierte Gene sind mit einem roten, herunterregulierte Gene mit einem grünen Pfeil symbolisiert.*

## 2.4 REKONSTRUKTION VON INTRAZELLULÄREN SIGNALKASKADEN DURCH CLUSTERING VON GENEXPRESSIONSDATEN

Die Rekonstruktion von intrazellulären Signalkaskaden auf der Grundlage von Genexpressionsdaten gestaltet sich aufgrund der großen Datenmengen oft als besonders anspruchsvoll. Clusteralgorithmen sind geeignete Werkzeuge zur Identifikation von Regulationsmustern in verrauschten Messdaten. Diese bieten den Vorteil, dass zur Anwendung kein a priori Wissen, wie zum Beispiel Trainingsamples, benötigt wird und für die meisten Algorithmen keine Information über die Clusteranzahl notwendig ist (Azadov, 2008). Jedoch erlauben die bisher gebräuchlichen Clusteralgorithmen ausschließlich eine Clusterung entweder nach den analysierten Genen oder nach den betrachteten Zellen. Die Plasmodien von *Physarum polycephalum* verhalten sich jedoch auch unter gleicher experimenteller Behandlung hoch individuell (Rätzel, 2015). Daher würde unter Verwendung eines solchen Algorithmus der Großteil der Informationen über Variationen in den Signalkaskaden nicht in ausreichender Form ausgewertet werden, obwohl sie besonders relevant zur Rekonstruktion des Regulationsnetzwerkes sind.

Daher wurde in dieser Arbeit ein selbstständig implementierter Clusteralgorithmus entworfen, der bei der Clusterung der Genexpressionsdaten sowohl die Zugehörigkeit der analysierten Gene, als auch die einzelnen Plasmodien mit ihren spezifischen Genexpressionsmustern berücksichtigt. Die Implementierung des Algorithmus erfolgte als Matlab<sup>®</sup>-Skript, welches der Arbeit beiliegt.

### 2.4.1 Arbeitsweise und Implementierung des Algorithmus

Die in dieser Arbeit analysierten Gene sollten in Gruppen unterteilt werden, die durch eine korrelierte Regulation gekennzeichnet sind. Es wurde davon ausgegangen, dass sich während einer Zeitreihenanalyse die Expressionslevel spezifischer Gene von Zeitschritt zu Zeitschritt in gleichem Maße ändern, wenn deren Transkription über dieselben Regulationsmechanismen gesteuert wird. Daher wird der Algorithmus ausschließlich auf Genexpressionsänderungen (NPA) von einem Analysezeitpunkt zum nächsten angewandt. Dazu wurde das Verhältnis der Expressionslevel für jedes Gen der analysierten Plasmodien zwischen den zwei betrachteten Zeitpunkten berechnet, welches dem Faktor der Änderung der Transkriptmengen entspricht. Der Clusteralgorithmus nutzt die vorab ermittelten Genexpressionsverhältnisse als Ähnlichkeitsmaß zwischen beiden Datensätzen und ordnet diese, unter Zuhilfenahme von benutzerdefinierten Schwellwerten, in spezifische Cluster für jeden Datensatz ein. Die anschließende Präsentation der Ergebnisse erfolgt sowohl tabellarisch, als auch grafisch aufbereitet als Heatmap und Kreisplot.

Die genaue Berechnung der Clusterdaten ist in Abbildung 2.25 dargestellt und umfasst folgende Schritte:

- Schritt 1: Vorbereitung der Daten

Dem Algorithmus werden zwei Datensätze (DS) mit den zuvor berechneten Genexpressionsverhältnissen präsentiert. Die Anzahl der Gene und Plasmodien ist beliebig. Es wird jedoch vorausgesetzt, dass die Anzahl und Reihenfolge der Gene über alle Datensätze hinweg konstant ist. Zusätzlich muss der Anwender vor der Analyse die gewünschten Grenzwerte wahlweise als absolute oder relative Werte parametrieren.

1. SIM-Threshold: Similarity-Threshold – Ähnlichkeitsschwellwert der mindestens erfüllt sein muss, damit zwei Gene einem Cluster zugeordnet werden können
2. GEL-Threshold: Gene Expression Level-Threshold – Optionaler Schwellwert, mit dem Gene herausgefiltert werden können, deren Genexpressionswerte nur sehr niedrig sind und somit als nicht (signifikant) reguliert interpretiert werden
3. MNP-Threshold: Minimal Number of Plasmodia-Threshold – Schwellwert, der angibt, wieviele Plasmodien ein Cluster mindestens enthalten muss
4. MNG-Threshold: Minimal Number of Genes-Threshold – Schwellwert, der angibt, wieviele Gene mindestens in einem Cluster enthalten sein müssen

- Schritt 2: Vorauswahl der Plasmodienpaare

Zunächst wird die Auswahl der möglichen Plasmodien eingeschränkt, die einem Cluster zugehörig sein können. Hierzu wird eine Binärmatrix der Dimension (Anzahl Plasmodien)  $\times$  (Anzahl Plasmodien)  $\times$  (Anzahl Gene) erzeugt. Eine logische 1 in dieser Matrix an der Stelle XYZ bedeutet, dass der Quotient der Genexpressionslevel von Plasmodium X zum ersten Analysezeitpunkt und Plasmodium Y an einem zweiten Zeitpunkt für das Gen Z den vom Nutzer vorgegebenen Grenzwert (SIM) erfüllen. Die Summe über die Gene liefert die Anzahl der Gene, in denen sich die Plasmodien X und Y ausreichend ähnlich sind. Diese Anzahl kann wiederum mit der Mindestanzahl an Genen (MNG) pro Cluster verglichen werden. Die resultierende Matrix ist reziprok symmetrisch und kann auf die obere bzw. untere Dreiecksmatrix beschränkt werden. Die verbliebenen Einträge kennzeichnen Plasmodienpaare, die die gegebenen Grenzwerte erfüllen. Sie stellen den Ausgangspunkt für die Suche nach komplexen Mustern dar.

- Schritt 3: Mustersuche

In diesem Schritt wird geprüft, wieviele Plasmodienpaare sich zu einem Cluster zusammenfassen lassen. In Schritt 2, Vorauswahl der Plasmodienpaare, wurde bereits eine Matrix erzeugt, die Informationen zur Ähnlichkeit der Genexpression zwischen Plasmodien zueinander enthält. Alle Plasmodien, die sich in dem Verhältnis der Expressionswerte bestimmter Gene ausreichend ähnlich sind, werden nun zu Gruppen zusammengefügt. Dabei werden zuerst Cluster aus zwei Plasmodienpaaren überprüft. Die Clustergröße wird anschließend schrittweise erweitert. Für jede einzelne Kombination wird anhand des MNG-Threshold überprüft, ob sich die Expressionswerte aller beteiligten Plasmodien eines Clusters in ausreichend vielen Genen ausreichend ähnlich sind. Ist diese Bedingung erfüllt, so wird diese Kombination abgespeichert. Dieses Vorgehen wird für alle Spalten der Ähnlichkeitsmatrix wiederholt.

- Schritt 4: Entfernen von Subclustern

In diesem Schritt wird für jedes der gespeicherten Cluster überprüft, ob diese spezifische Kombination aus Genen und Plasmodien in einem der komplexeren Cluster enthalten ist. Cluster, welche vollständig in anderen Clustern enthalten sind und somit nur eine Untergruppe ohne zusätzliche Information darstellen, verbleiben unbeachtet und werden verworfen.

- Schritt 5: Normierung

Für jedes der verbliebenen Cluster werden die Genexpressionsverhältnisse der beteiligten Plasmodien und der zugehörigen Gene ausgelesen und gespeichert. Der Nutzer kann einen Minimalwert für die berechneten Genexpressionsverhältnisse (GEL) angeben. Ist ein solcher Grenzwert vorgegeben, werden alle Cluster verworfen, in denen alle Genexpressionsänderungen unterhalb des vorgegebenen Schwellwertes liegen. Für die spätere grafische Darstellung werden die Genexpressionsverhältnisse auf den Maximalwert aller Verhältnisse des analysierten Datensatzes normiert.

- Schritt 6: Auswertungstabelle

Jedem Cluster werden die Realnamen der beteiligten Gene zugeordnet. Im Anschluss wird eine Übersicht aller im Datensatz enthaltenen Cluster als table-Variable abgespeichert, sortiert und ausgegeben.

- Schritt 7: Clusterkopien

In diesem Schritt werden von jedem Cluster Kopien entsprechend der Anzahl der beteiligten Plasmodien angefertigt. Jede Instanz eines Clusters, also jedes Auftreten eines Clusters in einem Plasmodium, wird nun durch einen eigenen Eintrag repräsentiert. Diese Kopien werden nun für die grafische Darstellung mit den relativen Genexpressionsleveln der Plasmodien für diese Gene (vgl. Schritt Nr. 5) gewichtet. Für die spätere grafische Darstellung werden die Cluster im Anschluss ebenfalls nach dem kleinsten Index der beteiligten Gene sortiert, sodass die Cluster, an denen Gene mit einem bestimmten Index beteiligt sind, nebeneinander liegen.

- Schritt 8: Gruppenauswertung

Werden dem Algorithmus mehrere Datensätze übergeben, so werden im Anschluss an die individuelle Clusteranalyse die Ergebnisse von aufeinanderfolgenden Datensätzen in einem Vergleich gegenübergestellt. Hierzu werden ergänzend sowohl die identischen, als auch die für einen Datensatz exklusiven Cluster als Tabelle ausgegeben. Zusätzlich werden die Cluster beider Datensätze in einer Heatmap, durch eine vertikale Linie getrennt, nebeneinander dargestellt. Identische Cluster werden gelb unterlegt. Die relativen Genexpressionswerte aus Schritt Nr. 5 werden durch den Farbton codiert. Die Breite der horizontalen Balken entspricht der Anzahl der Plasmodien, in denen dieses Cluster aufgetreten ist.

Schritt 1 - Datenvorbereitung:  $DS_1/DS_2=NPA_{xyz}$

Schritt 2 - Vorauswahl Plasmodienpaare:

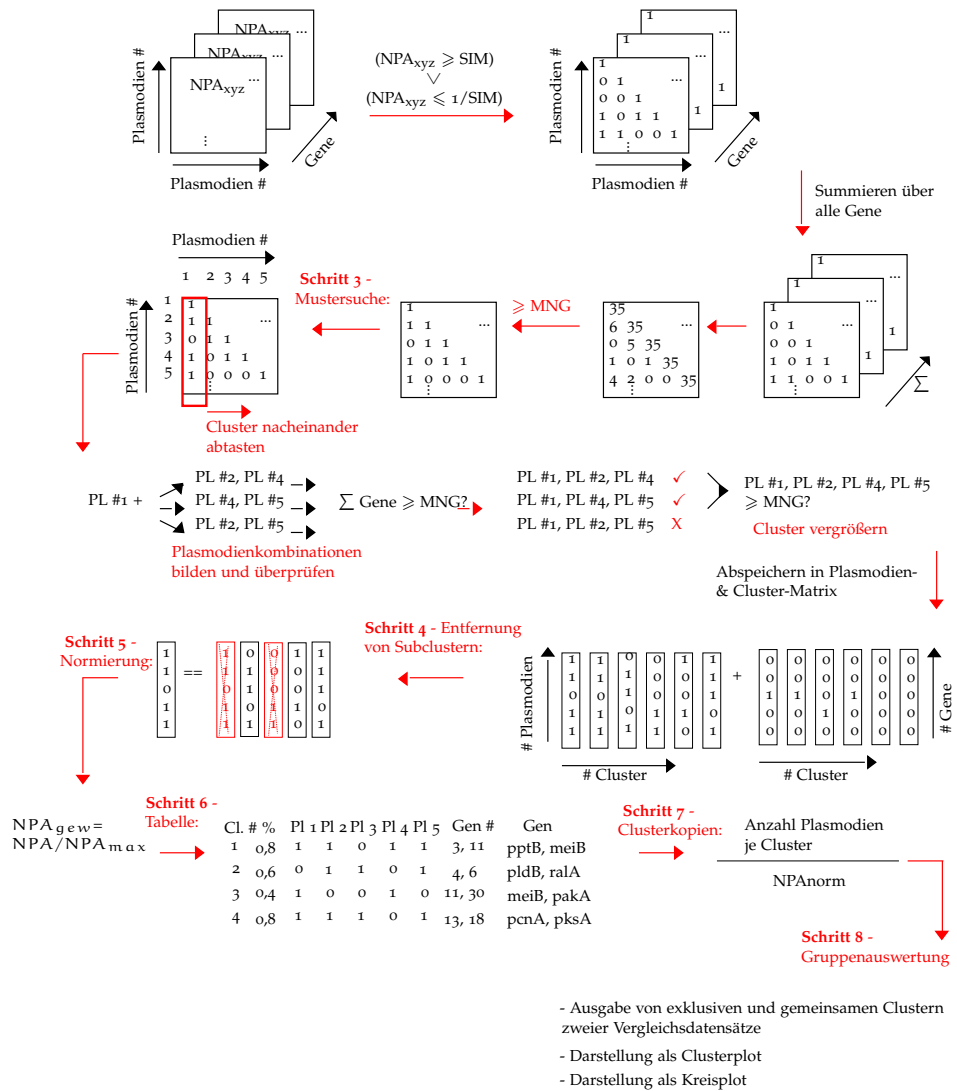


Abbildung 2.25: Programmablauf des Algorithmus zur Identifikation von Genexpressionsclustern

Dargestellt ist die Vorgehensweise des hier implementierten Clusteralgorithmus zur Suche von Plasmodien, die in einer Gruppe von Genen gleiche Expressionsverhältnisse aufweisen.

Erläuterungen im Text, Kapitel 2.4.1.



2.4.2 Clusteranalyse für Mutantenstämme von *Physarum polycephalum*

Die Analyse der ermittelten Genexpressionsverhältnisse erfolgte in jedem Stamm zwischen den Zeitschritten Dunkelkontrolle – 4 h nach Belichtung und 4 h – 8 h nach Induktion. Dem Algorithmus wurden hierzu zwei Datensätze übergeben. Die Analyse der Daten wurden mit den in Tabelle 2.4 aufgeführten Parametern gestartet. Es wurde angenommen, dass Gene, deren Expressionsverhältnis den Wert fünf übersteigt, als signifikant differentiell reguliert angesehen werden können. Die vom Clusteralgorithmus berechneten Ergebnisse werden im Anschluss an die Analyse in unterschiedlichen Formaten ausgegeben. Die Präsentation der vom Algorithmus berechneten Cluster erfolgt in erster Instanz als Tabelle. Diese Ergebnistabellen enthalten alle in einem Datensatz gefundenen Cluster. Für jedes Cluster werden die zugehörigen Gene und deren Zugehörigkeit zu den spezifischen Plasmodien aufgelistet. Weiterhin erfolgt eine grafische Aufarbeitung der errechneten Clustertabellen als Heatmap oder Kreisplot.

Tabelle 2.4: Parameter für Clusteranalysen

Threshold	Wert
Similarity (SIM)	0.75
Gene Expression Level (GEL)	0
Minimal Number of Plasmodia (MNP)	0.35
Minimal Number of Genes (MNG)	2

## 2.4.2.1 Clusteranalyse für den Stamm N26B5

Die Analyse wurde für den Stamm N26B5 für die sporulierten und nicht sporulierten Zellen separat durchgeführt. In der Clusteranalyse der sporulierten Plasmodien dieses Stammes konnten in Zeitschritt 1 (DK – 4 h nach Induktion) acht individuelle Cluster identifiziert werden (vgl. Tabelle 2.5). In der Analyse der Genexpressionsverhältnisse des Zeitschrittes 2 (4 h – 8 h nach Induktion) konnten in denselben Plasmodien 23 spezifische Cluster identifiziert werden (vgl. Tabelle 2.6). Die Berechnung von individuellen und unterschiedlichen Genexpressionsclustern in diesen zwei Datensätzen zeigt, dass der hier implementierte Algorithmus zuverlässig spezifische Genexpressionscluster berechnet und für die Analysen verwendet werden kann.

Die resultierenden Tabellen geben für jedes Cluster eine individuelle Clusternummer aus, wobei zusätzlich angezeigt wird, in wieviel Prozent der gesamt analysierten Plasmodien das spezifische Cluster gefunden wurde. Alle analysierten Plasmodien sind, zusätzlich mit einer Nummer versehen, in der Tabelle aufgelistet (hier: P11-P19). Tritt

das gefundene Cluster in einem dieser Plasmodien auf, so wird in der entsprechenden Spalte eine "1" eingetragen. Wurde das Cluster in einem der Plasmodien nicht gefunden, so wurde die entsprechende Spalte mit einer "0" markiert. Die Spalte "Gene" gibt namentlich die Gene aus, die in jedem spezifischen Cluster gefunden wurden. In der letzten Spalte "P" wird die nach Kapitel 2.4.4.1 berechnete Wahrscheinlichkeit ausgegeben, mit der das spezifische Genexpressionscluster als zufällige Gen- und Plasmodienkombination auftreten würde. Diese Tabellen ermöglichen eine Aussage darüber, welche Gene sich in den analysierten Zeitschritten in einem ähnlichen Maß ändern. Beispielhaft gibt Cluster Nr. 1 in Tabelle 2.5 an, dass das Expressionsverhältnis der Gene *pptB* und *meiB* in vier von neun Plasmodien in dem Zeitabschnitt von der Dunkelkontrolle zu vier Stunden nach Induktion korreliert ist.

Die vom Algorithmus berechneten Cluster enthalten Gene, deren Expressionslevel sich über den analysierten Zeitraum im selben Maße ändern. Das deutet darauf hin, dass diese Gene einer gemeinsamen Regulation unterliegen. Anhand dieser Information über gemeinsam regulierte Gengruppen können nun Teile des Signalnetzwerkes, das die Sporulation vermittelt, als Modell abgebildet werden. Die Ergebnisse des hier implementierten Clusteralgorithmus eignen sich zur Rekonstruktion von Signalwegen in besonderem Maße, da hier sowohl die Zusammenhänge zwischen gemeinsam regulierten Genen als auch den zugehörigen Plasmodien berechnet wird. In etablierten Clusteralgorithmen, wie zum Beispiel k-Means, können Genexpressionsdaten entweder nach Genen oder nach Plasmodien geclustert werden. Da vorhergehende Analysen jedoch gezeigt haben, dass die Regulationsmechanismen in einzelnen Plasmodien hoch individuell ablaufen (Rätzl, 2015), würde eine Vielzahl an Informationen verloren gehen.

Weiterhin ermöglicht diese Betrachtungsweise der Expressionsverhältnisse eine Analyse der Korrelationsstärke der betrachteten Gene und die Identifikation alternativer Signalwege und Kopplungen. Diese alternativen Signalwege können durch so genannte Überlappungen in den Genexpressionsclustern, wie sie zum Beispiel in Tabelle 2.5 in Cluster Nr. 6 und Nr. 7 zu sehen sind, rekonstruiert werden. Hier sind Cluster Nr. 6 die Gene *cudA* und *arpA* zugeordnet, wohingegen die Gene *cudA* und *spiA* Cluster Nr. 7 zugeteilt wurden. Dabei treten beide Cluster in den Plasmodien 3, 8 und 9 auf, wohingegen Cluster Nr. 6 exklusiv für Plasmodium 1 ist. Cluster Nr. 7 tritt jedoch exklusiv in Plasmodium 7 auf. Diese überlappende Aufteilung der Gene und Plasmodien auf die zwei Cluster lässt darauf schließen, dass es einen zugrundeliegenden alternativen Signalweg in Plasmodium 1 und 7 geben muss, der auf der einen Hand die Gene *cudA* und *arpA* gemeinsam reguliert, während in anderen Plasmodien die Gene *cudA* und *spiA* koreguliert werden.

Tabelle 2.5: Clusterdaten N26B5 spo<sup>+</sup>, DK - 4 h nach FR

Cluster Nr.	%	Pl1	Pl2	Pl3	Pl4	Pl5	Pl6	Pl7	Pl8	Pl9	Gene	P
1	44	0	1	1	0	0	0	1	0	1	<i>pptB,meiB</i>	$7.96 \cdot 10^{-7}$
2	44	0	1	1	1	0	0	0	0	0	<i>pldB,ralA</i>	$7.96 \cdot 10^{-7}$
3	44	0	1	1	0	1	0	0	1	0	<i>pldB,ralA</i>	$7.96 \cdot 10^{-7}$
4	44	0	1	1	1	0	0	1	0	0	<i>meiB,pakA</i>	$7.96 \cdot 10^{-7}$
5	44	1	0	1	1	1	0	0	0	0	<i>pcnA,pksA</i>	$7.96 \cdot 10^{-7}$
6	44	1	0	1	0	0	0	0	1	1	<i>cudA,arpA</i>	$7.96 \cdot 10^{-7}$
7	44	0	0	1	0	0	0	1	1	1	<i>cudA,spiA</i>	$7.96 \cdot 10^{-7}$
8	44	1	0	1	0	1	1	0	0	0	<i>pksA,ehdA</i>	$7.96 \cdot 10^{-7}$

Zusätzlich wurde bei der Implementierung des Clusteralgorithmus eine graphische Aufarbeitung der berechneten Clustertabellen realisiert. Dabei wurden die in den Tabellen enthaltenen Daten in einem Kreisplot dargestellt (vgl. Kapitel 2.4.1). Dabei wurde ausgezählt, wie oft Paare von Genen gemeinsam in den jeweiligen Tabellen in allen berechneten Clustern auftraten. Anschließend wurden diese Genpaare in den Kreisplots mit einer Linie verbunden, wobei die Farbintensität der Linie ein Maß für die Häufigkeit ist, mit der diese Kombination aus zwei Genen in dem analysierten Datensatz auftrat. Zusätzlich wurden die Änderungen der Expressionslevel der Gene im analysierten Zeitschritt mithilfe eines benutzerdefinierten Schwellwertes berechnet und in den Plots farbig markiert. In den hier gezeigten Plots (vgl. Abbildung 2.26 und 2.27) wurde als Schwellwert eine 5-fache Änderung des Expressionslevels festgelegt. Gene, deren Expressionslevel mindestens um das 5-fache hochreguliert sind, werden in rot dargestellt, wobei eine Herunterregulation der Genprodukte auf ein Fünftel oder weniger in blau gekennzeichnet wird. Überschreitet die Änderung der Expressionslevel den gewählten Schwellwert nicht, so werden die Gennamen in grün dargestellt. Gene, deren Expressionswerte in der eXpress-Profilierung-Analyse aufgrund sehr niedriger Expressionswerte nicht detektiert werden konnten, wurden schwarz eingefärbt.

Mithilfe dieser Auftragung von gemeinsam regulierten Genen in den Kreisplots können die Regulationsmuster auf eine sehr übersichtliche Art und Weise auf Einzelzellebene dargestellt und ausgewertet werden. Die hier dargestellten Plots für die Plasmodien des Stammes N26B5 verdeutlichen die Ergebnisse aus den PCA-Analysen, dass sich jedes Plasmodium während des Differenzierungsvorganges hoch individuell verhält. So kann zum Beispiel in Abbildung 2.26 beobachtet werden, dass sich bestimmte Muster von korrelierten Genen in den Plasmodien häufig wiederholen, wobei jedoch von Zelle zu Zelle auch eine Vielzahl von Unterschieden auftritt. Beispielfhaft treten in vier von neun Plasmodien die Kombinationen *arpA*, *cuda* oder *ehdA*, *pksA* auf, wobei sich viele der zusätzlich gefundenen Korrelationen in diesen Zellen deutlich voneinander unterscheiden. Anhand der Häufigkeit des Auftretens bestimmter Muster in den Einzelzellen ist es möglich, die Korrelationsstärke der Genpaare zu ermitteln und somit Rückschlüsse auf den Aufbau des zugrundeliegenden Netzwerkes ziehen zu können.

Tabelle 2.6: Clusterdaten N26B5 spo<sup>+</sup>, 4 h – 8 h nach FR

Cluster Nr.	%	Pl1	Pl2	Pl3	Pl4	Pl5	Pl6	Pl7	Pl8	Pl9	Gene	P
1	44	1	0	1	0	1	1	0	0	0	<i>pptB, anxA, uchA, pksA, pakA</i>	$4.01 \cdot 10^{-25}$
2	44	0	0	1	1	1	0	0	0	1	<i>pldB, pcnA, uchA, cuda</i>	$5.04 \cdot 10^{-19}$
3	44	0	0	1	1	1	1	0	0	0	<i>pldB, uchA, pksA</i>	$6.33 \cdot 10^{-13}$
4	56	1	0	1	0	1	1	0	0	1	<i>anxA, uchA</i>	$2.57 \cdot 10^{-08}$
5	44	1	0	1	0	1	0	0	0	1	<i>anxA, uchA, cuda</i>	$6.33 \cdot 10^{-13}$
6	44	1	0	0	0	1	1	0	0	1	<i>anxA, uchA, arpA</i>	$6.33 \cdot 10^{-13}$
7	44	0	1	0	0	0	1	1	1	0	<i>ardA, pcnA</i>	$7.96 \cdot 10^{-07}$
8	44	0	0	1	1	1	0	1	0	0	<i>meiB, uchA, cuda, ribB, pldA</i>	$4.01 \cdot 10^{-25}$
9	56	1	0	1	0	1	0	1	0	1	<i>uchA, cuda</i>	$2.57 \cdot 10^{-08}$
10	56	0	0	1	1	1	0	1	0	1	<i>uchA, cuda</i>	$2.57 \cdot 10^{-08}$
11	44	1	0	1	0	1	0	1	0	0	<i>uchA, cuda, ribB, pakA, gapA, pldA</i>	$3.19 \cdot 10^{-31}$
12	44	0	0	1	1	0	0	1	0	1	<i>uchA, cuda, ehda</i>	$6.33 \cdot 10^{-13}$
13	56	1	0	0	1	0	1	1	0	1	<i>uchA, ribA</i>	$2.57 \cdot 10^{-08}$
14	44	1	0	0	1	0	0	1	0	1	<i>uchA, ribA, dama</i>	$6.33 \cdot 10^{-13}$
15	44	0	0	1	1	0	1	1	0	0	<i>uchA, pksA</i>	$7.96 \cdot 10^{-07}$
16	44	1	0	1	1	0	0	0	0	1	<i>uchA, dspA, ribB</i>	$6.33 \cdot 10^{-13}$
17	44	1	0	1	1	1	0	0	0	0	<i>uchA, ribB, dama, pldA</i>	$5.04 \cdot 10^{-19}$
18	56	1	0	1	1	1	0	1	0	0	<i>uchA, ribB, pldA</i>	$6.59 \cdot 10^{-16}$
19	56	1	0	1	0	1	1	1	0	0	<i>uchA, pakA</i>	$2.57 \cdot 10^{-08}$
20	44	1	0	0	1	1	1	0	0	0	<i>uchA, pldA</i>	$7.96 \cdot 10^{-07}$
21	44	0	0	0	1	0	1	1	1	0	<i>pksA, cdcA</i>	$7.96 \cdot 10^{-07}$
22	44	1	1	0	1	1	0	0	0	0	<i>gapA, pldA</i>	$7.96 \cdot 10^{-07}$
23	44	0	1	0	1	1	0	0	0	0	<i>pldA, rgsA</i>	$7.96 \cdot 10^{-07}$

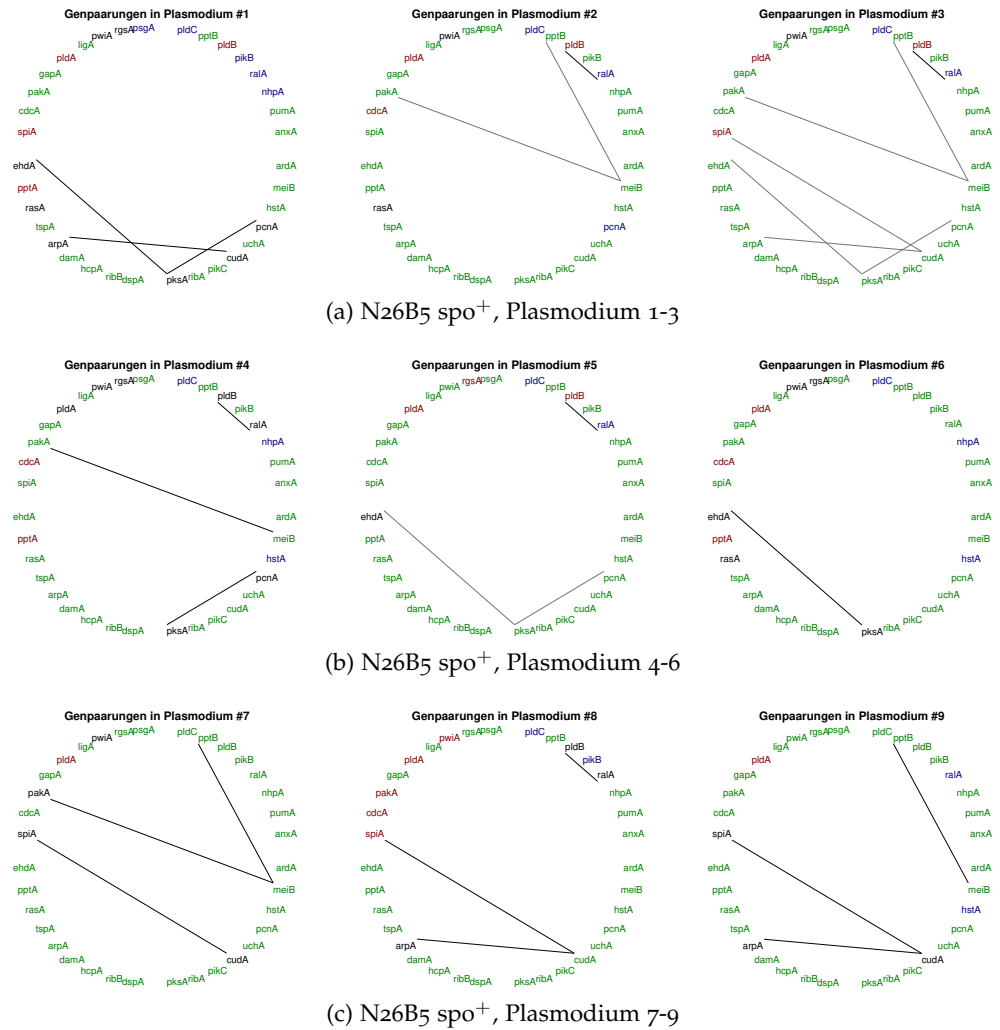


Abbildung 2.26: Kreisplot für sporulierte Plasmodien des Stammes N26B5 im Zeitschritt DK – 4 h nach Induktion

*Genpaare, die in den Einzelplasmodien zusammen in einem oder mehr Clustern auftraten, sind miteinander verbunden. Die Stärke der Linie korreliert mit der Häufigkeit, mit der die Genpaare in den Clustern eines Datensatzes auftraten. Ein benutzerdefinierter Schwellwert definiert die  $x$ -fache Regulation der Expressionslevel. Rot:  $x$ -fache Hochregulation, Blau:  $x$ -fache Herunterregulation, Grün: nicht reguliert, Schwarz: Expressionswert nicht detektierbar. Hier wurde als Schwellwert eine 5-fache Regulation gewählt.*

Wie bereits in Abbildung 2.26 und 2.27 in Kapitel 2.4.2 gezeigt, konnten in den Kreisplots der sporulierten Plasmodien des Stammes N26B5 die zeitabhängigen Regulationsmuster der Einzelzellen sehr gut dargestellt werden. Die Ergebnisse belegen, dass die Anzahl der korrelierten Gene von Zeitschritt 1 (DK – 4 h nach FR) zu Zeitschritt 2 (4 h nach FR – 8 h nach FR) deutlich ansteigt und dass sich die Komplexität der gefundenen Muster stark erhöht. Es können Gene

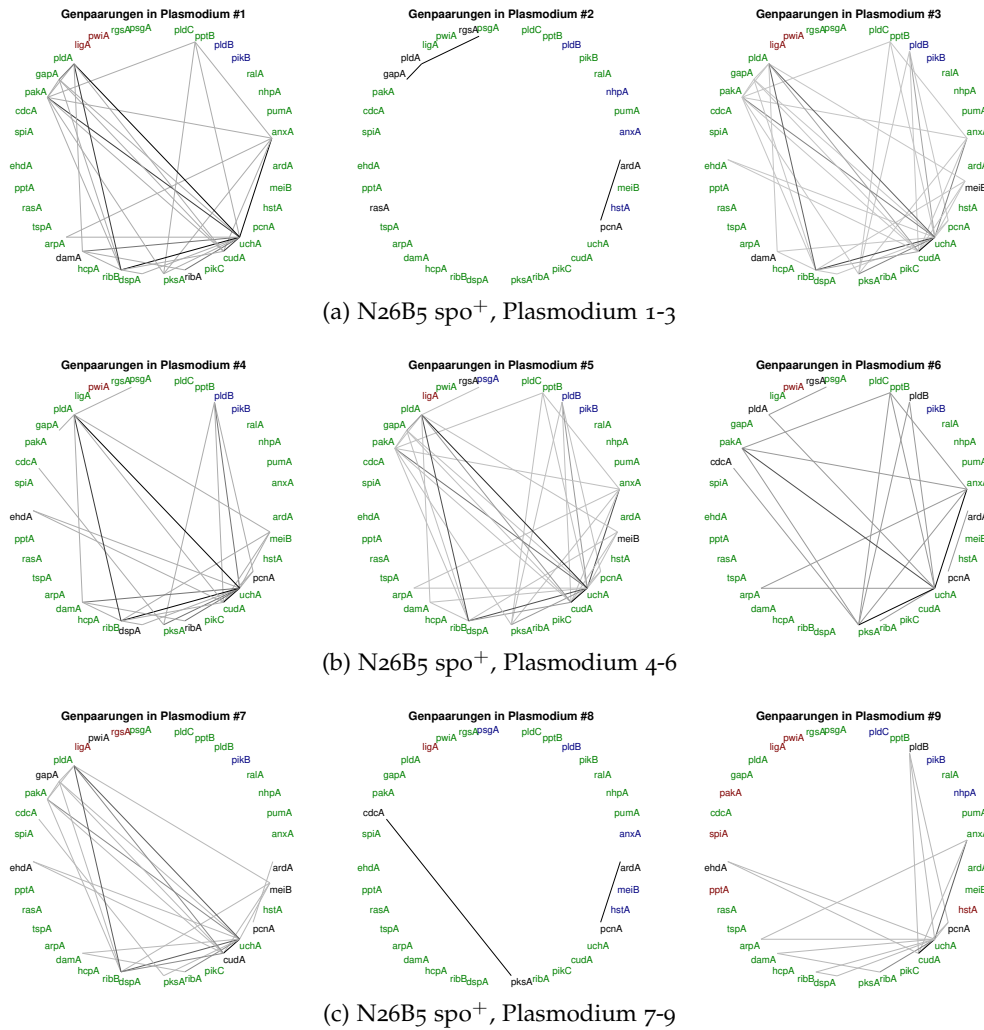


Abbildung 2.27: Kreisplot für sporulierte Plasmodien des Stammes N26B5 im Zeitschritt 4 h – 8 h nach Induktion

*Genpaare, die in den Einzelplasmodien zusammen in einem oder mehr Clustern auftraten, sind miteinander verbunden. Die Stärke der Linie korreliert mit der Häufigkeit, mit der die Genpaare in den Clustern eines Datensatzes auftraten. Ein benutzerdefinierter Schwellwert definiert die x-fache Regulation der Expressionslevel. Rot: x-fache Hochregulation, Blau: x-fache Herunterregulation, Grün: nicht reguliert, Schwarz: Expressionswert nicht detektierbar. Hier wurde als Schwellwert eine 5-fache Regulation gewählt.*

wie zum Beispiel *uchA*, *cudA*, *ribB*, *pakA*, *gapA* und *pldA* identifiziert werden, die Knotenpunkte in den Kreisplots darstellen und somit besonders häufig in den berechneten Clustern auftraten.

Die Analyse der sporulations-negativen Plasmodien des Stammes N26B5 zeigt Regulationsmuster, die sich deutlich von denen der sporulierten Plasmodien unterscheiden. Es wurden aus allen analysierten Plasmodien drei Zellen ausgewählt, die ein für diesen Daten-

satz typisches Verhalten zeigen. Auffällig ist in dieser Analyse, dass in diesen Plasmodien bereits in den Expressionsverhältnissen in Zeitschritt 1 (vgl. Abbildung 2.28, A) deutlich mehr Korrelationen zwischen den Genen auftraten als in die sporulierten Plasmodien. Die Regulationsmuster der einzelnen Plasmodien waren sich untereinander erneut sehr ähnlich, wobei jedoch auch kleinere Unterschiede zwischen den Einzelzellen auftraten. Aus diesen Unterschieden in den Korrelationsmustern der Plasmodien lässt sich sehr gut auf die zugrundeliegende Netzwerkarchitektur schließen. Sie zeigen alternative Signalwege auf und lassen zum Beispiel Schlussfolgerungen über die zugrundeliegenden Aktivierungsmechanismen der Signalkaskade zu.

In Zeitschritt 2 (vgl. Abbildung 2.28, B) sind ebenfalls deutlich andere Regulationsmuster zu erkennen, als in den sporulierten Plasmodien. Hier bilden unter anderem die Gene *ehdA*, *spiA*, *meiB*, *pikC* und *dama* die Knotenpunkte der berechneten Cluster. Die Clustertabellen, auf deren Grundlage die Plots erstellt wurden, sind in Tabelle 2.7 und 2.8 aufgeführt.



Tabelle 2.7: Clusterdaten N26B5 spo<sup>-</sup>, DK - 4 h nach FR

Cluster Nr.	%	Pl1	Pl2	Pl3	Pl4	Pl5	Pl6	Gene	P
1	50	1	0	0	0	1	1	<i>pikB, cudA, pikC, ribB, damA</i>	$4.20 \cdot 10^{-19}$
2	50	0	1	1	0	0	1	<i>pumA, uchA, pikC, ribB, damA</i>	$4.20 \cdot 10^{-19}$
3	50	0	1	1	0	1	0	<i>anxA, meiB, uchA, pikC, pksA, damA</i>	$1.07 \cdot 10^{-23}$
4	50	1	1	0	0	1	0	<i>meiB, pikC, pksA, ribB, damA, ehdA, cdcA</i>	$2.73 \cdot 10^{-28}$
5	50	0	0	1	0	1	1	<i>uchA, cudA, pikC, damA, ligA</i>	$4.20 \cdot 10^{-19}$
6	50	0	1	0	0	1	1	<i>uchA, pikC, ribB, damA, ehdA</i>	$4.20 \cdot 10^{-19}$
7	67	0	1	1	0	1	1	<i>uchA, pikC, damA</i>	$6.33 \cdot 10^{-13}$
8	50	1	0	1	0	1	0	<i>cudA, pikC, pksA, damA, ehdA, pakA</i>	$1.07 \cdot 10^{-23}$
9	67	1	0	1	0	1	1	<i>cudA, pikC, damA</i>	$6.33 \cdot 10^{-13}$
10	50	1	1	0	0	0	1	<i>pikC, ribA, ribB, damA</i>	$1.65 \cdot 10^{-14}$
11	67	1	1	1	0	1	0	<i>pikC, pksA, damA</i>	$6.33 \cdot 10^{-13}$
12	67	1	1	0	0	1	1	<i>pikC, ribB, damA</i>	$6.33 \cdot 10^{-13}$
13	83	1	1	1	0	1	1	<i>pikC, damA</i>	$2.57 \cdot 10^{-08}$

Tabelle 2.8: Clusterdaten *N26B5 spo<sup>-</sup>*, 4 h – 8 h nach FR

Cluster Nr.	%	Pl <sub>1</sub>	Pl <sub>2</sub>	Pl <sub>3</sub>	Pl <sub>4</sub>	Pl <sub>5</sub>	Pl <sub>6</sub>	Gene	P
1	50	1	0	0	1	1	0	<i>pikB, pldC, damA</i>	$2.55 \cdot 10^{-05}$
2	50	0	0	1	1	0	1	<i>pptB, pikC, arrpA, tspA</i>	$1.65 \cdot 10^{-14}$
3	50	0	1	1	0	0	1	<i>pptB, pikC, ehxA</i>	$6.48 \cdot 10^{-10}$
4	50	1	1	1	0	0	0	<i>pldB, ralA, pksA</i>	$6.48 \cdot 10^{-10}$
5	50	0	0	0	1	1	1	<i>pikB, meIB, ribA, pksA, tspA</i>	$4.20 \cdot 10^{-19}$
6	50	0	1	0	1	0	1	<i>meIB, pcnA, pikC, ribA, spiA</i>	$4.20 \cdot 10^{-19}$
7	67	0	1	0	1	1	1	<i>meIB, ribA</i>	$7.96 \cdot 10^{-07}$
8	50	0	1	0	0	1	1	<i>meIB, ribA, damA, ehxA</i>	$1.65 \cdot 10^{-14}$
9	50	0	1	0	1	1	0	<i>meIB, ribA, damA, ligA</i>	$1.65 \cdot 10^{-14}$
10	50	1	0	0	1	0	1	<i>uchA, gapA</i>	$2.55 \cdot 10^{-05}$
11	50	0	1	1	1	0	0	<i>cuuA, pikC, ehxA</i>	$6.48 \cdot 10^{-10}$
12	50	1	0	0	0	1	1	<i>cuuA, ribB, damA</i>	$6.48 \cdot 10^{-10}$
13	50	0	1	1	0	1	0	<i>dspA, ehxA</i>	$2.55 \cdot 10^{-05}$
14	50	1	1	0	1	0	0	<i>ribB, damA, spiA, ligA</i>	$1.65 \cdot 10^{-14}$
15	50	1	1	0	0	0	1	<i>ribB, damA, gapA</i>	$6.48 \cdot 10^{-10}$
16	50	0	0	1	0	1	1	<i>ribB, tspA, ehxA</i>	$2.55 \cdot 10^{-05}$

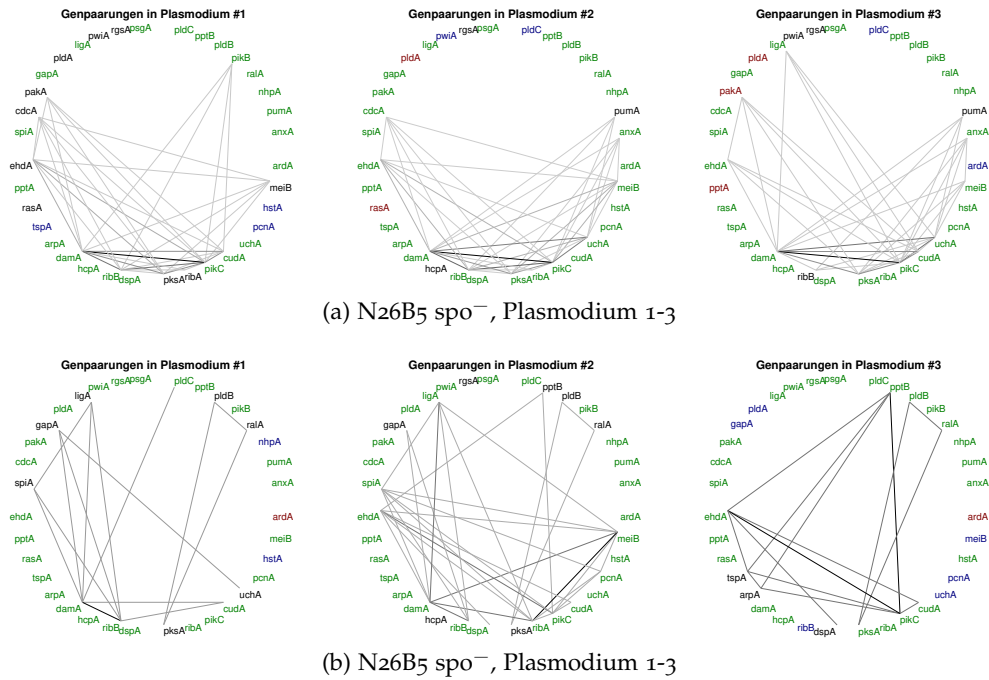


Abbildung 2.28: Kreisplot für nicht sporulierte Plasmodien des Stammes N26B5 im Zeitschritt DK  $\rightarrow$  4 h nach Induktion (a) und 4 h  $\rightarrow$  8 h nach Induktion (b)

Dargestellt sind die Kreisplots der Clusteranalyse für jeweils drei typische Plasmodien aus zwei aufeinanderfolgenden Zeitschritten. Genpaare, die in den Einzelplasmodien zusammen in einem oder mehr Clustern auftraten, sind miteinander verbunden. Die Stärke der Linie korreliert mit der Häufigkeit, mit der die Genpaare in den Clustern eines Datensatzes auftraten. Ein benutzerdefinierter Schwellwert definiert die  $x$ -fache Regulation der Expressionslevel. Rot:  $x$ -fache Hochregulation, Blau:  $x$ -fache Herunterregulation, Grün: nicht reguliert, Schwarz: Expressionswert nicht detektierbar.

In Abbildung 2.29 sind die Ergebnisse der Clusteranalyse für den unbelichteten Stamm N26B5 dargestellt. Es wurden auch hier aus allen analysierten Plasmodien drei Zellen ausgewählt, die ein für diesen Datensatz typisches Verhalten zeigen. Da diese Plasmodien nicht belichtet wurden, wird als zeitlicher Beginn der Analyse der Zeitpunkt der ersten Probenahme angenommen. Abbildung 2.29, A zeigt die Kreisplots für den Zeitschritt von der Dunkelkontrolle zu vier Stunden nach Start und Abbildung 2.29, B die Abbildungen für den Zeitschritt von vier Stunden nach Start zu acht Stunden nach Start. Es ist deutlich zu erkennen, dass in beiden analysierten Zeitschritten nur sehr wenig bis keine Korrelationen zwischen den Genen auftraten. Weiterhin konnten nur einige wenige differentiell regulierte Gene in diesen Datensätzen identifiziert werden. Die Clusterdaten, auf denen die hier gezeigten Plots beruhen, sind in Tabelle 2.9 aufgeführt.

Tabelle 2.9: Clusterdaten N26B5 Dunkelkontrolle

Cluster Nr.	%	Pl <sub>1</sub>	Pl <sub>2</sub>	Pl <sub>3</sub>	Pl <sub>4</sub>	Pl <sub>5</sub>	Pl <sub>6</sub>	Pl <sub>7</sub>	Pl <sub>8</sub>	Pl <sub>9</sub>	Pl <sub>10</sub>	Pl <sub>11</sub>	Pl <sub>12</sub>	Pl <sub>13</sub>	Pl <sub>14</sub>	Pl <sub>15</sub>	Gene	P
oh-4h																		
1	40	1	0	1	1	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	1	<i>pldB, ribA</i>	$8.56 \cdot 10^{-10}$
2	47	1	0	1	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0	1	<i>pldB, ribA</i>	$8.56 \cdot 10^{-10}$
3	40	1	0	1	1	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	1	<i>pumA, ribA</i>	$8.56 \cdot 10^{-10}$
4	40	1	1	0	0	0	0	1	0	1	0	0	1	1	1	0	<i>meiB, ribB</i>	$2.95 \cdot 10^{-11}$
5	40	1	1	0	0	0	1	1	0	0	0	0	1	0	1	0	<i>meiB, ribB</i>	$8.56 \cdot 10^{-10}$
6	47	1	1	1	1	0	1	1	0	0	0	0	0	0	1	0	<i>uchA, ribB</i>	$8.56 \cdot 10^{-10}$
4h-8h																		
1	47	0	1	1	1	1	0	0	0	1	0	0	1	0	1	0	<i>pldB, meiB</i>	$2.95 \cdot 10^{-11}$
2	40	0	1	0	0	1	1	1	0	1	0	0	0	1	0	0	<i>pumA, ligA</i>	$8.56 \cdot 10^{-10}$
3	40	0	0	0	0	1	1	1	0	1	0	0	0	1	0	1	<i>pumA, ligA</i>	$8.56 \cdot 10^{-10}$
4	47	0	1	0	0	1	1	0	0	1	0	1	0	1	0	1	<i>ehdA, ligA</i>	$2.95 \cdot 10^{-11}$

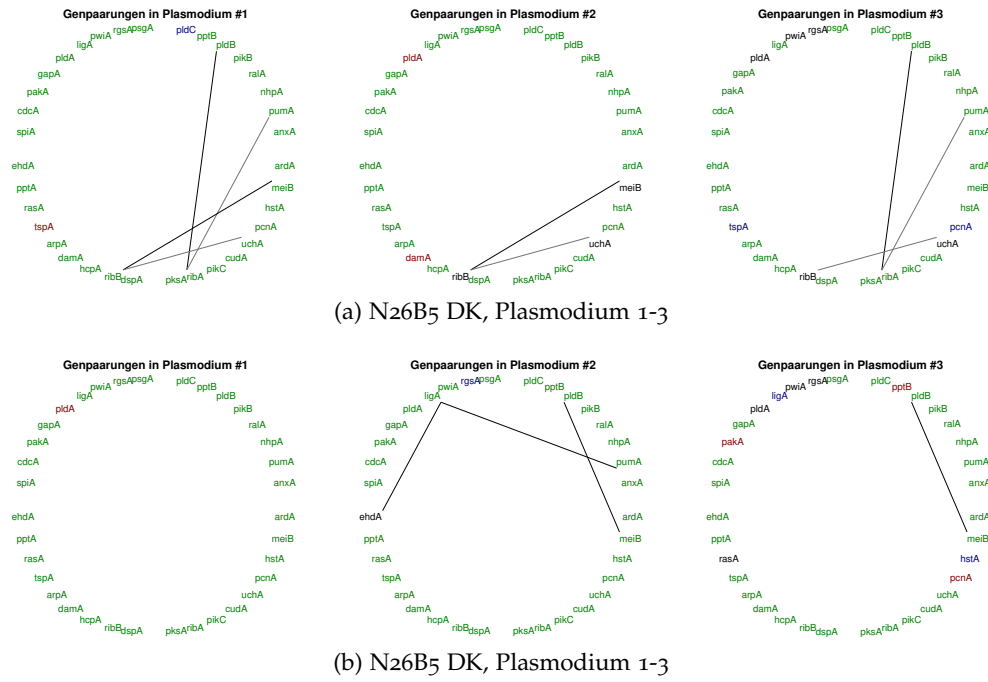


Abbildung 2.29: Kreisplot für die Dunkelkontrolle des Stammes N26B5 im Zeitschritt DK → 4 h nach Start und 4 h → 8 h nach Start

Dargestellt sind die Kreisplots der Clusteranalyse für jeweils drei typische Plasmodien aus zwei aufeinanderfolgenden Zeitschritten. Genpaare, die in den Einzelplasmodien zusammen in einem oder mehr Clustern auftraten, sind miteinander verbunden. Die Stärke der Linie korreliert mit der Häufigkeit, mit der die Genpaare in den Clustern eines Datensatzes auftraten. Ein benutzerdefinierter Schwellwert definiert die  $x$ -fache Regulation der Expressionslevel. Rot:  $x$ -fache Hochregulation, Blau:  $x$ -fache Herunterregulation, Grün: nicht reguliert, Schwarz: Expressionswert nicht detektierbar.

## 2.4.2.2 Clusteranalyse für den Stamm N11D4

Die Analyse des Mutantenstammes N11D4 wurde ebenfalls mit den in Kapitel 2.4.2 aufgeführten Parametern durchgeführt. Es zeigte sich, dass in den belichteten Plasmodien des Stammes N11D4 für den Zeitschritt von vier Stunden zu acht Stunden nach Belichtung keine Korrelationen zwischen den betrachteten Genen gefunden werden konnten. Daher sind hier ausschließlich die Ergebnisse des ersten Zeitschrittes von der Dunkelkontrolle zu vier Stunden nach Induktion dargestellt (vgl. Abbildung 2.30). Es wurden aus allen analysierten Plasmodien drei Zellen ausgewählt, die ein für diesen Datensatz typisches Verhalten zeigen. Die Auswertungen zeigen auch hier nur eine sehr geringe Anzahl an Korrelationen in den untersuchten Genen. Diese Ergebnisse spiegeln die Resultate der PCA-Analyse wieder, in der bereits gezeigt wurde, dass die Plasmodien der Sporulationsmutante N11D4 nur bis zu vier Stunden nach Belichtung in geringem Maße auf einen Lichtimpuls reagieren und anschließend in einem stabilen Zustand verharren. Die Clusterdaten, auf deren Grundlage die Plots erstellt wurden, sind in Tabelle 2.10 dargestellt.

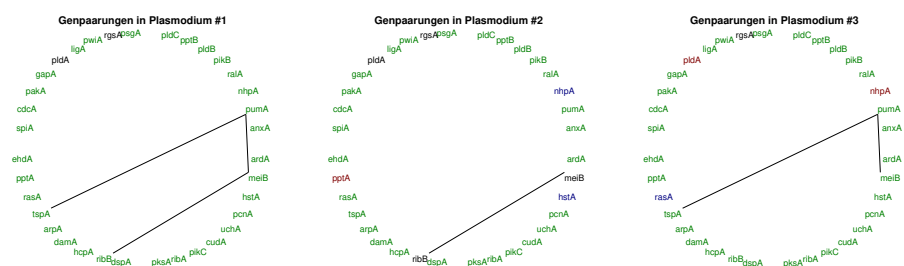


Abbildung 2.30: Kreisplot für die belichteten Plasmodien des Stammes N11D4 im Zeitschritt DK → 4 h nach Induktion

Dargestellt sind die Kreisplots der Clusteranalyse für drei typische Plasmodien der Mutante N11D4. Genpaare, die in den Einzelplasmodien zusammen in einem oder mehr Clustern auftreten, sind miteinander verbunden. Die Stärke der Linie korreliert mit der Häufigkeit, mit der die Genpaare in den Clustern eines Datensatzes auftreten. Ein benutzerdefinierter Schwellwert definiert die  $x$ -fache Regulation der Expressionslevel. Rot:  $x$ -fache Hochregulation, Blau:  $x$ -fache Herunterregulation, Grün: nicht reguliert, Schwarz: Expressionswert nicht detektierbar.

Tabelle 2.10: Clusterdaten Nr1D4 belichtet

Cluster Nr.	%	Pl1	Pl2	Pl3	Pl4	Pl5	Pl6	Pl7	Pl8	Pl9	Pl10	Pl11	Pl12	Pl13	Pl14	Pl15	Gene	P
oh - 4 h																		
1	47	1	0	1	0	0	0	1	0	1	1	1	0	0	1	0	<i>pumA, meiB</i>	$3.08 \cdot 10^{-08}$
2	47	1	0	1	0	1	1	0	0	1	0	1	0	0	1	0	<i>pumA, tspA</i>	$3.08 \cdot 10^{-08}$
3	40	1	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	1	0	1	<i>meiB, ribB</i>	$2.78 \cdot 10^{-07}$

Die Analyse der unbelichteten Plasmodien der Mutante N11D4 ist in Abbildung 2.31 dargestellt. Erneut wurden aus jedem Zeitschritt drei Plasmodien ausgewählt, die ein für diesen Datensatz typisches Verhalten zeigen. Die Analyseergebnisse verdeutlichen, dass die Anzahl der Korrelationen in den unbelichteten Plasmodien von N11D4 von Zeitschritt 1 (Dunkelkontrolle-4 h nach Start) zu Zeitschritt 2 (4 h nach Start zu 8 h nach Start) stark abnehmen. Es ist deutlich zu erkennen, dass sich die Knotenpunkte *psgA*, *gapA* und *ehdA* in den Genexpressionsverhältnissen von vier Stunden zu acht Stunden nach Induktion (vgl. Abbildung 2.31, B) auflösen. Jedoch bleibt in beiden Zeitschritten die Korrelation aus den Genen *anxA*, *meiB* und *cudA* bestehen. Diese Beobachtung deckt sich mit den Ergebnissen der PCA-Analyse aus Kapitel 2.2.2. Dort konnte beobachtet werden, dass sich die Plasmodien dieses Stammes bis hin zu vier Stunden nach Belichtung auf einen spezifischen Zustand fokussieren, den sie bis zum Ende des Beobachtungszeitraumes nicht mehr verlassen.

Auffällig ist in diesen Auswertungen jedoch, dass in den Analyseergebnissen der unbelichteten Plasmodien von N11D4 deutlich mehr Korrelationen auftreten als in den belichteten Plasmodien desselben Stammes (vgl. Abbildung 2.30). Diese Unterschiede könnten auf die Lokalisation des durch die Mutation verursachten Defektes in der Regulationskaskade der Sporulation zurückzuführen sein. Die Clusterdaten, auf deren Grundlage die Plots erstellt wurden, sind in Tabelle 2.11 dargestellt.



Tabelle 2.11: Clusterdaten N<sub>11</sub>D<sub>4</sub> Dunkelkontrolle, Teil A

Cluster Nr.	%	Pl <sub>1</sub>	Pl <sub>2</sub>	Pl <sub>3</sub>	Pl <sub>4</sub>	Pl <sub>5</sub>	Pl <sub>6</sub>	Pl <sub>7</sub>	Pl <sub>8</sub>	Pl <sub>9</sub>	Pl <sub>10</sub>	Pl <sub>11</sub>	Pl <sub>12</sub>	Pl <sub>13</sub>	Pl <sub>14</sub>	Pl <sub>15</sub>	Gene	P
0 h - 4 h																		
1	40	1	1	1	0	0	0	0	1	0	0	1	1	0	0	0	<i>psgA, anxA, meiB, cudA</i>	$6.27 \cdot 10^{-28}$
2	40	0	1	1	0	0	0	0	1	0	0	1	1	1	0	0	<i>psgA, anxA, meiB, cudA</i>	$6.27 \cdot 10^{-28}$
3	47	1	1	1	0	0	1	0	1	0	0	1	1	0	0	0	<i>psgA, meiB</i>	$2.95 \cdot 10^{-11}$
4	53	0	1	1	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	0	0	<i>psgA, meiB</i>	$1.05 \cdot 10^{-12}$
5	40	1	1	0	0	0	1	0	1	0	0	1	1	0	0	0	<i>psgA, meiB, cudA</i>	$7.32 \cdot 10^{-19}$
6	40	1	0	1	0	0	1	0	1	0	0	1	1	0	0	0	<i>psgA, meiB, damA</i>	$7.32 \cdot 10^{-19}$
7	40	1	0	0	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	1	<i>psgA, ligA</i>	$8.56 \cdot 10^{-10}$
8	40	1	0	1	0	0	0	0	0	1	1	0	1	1	0	0	<i>pikB, meiB</i>	$8.56 \cdot 10^{-10}$
9	40	1	1	0	0	0	0	0	1	0	0	1	1	0	0	1	<i>pumA, anxA, meiB, cudA</i>	$6.27 \cdot 10^{-28}$
10	47	1	0	0	1	0	1	0	1	0	0	1	1	0	0	1	<i>pumA, meiB</i>	$2.95 \cdot 10^{-11}$
11	40	1	0	0	0	0	1	0	1	1	0	1	1	0	0	0	<i>pumA, meiB</i>	$8.56 \cdot 10^{-10}$
12	40	1	0	0	0	0	1	0	1	0	0	1	1	0	0	1	<i>pumA, meiB, cudA</i>	$7.32 \cdot 10^{-19}$
13	40	1	0	0	0	0	1	0	0	1	0	1	1	0	0	1	<i>pumA, cudA</i>	$8.56 \cdot 10^{-10}$
14	40	0	1	1	1	0	0	0	1	0	0	0	1	1	0	0	<i>anxA, meiB</i>	$8.56 \cdot 10^{-10}$
15	40	0	1	1	1	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	1	<i>anxA, meiB</i>	$8.56 \cdot 10^{-10}$

Tabelle 2.12: Clusterdaten Nr1D4 Dunkelkontrolle, Teil B

Cluster Nr.	%	P11	P12	P13	P14	P15	P16	P17	P18	P19	P110	P111	P112	P113	P114	P115	Gene	P
o h - 4 h																		
16	47	1	1	1	0	0	0	0	1	0	0	1	1	1	0	0	<i>anxA, meiB, cuda</i>	$8.71 \cdot 10^{-22}$
17	47	1	1	1	0	0	0	0	1	0	0	1	1	0	0	1	<i>anxA, meiB, cuda</i>	$8.71 \cdot 10^{-22}$
18	40	1	1	0	0	0	0	0	1	0	0	1	1	1	0	0	<i>anxA, meiB, cuda, ehfA</i>	$6.27 \cdot 10^{-28}$
19	40	1	1	1	0	0	0	0	1	0	0	1	0	1	0	0	<i>anxA, meiB, cuda, gapA</i>	$6.27 \cdot 10^{-28}$
20	40	1	1	1	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	1	1	<i>anxA, meiB, cuda, gapA</i>	$6.27 \cdot 10^{-28}$
21	53	1	1	1	0	0	0	0	1	0	0	1	1	1	0	1	<i>anxA, cuda</i>	$1.05 \cdot 10^{-12}$
22	53	1	1	0	0	0	0	0	1	0	0	1	1	1	1	1	<i>anxA, cuda</i>	$1.05 \cdot 10^{-12}$
23	47	1	1	1	0	0	0	0	1	0	0	1	0	1	0	1	<i>anxA, cuda, gapA</i>	$8.71 \cdot 10^{-22}$
24	40	1	1	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	<i>anxA, pikC</i>	$8.56 \cdot 10^{-10}$
25	40	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	1	1	1	0	0	<i>anxA, cdhA</i>	$8.56 \cdot 10^{-10}$
26	40	1	1	0	0	0	0	0	1	1	0	1	0	1	0	0	<i>meiB, penA</i>	$8.56 \cdot 10^{-10}$
27	47	1	1	0	0	0	1	0	1	0	0	1	1	1	0	0	<i>meiB, cuda</i>	$2.95 \cdot 10^{-11}$
28	47	1	1	0	0	0	1	0	1	0	0	1	1	0	0	1	<i>meiB, cuda</i>	$2.95 \cdot 10^{-11}$
29	40	1	0	0	0	0	1	0	0	1	0	1	1	1	0	0	<i>meiB, cuda</i>	$8.56 \cdot 10^{-10}$
30	40	1	1	1	0	0	0	0	1	1	0	0	0	1	0	0	<i>meiB, pikC</i>	$8.56 \cdot 10^{-10}$
31	40	1	1	0	0	0	0	0	1	1	0	1	1	0	0	0	<i>meiB, ribA</i>	$8.56 \cdot 10^{-10}$
32	40	1	1	0	1	0	0	0	1	0	0	1	1	0	0	0	<i>meiB, ribA, ehfA</i>	$7.32 \cdot 10^{-19}$
33	40	1	0	1	0	0	1	0	0	0	1	1	1	0	0	0	<i>meiB, ribB</i>	$8.56 \cdot 10^{-10}$

Tabelle 2.13: Clusterdaten N11D4 Dunkelkontrolle, Teil C

Cluster Nr.	%	Pl1	Pl2	Pl3	Pl4	Pl5	Pl6	Pl7	Pl8	Pl9	Pl10	Pl11	Pl12	Pl13	Pl14	Pl15	Gene	P
0 h - 4 h																		
34	40	1	0	0	0	0	1	0	0	0	1	1	1	1	0	0	<i>meiB, ribB</i>	$8.56 \cdot 10^{-10}$
35	47	1	1	0	1	0	0	0	1	0	0	1	1	1	0	0	<i>meiB, ehdA</i>	$2.95 \cdot 10^{-11}$
36	40	0	0	1	0	0	1	0	1	0	0	1	1	1	0	0	<i>meiB, cdcA</i>	$8.56 \cdot 10^{-10}$
37	47	1	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0	0	0	1	1	<i>meiB, ligA</i>	$2.95 \cdot 10^{-11}$
38	40	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	1	1	0	0	<i>cuda, ribb</i>	$8.56 \cdot 10^{-10}$
39	40	0	1	0	0	0	1	0	1	0	0	1	0	1	1	1	<i>cuda, ehdA</i>	$8.56 \cdot 10^{-10}$
40	40	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	1	1	1	<i>cuda, ehdA</i>	$8.56 \cdot 10^{-10}$
41	40	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	1	1	1	1	0	<i>cuda, cdcA</i>	$8.56 \cdot 10^{-10}$
4 h - 8 h																		
1	40	0	0	0	1	0	0	0	1	0	1	1	1	1	0	0	<i>psgA, ehdA</i>	$8.57 \cdot 10^{-10}$
2	47	0	1	1	1	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0	1	<i>anxA, meiB</i>	$2.95 \cdot 10^{-11}$
3	40	1	1	1	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	1	<i>anxA, meiB, cuda</i>	$7.32 \cdot 10^{-19}$
4	40	0	1	1	1	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0	<i>anxA, meiBA, cuda</i>	$7.32 \cdot 10^{-19}$
5	40	0	1	1	1	0	0	0	0	1	0	1	0	0	1	1	<i>anxA, meiB, cuda</i>	$7.32 \cdot 10^{-19}$
6	47	1	1	1	1	0	0	0	0	1	0	1	0	0	1	1	<i>anxA, cuda</i>	$2.95 \cdot 10^{-11}$
7	40	0	1	1	1	0	0	1	1	0	0	1	0	0	0	0	<i>meiB, ribB</i>	$8.57 \cdot 10^{-10}$
8	40	0	1	1	1	0	0	0	1	0	1	1	0	0	0	0	<i>meiB, ribB</i>	$8.57 \cdot 10^{-10}$
9	40	0	1	0	1	0	0	1	1	0	0	1	0	0	1	1	<i>meiB, ribB</i>	$8.57 \cdot 10^{-10}$
10	40	1	1	1	1	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	<i>meiB, ligA</i>	$8.57 \cdot 10^{-10}$

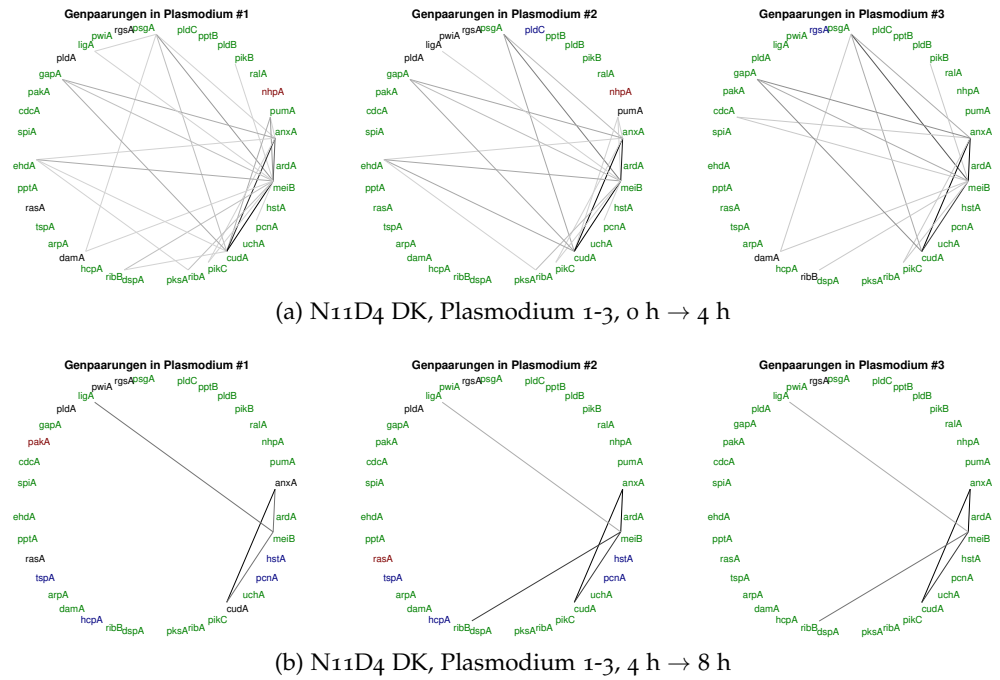


Abbildung 2.31: Kreisplot für unbelichtete Plasmodien der Mutante N<sub>11</sub>D<sub>4</sub> im Zeitschritt DK → 4 h nach Start und 4 h → 8 h nach Start

Dargestellt sind die Kreisplots der Clusteranalyse für jeweils drei typische Plasmodien aus zwei aufeinanderfolgenden Zeitschritten. Genpaare, die in den Einzelplasmodien zusammen in einem oder mehr Clustern auftraten, sind miteinander verbunden. Die Stärke der Linie korreliert mit der Häufigkeit, mit der die Genpaare in den Clustern eines Datensatzes auftraten. Ein benutzerdefinierter Schwellwert definiert die  $x$ -fache Regulation der Expressionslevel. Rot:  $x$ -fache Hochregulation, Blau:  $x$ -fache Herunterregulation, Grün: nicht reguliert, Schwarz: Expressionswert nicht detektierbar.

Mithilfe dieses Clusteralgorithmus konnten experimentell Effekte nachgewiesen werden, die sich im Rahmen der von Waddington (Waddington, 1957) beschriebenen epigenetischen Landschaft interpretieren lassen. Es konnte gezeigt werden, dass Plasmodien, die sich in unterschiedlichen Stadien der Differenzierung befinden, spezifische und stabile Genexpressionsmuster aufweisen. Es konnte ebenfalls nachgewiesen werden, dass die Wege, auf denen sich die Zellen durch diese Landschaft bewegen, von Plasmodium zu Plasmodium unterschiedlich sein können. Deutlich werden diese Effekte durch die Überlappung der Genexpressionscluster in den vorgestellten Analysen. Diese Ergebnisse lassen darauf schließen, dass bestimmte Korrelationen an Genen essentiell für das Erreichen eines spezifischen Differenzierungszustandes sind. Es treten jedoch zusätzlich eine Vielzahl an optionalen Differenzierungswegen und genspezifischen Korrelationen auf. Diese beschreiben die individuellen Wege, auf denen

sich die Plasmodien durch diese Differenzierungslandschaft bewegen, um schlussendlich in einem ausdifferenzierten Zustand zu verharren.

### 2.4.3 Netzwerkrekonstruktion anhand von Clusterdaten

Die in Kapitel 2.4.2 berechneten Genexpressionscluster sollen zukünftig dazu dienen, Teile des Sporulationsnetzwerkes rekonstruieren zu können. Zur Darstellung dieser Netzwerkteile sollen Petri-Netze verwendet werden (vgl. Kapitel 5.17). Petri-Netze erlauben es durch ihre grafische Darstellungsweise biologische Modelle und Systeme einfach und intuitiv abzubilden und anschließend die Struktur, die Systemeigenschaften und das zeitabhängige, dynamische Verhalten des entstandenen Modells zu analysieren (Heiner, Gilbert und Donaldson, 2008).

Es sollte nun überprüft werden, ob eine Rekonstruktion des Sporulationsnetzwerkes mit Petri-Netzen möglich ist. Dazu wurde versucht, Teile des Netzwerkes anhand der Clusterergebnisse der belichteten und sporulierten Plasmodien des Stammes N26B5 (vgl. Tabelle 2.5) exemplarisch nachzubilden. Dabei wurden die einzelnen Gene bzw. Gengruppen und Rezeptoren als Plätze dargestellt. Prozesse, die zur Regulation bestimmter Gene oder Proteine führen, wurden als Transitionen symbolisiert. Plätze und Transitionen wurden entsprechen der Syntax zur Erstellung von Petri-Netzen mit Kanten verbunden. Abbildung 2.32 zeigt das rekonstruierte Netzwerk für die Clusterdaten des Zeitschrittes DK – 4 h nach Belichtung. Die Differenzierung der Zellen wird auch in diesem Modell über einen Rotlichtimpuls (*FR\_Pulse\_on*) gesteuert. Dieser Rotlichtimpuls wird wiederum über die Transition *Light\_on* aktiviert. Diese Transition feuert, wenn die Plätze *Number\_of\_Pulses* und *FR\_pulse\_off* aktiv sind. Die somit aktivierte Transition für den Rotlichtimpuls ermöglicht die Generierung eines entsprechenden Photoproduktes, welches verschiedene Signalwege der zellulären Differenzierung in den untersuchten Plasmodien aktiviert. Aus den berechneten Clusterdaten für diesen Zeitabschnitt wurde ersichtlich, dass einige der Gene mit zwei unterschiedlichen Genen zusammen in zwei separaten Clustern auftraten. So zum Beispiel die Cluster (*pksA*, *ehdA*) und (*pksA*, *pcnA*). Diese Daten deuten darauf hin, dass es für einige Gene zwei alternative Signalwege gibt, die im Verlauf des Differenzierungsvorganges beschritten werden können. Somit wurde der weitere Verlauf des Sporulationsnetzwerkes in verschiedene Aktivatoren aufgeteilt, die jeweils einen dieser zuvor beschriebenen alternativen Wege aktivieren können. Von diesen vier Aktivatoren steuern drei eine solche Aufspaltung oder Bifurkation in der Signalkaskade. Diese alternativen Signalwege sind für Aktivator 1: *pksA* – *ehdA* und *pksA* – *pcnA*, für Aktivator 3: *cudA* – *spiA* und *cudA* – *arpA* und für Aktivator

4: *meiB* – *pakA* und *meiB* – *pptB*. Lediglich für das Cluster *pldB* – *ralA*, welches über Aktivator 2 gesteuert wird, konnte in diesem Datensatz keine Verzweigung des Netzwerkes beobachtet werden.

Anschließend sollten Teile des Regulationsnetzwerkes für den zweiten Zeitschritt (4 h – 8 h nach Belichtung) aus den in Tabelle 2.6 dargestellten Clusterdaten rekonstruiert werden. Der resultierende Petri-Netz-Graph ist in Abbildung 2.33 dargestellt. Die Clusterdaten dieser Analyse zeigen bereits durch die höhere Anzahl von Clustern und den zugehörigen Genen, dass das Netzwerk in diesem Zeitschritt ein komplexeres Verhalten zeigt als im Zeitschritt zuvor. Die Aktivierung des Differenzierungsvorganges wurde auch in diesem Netzwerk wie im vorhergehenden Zeitschritt (vgl. Abbildung 2.32) realisiert. Bei Betrachtung der Clustertabelle wurde deutlich, dass sich die untersuchten Plasmodien klar in zwei spezifische Gruppen aufteilen lassen, die in separaten Clustern auftreten. Die erste Gruppe setzt sich aus den Plasmodien 1, 3, 4, 5 und 9 und die zweite Gruppe aus den Plasmodien 2, 6, 7 und 8 zusammen. Diese Auftrennung der beteiligten Plasmodien deutet darauf hin, dass es in diesem Netzwerk zwei Hauptwege für die Signalleitung zu geben scheint. Daher wurde das Netzwerk so konstruiert, dass das Sporulationssignal über nur zwei Aktivatoren weitergeleitet wird. Aktivator 1 steuert die gemeinsame Regulation der Gene *ardA* und *pcnA*. Der Signalweg, der über Aktivator 2 vermittelt wird, ist weitaus komplexer. Hier läuft die Signalkaskade für alle Genexpressionscluster zunächst über das Gen *uchA*. Anschließend entstehen kleinere Cluster aus zwei Genen wie zum Beispiel *uchA* – *damA*, *uchA* – *pldA*, oder *uchA* – *ribB*. Einige dieser Cluster treten zusätzlich auch in Kombination auf. Das heißt es entstehen Genregulationscluster wie *uchA* – *damA* – *pldA* – *ribB*.

Die beiden hier rekonstruierten Teile des Sporulationsnetzwerkes in *Physarum polycephalum* verdeutlichen noch einmal auf eine sehr anschauliche Art und Weise, dass die Vernetzung der einzelnen Gene untereinander im Verlauf des Differenzierungsvorganges in sporulierten Zellen zunimmt. Diese Darstellung spiegelt auch noch einmal die Ergebnisse der Kreisplots aus Kapitel 2.4.2 wider. Die manuelle Erstellung der Petri-Netze gestaltet sich bei zunehmender Größe der Clustertabellen jedoch als schwierig. Hier sollten zukünftig Lösungen gefunden werden, die Netzwerkgraphen automatisch aus den berechneten Clustertabellen zu rekonstruieren.

Es konnte jedoch gezeigt werden, dass die Rekonstruktion dieser Netzwerkteile möglich ist und das Sporulationsnetzwerk für zukünftige Analysen übersichtlich dargestellt und modelliert werden kann.

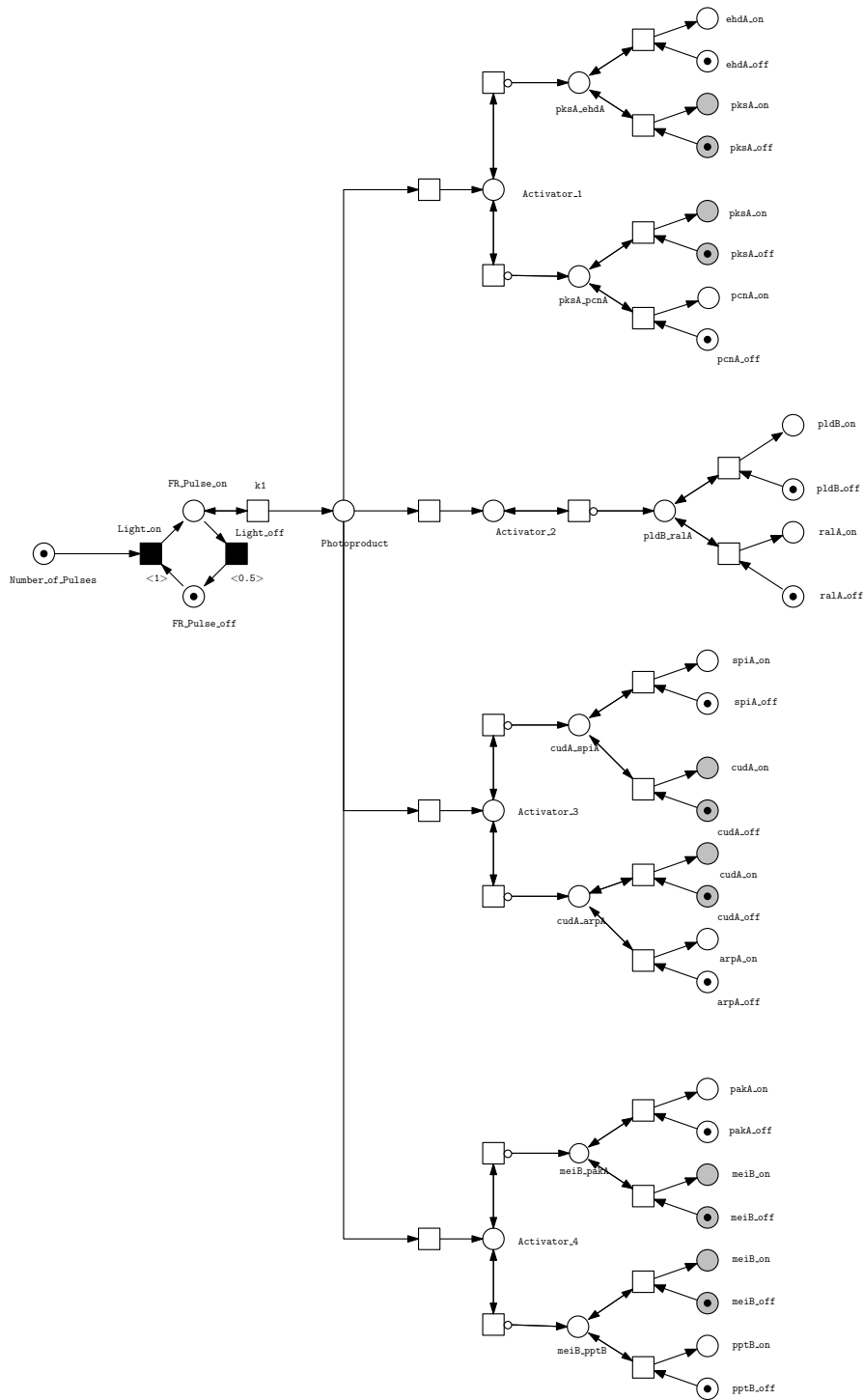


Abbildung 2.32: Petri-Netz-Rekonstruktion für sporulierte Plasmodien des Stammes N26B5

*Dargestellt ist das rekonstruierte Petri-Netz für den Stamm N26B5 im Zeitschritt zwischen der Dunkelkontrolle und vier Stunden nach Belichtung. Das Netzwerk wurde aus den in Tabelle 2.6 aufgelisteten Clusterdaten rekonstruiert. Erläuterungen im Text.*

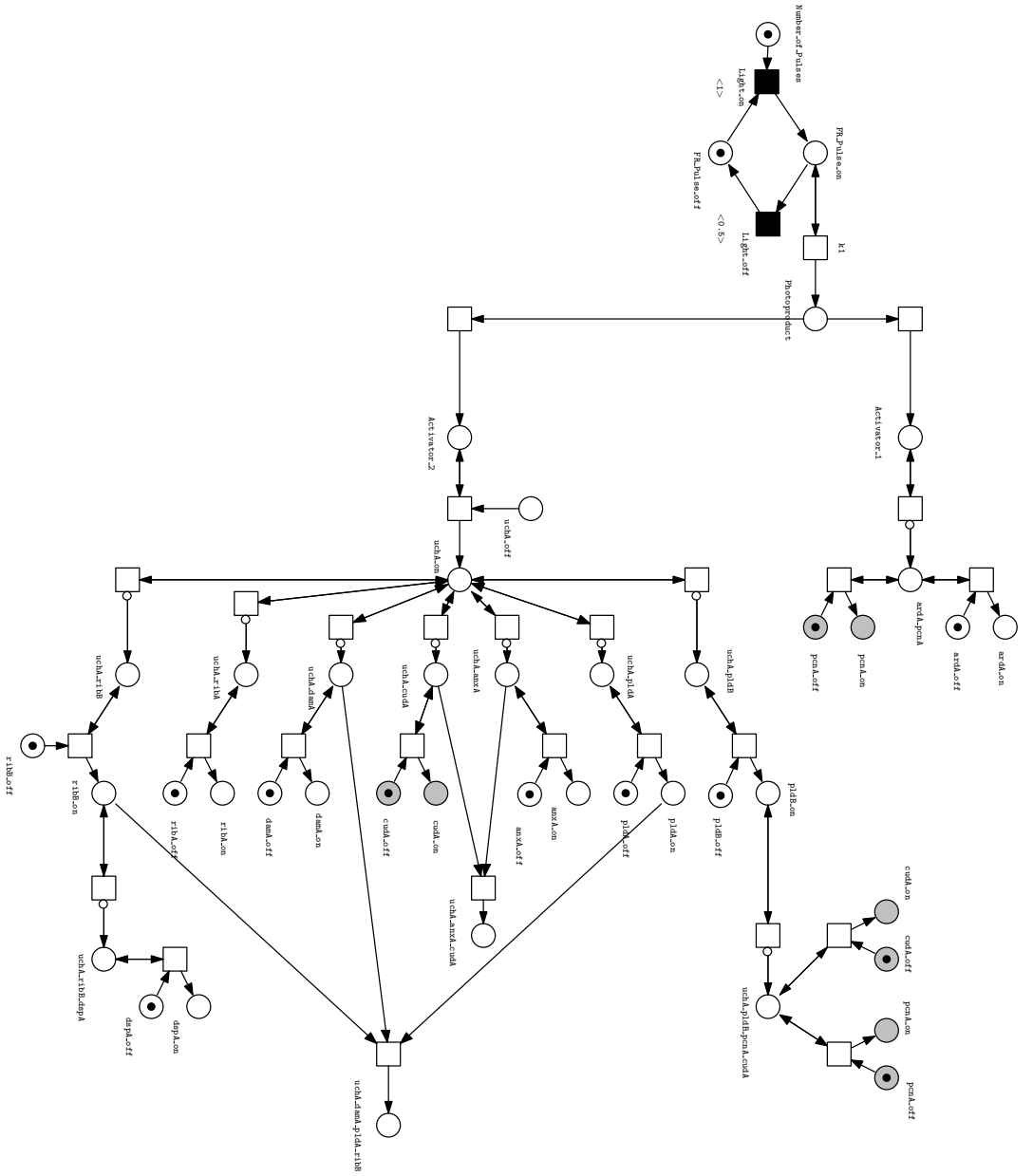


Abbildung 2.33: Petri-Netz-Rekonstruktion für sporulierte Plasmodien des Stammes N26B5

Dargestellt ist das rekonstruierte Petri-Netz für den Zeitschritt zwischen der vier Stunden und acht Stunden nach Belichtung. Das Netzwerk wurde aus den in Tabelle 2.5 aufgelisteten Clusterdaten rekonstruiert. Erläuterungen im Text.



#### 2.4.4 Validierung des Clusteralgorithmus

Es sollte nun eine Möglichkeit entwickelt werden, um die Wahrscheinlichkeit zu berechnen, dass das Auftreten spezifischer Cluster in den analysierten Datensätzen zufällig erfolgt. Anhand dieser Berechnungen sollte belegt werden, dass es sich bei den vom Algorithmus angezeigten Ergebnissen nicht um zufällige Korrelationen, sondern um für die untersuchten Mutantenstämme spezifische Regulationsmuster handelt.

##### 2.4.4.1 Berechnung von Wahrscheinlichkeiten

Um die Wahrscheinlichkeiten für das zufällige Auftreten dieser Genexpressionscluster berechnen zu können, wurde angenommen, dass es sich bei den ermittelten Clusterkombinationen um eine spezifische Anzahl von Genen handelt, die zufällig auf eine bestimmte Anzahl von Plasmodien aufgeteilt werden. Die Berechnung erfolgte unter diesen getroffenen Annahmen durch einen kombinatorischen Ansatz, der in Gleichung 2.2 dargestellt ist.

$$p = \frac{\binom{n}{k} * k! * (n - k)!^g}{(n!)^g} \quad (2.2)$$

Dabei gibt  $n$  die Anzahl der analysierten Plasmodien für den jeweiligen Datensatz,  $k$  die Anzahl der Plasmodien, in denen das spezifische Cluster auftrat und  $g$  die Anzahl der Gene in dem jeweiligen Cluster an. Die Berechnung der Wahrscheinlichkeiten soll hier am Beispiel von Cluster Nr. 1 aus Tabelle 2.5 erläutert werden.

Zu Cluster Nr. 1 dieses Datensatzes wurden 2 Gene (*pptB* und *meiB*) zugeordnet, wobei dieses Cluster in 4 von insgesamt 9 analysierten Plasmodien auftrat. Somit ergab sich die Wahrscheinlichkeit des zufälligen Auftretens dieses Clusters mit folgender Gleichung:

$$p_{pptB,meiB} = \frac{\binom{9}{4} * 4! * (5!)^2}{(9!)^2}$$

$$p_{pptB,meiB} = 3,3 * 10^{-4}$$

Das Ergebnis der Berechnung für Cluster Nr. 1 zeigt deutlich, dass die Wahrscheinlichkeit für das zufällige Auftreten eines solchen Clusters mit einem Wert von  $p_{pptB,meiB} = 3,3 * 10^{-4}$  sehr gering ist und es sich dabei um einen für diesen Datensatz spezifischen Signalweg handeln muss.

In einem weiteren Schritt soll das oben beschriebene Phänomen der Überlagerung von Clustern in einem Datensatz weiter analysiert werden. Dieses Problem wird durch das folgende Beispiel veranschaulicht: Es tritt in einem analysierten Datensatz ein Cluster aus den drei Genen A – B – C auf. Zusätzlich zu diesem Cluster werden jedoch auch die Paarungen A – B, B – C und A – C gefunden. Es soll nun untersucht werden, inwiefern das Dreier-Cluster A – B – C nur eine zufällige Kombination der drei Cluster A – B, B – C und A – C ist, oder ob es sich dabei um einen unabhängigen, alternativen Signalweg handelt. Die Wahrscheinlichkeit, dass es sich bei dem analysierten Dreier-Cluster um einen unabhängigen Signalweg handelt, kann, wie bereits erläutert, mit Gleichung 2.2 berechnet werden. Die Wahrscheinlichkeit, dass es sich dabei nur um eine zufällige Überlagerung der drei Einzelcluster handelt, kann ermittelt werden, indem die nach Gleichung 2.2 ermittelten Wahrscheinlichkeiten für das zufällige Auftreten der Einzelcluster miteinander multipliziert werden. Es ergibt sich daraus folgender Rechenansatz:

$$P_{(A-B-C)} = P_{(A-B)} * P_{(B-C)} * P_{(A-C)} \quad (2.3)$$

Diese Berechnung soll hier am Beispiel des Clusters 12 (*pumA* – *meiB* – *cudA*) aus Tabelle 2.11 nachvollzogen werden. Die Berechnung der Wahrscheinlichkeiten für das zufällige Auftreten der Teilcluster erfolgte wie bereits beschrieben nach Gleichung 2.2. Die Berechnung ergab folgende Werte:  $p_{pumA, meiB} = 2,78 * 10^{-7}$ ,  $p_{pumA, cudA} = 2,78 * 10^{-7}$  und  $p_{meiB, cudA} = 3,08 * 10^{-8}$ . Zur Berechnung der Wahrscheinlichkeit, dass es sich bei diesem Cluster aus drei Genen um eine zufällige Kombination handelt, werden diese Wahrscheinlichkeiten nach Gleichung 2.3 multipliziert. Daraus ergeben sich folgende Werte.

$$P_{pumA, meiB, cudA} = P_{pumA, meiB} * P_{pumA, cudA} * P_{meiB, cudA}$$

$$P_{pumA, meiB, cudA} = 2,38 * 10^{-21}$$

Wird nun die Wahrscheinlichkeit für das Auftreten dieses Clusters als spezifischer Signalweg mit Gleichung 2.2 berechnet, so ergibt sich folgende Wahrscheinlichkeit.

$$P_{pumA, meiB, cudA} = \frac{\binom{15}{6} * 6! * (9!)^3}{(15!)^3}$$

$$P_{pumA, meiB, cudA} = 7,7 * 10^{-14}$$

Die Wahrscheinlichkeit für das Auftreten dieses Genexpressionsclusters als zufällige Kombination der Einzelcluster ist deutlich geringer als die Wahrscheinlichkeit für das Auftreten als spezifisches Cluster. Daher kann davon ausgegangen werden, dass der hier vorgestellte Clusteralgorithmus stamm- und zustandsspezifische Genexpressionscluster liefert, auf deren Grundlage Teile des Regulationsnetzwerkes rekonstruiert werden können. Dabei ist es nun ebenfalls möglich, alternative Signalkaskaden und Abzweigungen aus den Überlappungen der Clusterdaten abzuleiten und somit das Regulationsnetzwerk zur zellulären Differenzierung in *P. polycephalum* in einer Genauigkeit zu rekonstruieren, die in vorherigen Analysen noch nicht möglich gewesen war. Die hier dargestellten Methoden zur Wahrscheinlichkeitsrechnung wurden mit Hilfe von Frau Christina Stöhr<sup>1</sup> und Frau Kerstin Reckrühm<sup>1</sup> erarbeitet.

## 2.5 VALIDIERUNG DES EXPRESS-PROFILING KITSYSTEMS

Genexpressionsanalysen erlauben die simultane Untersuchung der Funktion eines oder mehrerer Gene und ermöglichen so die Rekonstruktion von Signaltransduktionsnetzwerken, die Kartierung von Expressionlevel-Polymorphismen und unterstützen das Forschungsgebiet der molekularen Medizin in der Diagnose und Behandlung von Krankheiten wie Diabetes oder Krebs (Hayashi u. a., 2005).

Bis zum jetzigen Zeitpunkt wurden die Genexpressionsanalysen am Lehrstuhl für Regulationsbiologie der Universität Magdeburg<sup>2</sup> mit dem GenomeLab GeXP™ Genetic Analysis System der Firma AB SCIEX (ehem. Beckman Coulter) durchgeführt. Die Analysekosten für eine Probe belaufen sich mit diesem GeXP-Ansatz auf ca. 10 € (Jehrke, 2012). Da jedoch zur Rekonstruktion eines genregulatorischen Netzwerkes viele tausend Proben gemessen und ausgewertet werden müssen, verursacht die Analyse mit dem GeXP-Kit erhebliche Kosten. Aus diesem Grund wurde innerhalb der Arbeitsgruppe in diversen Bachelor- und Masterarbeiten ein alternativer Chemikaliensatz entwickelt, der die RT-PCR-Komponenten des GeXP-Systems zukünftig ersetzen soll.

Frau Lisa Jehrke ist es in ihrer Bachelorarbeit gelungen, eine alternative Reverse Transkriptase zu etablieren, eine alternative Referenz-RNA aus *E. coli* zu isolieren und einen neuen DNA-Größenstandard zur Auftrennung der PCR-Produkte in der Kapillarelektrophorese herzustellen (Jehrke, 2012). In der Bachelorarbeit von Herrn Jan

<sup>1</sup> Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg, Institut für Mathematische Stochastik, Universitätsplatz 2, 39106 Magdeburg

<sup>2</sup> Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg, Lehrstuhl für Regulationsbiologie, Pfälzer Straße 5 - Gebäude 25, 39106 Magdeburg

Strube wurde diese Arbeit fortgeführt, mit dem Ziel, die Reaktionsbedingungen der PCR-Reaktion zu optimieren. Dazu wurde die Konzentrationen der Komponenten des PCR-Puffers und der pH-Wert, die in der PCR-Reaktion eingesetzten Template-Mengen und dNTP-Konzentrationen optimiert (Strube, 2013). Frau Heike Rummel konnte in ihrer Masterarbeit nach Optimierung der Konzentration der Reversen Transkriptase und der Herstellung einer neuen Referenz-RNA aus *Halobacterium salinarum* zeigen, dass die mit diesem Reaktionsansatz gewonnenen Daten reproduzierbar sind und das System prinzipiell zur Datenanalyse geeignet ist (Rummel, 2014). Dabei konnten die Analysekosten je Probe mit der neuen eXpressProfiling-Methode auf bis zu 1,71 € gesenkt werden (Rummel, 2014).

Auf Grundlage dieser Vorarbeiten sollte das eXpress-Profiling-System nun in dieser Arbeit vollständig optimiert und für die Messung großer Datensätze etabliert werden.

### 2.5.1 Optimierung des Systems und Test auf Einsatzfähigkeit

In den oben beschriebenen Experimenten zur Etablierung eines neuen Kitsystems für Genexpressionsanalysen wurde die PCR-Reaktion mit dem in Kap. 5.14.2 aufgeführten Temperaturprofil und einer Hot-Start Taq-Polymerase durchgeführt. In einer Hot-Start PCR wird die Polymerase der Reaktion erst nach einer Aufwärmphase bei 95 °C zugegeben. Dieses Vorgehen verhindert die Amplifizierung von unspezifischen PCR-Produkten, welche im Anschluss die Auswertung der Fragmentdaten stören können.

Es sollte nun überprüft werden, ob die Zugabetemperatur der Polymerase in die Reaktion einen Einfluss auf die Amplifikationseffizienz des Enzymes besitzt. Dazu wurde die RT-Reaktion mit zwei zufällig gewählten Proben als 3-fach Ansatz durchgeführt. In der PCR wurden diese drei Ansätze beider Proben noch einmal geteilt und die Reaktion jeweils mit einer auf 95 °C vorgeheizten und einer Taq-Polymerase auf Eis bei 4 °C gestartet (vgl. Abb. 2.34).

Aus diesem experimentellen Setup ergeben sich für jede der zwei Proben drei Ansätze mit einer vorgeheizten Taq-Polymerase und einer gekühlten Taq-Polymerase. Diese Ergebnisse wurden in Abb. 2.35 für jeden Ansatz aufgetragen. Es konnten keine Unterschiede zwischen den Proben festgestellt werden, die entweder mit der gekühlten oder der vorgewärmten Taq-Polymerase amplifiziert wurden. Daher wurde sich aus Gründen der besseren Handhabbarkeit im Labor dafür entschieden, die Taq-Polymerase direkt aus –20 °C zu verwenden.

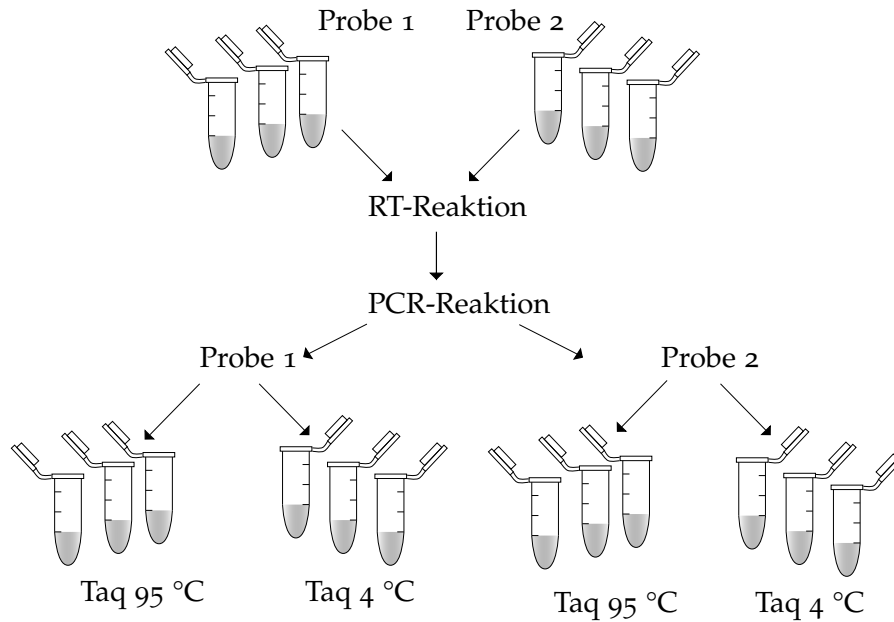


Abbildung 2.34: Testschema zur Analyse des Einflusses unterschiedlicher Zugabetemperaturen der Taq-Polymerase auf die PCR-Reaktion

*Zum Austesten der optimalen Zugabetemperatur der Taq-Polymerase wurde aus zwei zufällig ausgewählten Proben eine RT-Reaktion in einem Dreifachansatz durchgeführt. Anschließend wurde aus jedem Ansatz eine PCR-Reaktion mit einer auf 95 °C vorgewärmten Taq-Polymerase und einer auf 4 °C gekühlten Taq-Polymerase durchgeführt.*

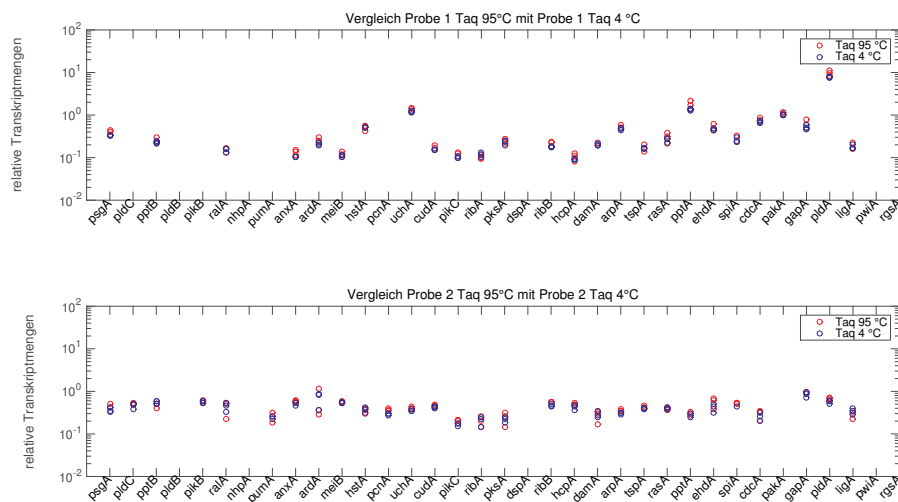


Abbildung 2.35: Test auf unterschiedliche Zugabetemperaturen der Taq-Polymerase in die PCR-Reaktion

*Getestet wurden zwei zufällig gewählte Proben, mit denen in einem Dreifachansatz der Einfluss einer auf 95 °C vorgeheizten (rot) und einer auf 4 °C gekühlten (blau) Taq-Polymerase auf die Quantität der Transkriptmengen analysiert wurde.*

Die Kosten für die RT-PCR-Reaktion konnten mit dem neu etablierten Kitsystem um >80% der ursprünglichen Kosten reduziert werden. Der Hauptanteil der verbleibenden Ausgaben wird jedoch durch den in der RT-Reaktion verwendeten RNase-Inhibitor verursacht. Dieser wird extern von der Firma Thermo Scientific eingekauft. Im ursprünglichen GeXP-Kit wird der RNase-Inhibitor zusammen mit der Referenz-RNA verdünnt der RT-Reaktion zugegeben. Daher wurde in dieser Arbeit ausgetestet, inwiefern sich der RNase-Inhibitor auch hier verdünnen lässt, ohne die Qualität der Reaktion zu beeinflussen. Zur Überprüfung des Einflusses des Verdünnungsfaktors des RNase-Inhibitors auf die Qualität der Reaktion wurde die RT-PCR-Reaktion, wie in Kap. 5.14 beschrieben, mit vier zufällig ausgewählten Proben und jeweils vier unterschiedlichen Konzentrationen an RNase-Inhibitor durchgeführt (unverdünnt, 1:5 verdünnt; 1:10 verdünnt, ohne RNase-Inhibitor). Zur Auswertung dieses Experiments wurden die Daten aller vier Proben jeder Verdünnungsstufe des Inhibitors gemittelt und in Abb. 2.36 aufgetragen. Es zeigte sich kein erheblicher Unterschied in den Genexpressionsleveln zwischen den Analysen mit dem unverdünnten RNase-Inhibitor bis hin zu den Analysen, welche ohne Inhibitor durchgeführt wurden. Daher wurde der RNase-Inhibitor in allen zukünftigen Reaktionen in einer Verdünnungsstufe von 1:10 eingesetzt, was die Analysekosten für die RT-PCR-Reaktion von 0,98 € (Rummel, 2014) auf 0,23 € reduziert.

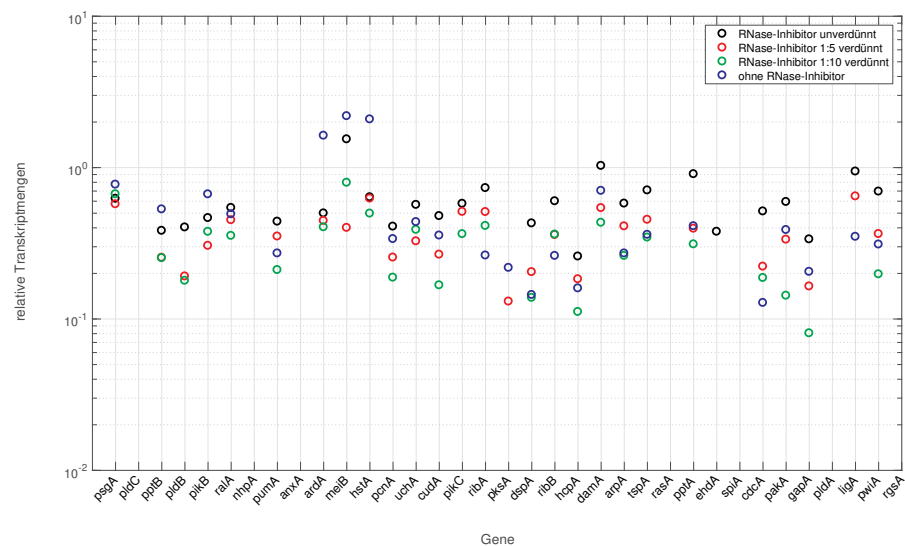


Abbildung 2.36: Test auf unterschiedliche Konzentrationen des RNase-Inhibitors in der RT-Reaktion

*Die RT-PCR-Reaktion wurde mit unterschiedlichen Konzentrationen des RNase-Inhibitors wie in Kap. 5.14 beschrieben durchgeführt, um den Einfluss der Inhibitor-Konzentration auf die Reaktion zu testen.*

### 2.5.2 Experimentelle Validierung des modellierten eXpress-Profiling-Reaktionssystems

Die eXpress-Profiling-Methode ist ein komplexes Reaktionssystem, das durch die Wechselwirkung vieler Komponenten charakterisiert ist. Die Reaktionsbedingungen müssen für diese Analysemethode genau eingestellt werden, um zu gewährleisten, dass alle Fragmente mit gleicher Effizienz in einem einheitlichen Bereich amplifiziert werden. Somit wird gewährleistet, dass sie in der Kapillarelektrophorese komplett quantifiziert werden können. Dazu wurde am Lehrstuhl für Regulationsbiologie ein kinetisches Modell der Reaktionsabläufe erstellt, welches die Wechselwirkungen der einzelnen Komponenten beschreibt und als Basis zur Einschätzung der eXpressProfiling-Kalibrierungskurven dient (Marquardt u. a., 2017).

Es wurde eine Gleichung entwickelt, die die dynamische Veränderung der Konzentration der DNA-Fragmente in der RT-PCR-Reaktion in Abhängigkeit der Ausgangs-RNA-Konzentration und der Reaktionsordnung angibt. Für Reaktionsordnungen mit  $n = 1$  ergibt sich entsprechend,

$$[\text{DNA}_i] = \alpha * A_i * [\text{RNA}_i]_0 * (1 - \exp(-k'_{i,j,c} * t)) \quad (2.4)$$

wobei die Entwicklung der DNA-Konzentration für  $n \neq 1$  folgender Gleichung folgt:

$$[\text{DNA}_i] = \alpha * A_i * \left( [\text{RNA}_i]_0 - \sqrt[n]{k'_{i,j,c} * t(n-1) + [\text{RNA}_i]_0^{1-n}} \right) \quad (2.5)$$

mit

$$k'_{i,j,c} = k_{i,j} * [\text{Primer}_{i,j}] \quad (2.6)$$

Dabei ist  $[\text{DNA}_i]$  die Konzentration der DNA-Fragmente in der Reaktion und  $\alpha \leq 2^c$  die Gesamtamplifikation jedes cDNA-Moleküls, das während der RT-Reaktion nach  $c$  Zyklen synthetisiert wird.  $A_i$  ist die relative Menge der genspezifischen ssDNA mit der Konzentration  $[c\text{DNA}_i]$  innerhalb der ssDNA-Population.  $[\text{RNA}_i]_0$  gibt die RNA-Anfangskonzentration an und  $k_{i,j}$  ist die primerspezifische Geschwindigkeitskonstante für die Hybridisierung der Primer an die komplementäre RNA-Sequenz.

### 2.5.3 Experimentelle Überprüfung der Genauigkeit des Peak-Quantifizierungsalgorithmus für eXpress-Profiling-Analysen

Alle in der RT-PCR amplifizierten Proben werden im Anschluss in einer Kapillarelektrophorese aufgetrennt und quantifiziert. Um die Genauigkeit des Peak-Quantifizierungsalgorithmus zu überprüfen, wurden Verdünnungsreihen von drei vorab amplifizierten DNA-Fragmentpaaren hergestellt und vermessen. Es wurden dabei drei Fragmentpaare jenes DNA-Größenstandards verwendet, der auch für die Analysen im eXpress-Profiling eingesetzt wird (vgl. Kap. 5.14.6).

Zur Herstellung dieser Verdünnungsreihe wurde je ein Peak aller Paare zu Pool #2 zusammengeführt (A, B, C; vgl. Abb. 2.37). Die Konzentration dieses Pools wurde beibehalten. Die jeweils zweiten Peaks der Fragmentpaare (1, 2, 3; vgl. Abb. 2.37) wurden ebenfalls gepoolt (Pool #1), wobei aus diesem Pool eine Verdünnungsreihe mit unterschiedlichen Konzentrationen hergestellt wurde. Anschließend wurde der Pool #2 mit je einer Verdünnungsstufe von Pool #1 zu gleichen Teilen gemischt, über eine Kapillargelelektrophorese aufgetrennt und die Peakflächen quantifiziert.

Um systematische Fehler zu vermeiden, wurde dieser Versuch auch vice versa durchgeführt. Das heißt, die Konzentration von Pool #1 wurde beibehalten und von Pool #2 wurde eine Verdünnungsreihe hergestellt. Beide Pools wurden anschließend wie oben beschrieben gemischt und in der Kapillarelektrophorese gemessen.



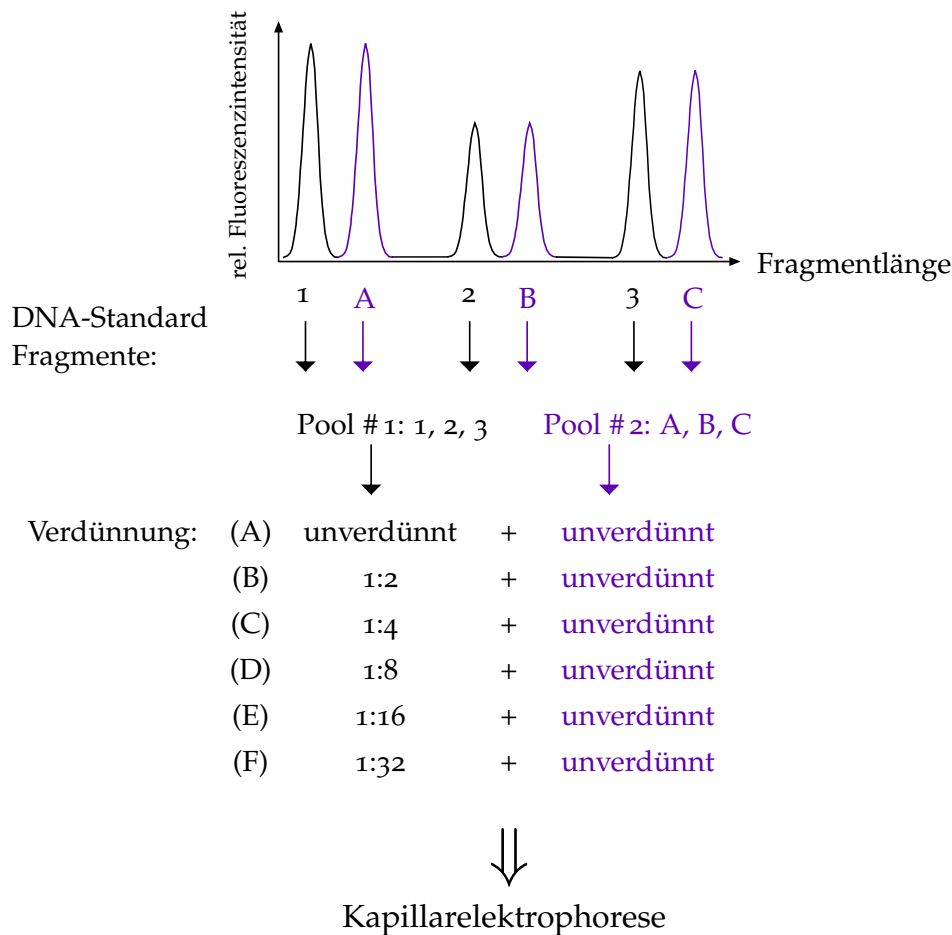


Abbildung 2.37: Test auf Genauigkeit des Peak-Quantifizierungsalgorithmus – experimentelles Setup

*Es wurden drei Fragmentpaare des eXpress-Profiling DNA-Größenstandards ausgewählt, um den für die Auswertung der Kapillarelektrophorese genutzten Peak-Quantifizierungsalgorithmus auf seine Genauigkeit hin zu testen. Dazu wurden die Fragmente in 2 Pools aufgeteilt, Pool #1 und Pool #2, wobei Pool #2 unverdünnt verblieb und von Pool #1 eine Verdünnungsreihe angefertigt wurde. Anschließend wurde Pool #2 zu gleichen Teilen mit jeder Verdünnungsstufe von Pool #1 gemischt und in der Kapillarelektrophorese quantifiziert.*

Um untersuchen zu können, ob zwischen den detektierten Fluoreszenzintensitäten und der Verdünnungsstufe wie erwartet ein linearer Zusammenhang besteht, wurden die ermittelten Peakflächen normiert. Dazu wurde die Peakfläche jedes Fragmentes  $i$  des unverdünnten Pools #1 auf die Peakfläche seines zugehörigen Fragmentes aus jeder Verdünnungsstufe  $j$  von Pool #2 normiert (vgl. Gleichung 2.7).

$$PA_{\text{norm},i,j} = PA_{\text{Pool}2_i} / PA_{\text{Pool}1_i,j} \quad (2.7)$$

Die Genauigkeit des Quantifizierungsalgorithmus wurde durch die Analyse der Linearität der Verdünnungskurven ermittelt. Die Peakverhältnisse jedes Fragmentpaares wurden dazu über die Verdünnungsstufen aufgetragen (vgl. Abb. 2.38). Daraus ergab sich ein Set von Kurven, die im Idealfall einen Anstieg von 1 aufweisen sollten. Die Anstiege der Kurven wurden mithilfe der linearen Regression ermittelt (vgl. Tab. 2.14), wobei deren mittlere Steigung  $0,9720 \pm 0,0313$  betrug. Nach einem Fitting dieser Kurven auf einen Anstieg von 1,00 und dem Vergleich der Originaldaten zu den angepassten Kurven, konnten keine systematischen Abweichungen gefunden werden (vgl. Abb. 2.38). Daraus lässt sich schließen, dass eine Verdopplung der DNA-Menge auch eine Verdopplung der Fluoreszenzintensität in der Kapillarelektrophorese zur Folge hat.

Tabelle 2.14: Berechnete Steigungen

Fragmentpaar	Steigung
A/1	0,9935
B/2	0,9502
C/3	0,9197
1/A	0,9871
2/B	0,9790
3/C	1,0028

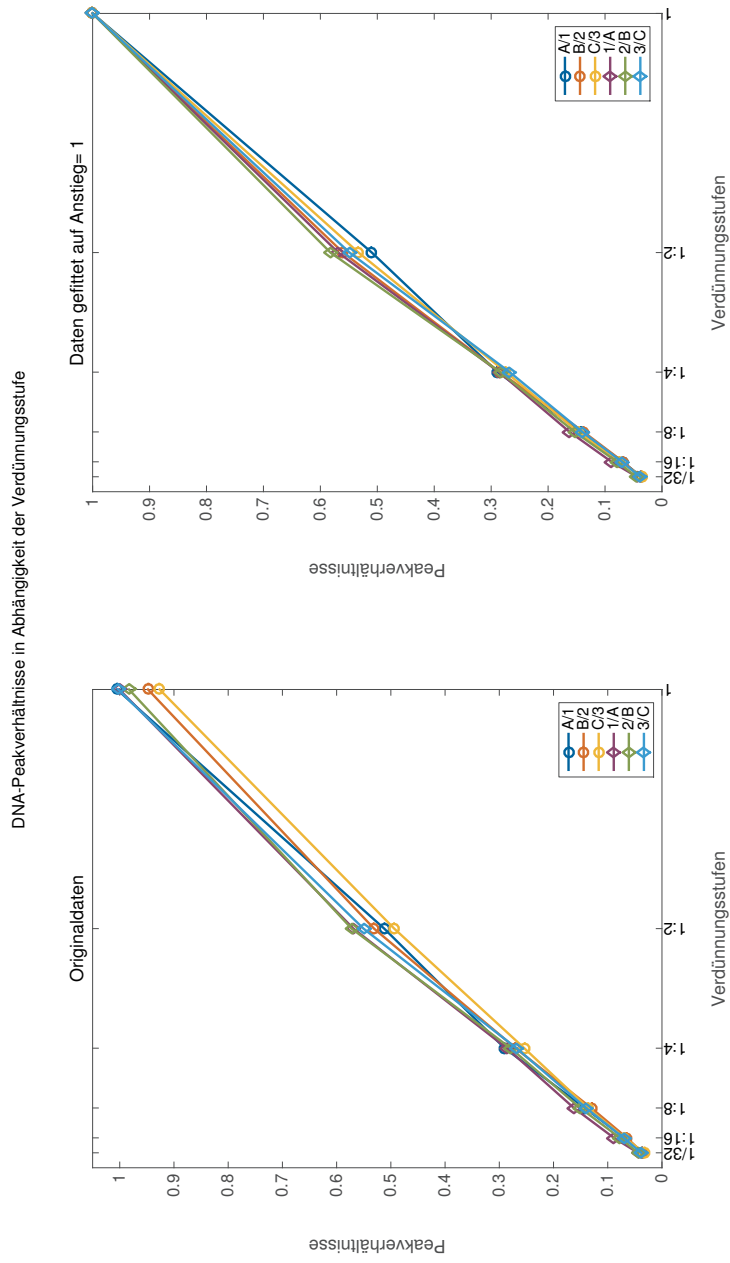


Abbildung 2.38: Test auf Genauigkeit des Peakquantifizierungsalgorithmus – Ergebnisse

*Die Verhältnisse der quantifizierten DNA-Fragmentpeaks wurden über die Verdünnungsstufen aufgetragen und mittels linearer Regression die Geradenanstiege berechnet. Links: Plot mit Originaldaten, rechts: Plot mit Originaldaten, deren Anstieg auf 1 angepasst wurde.*

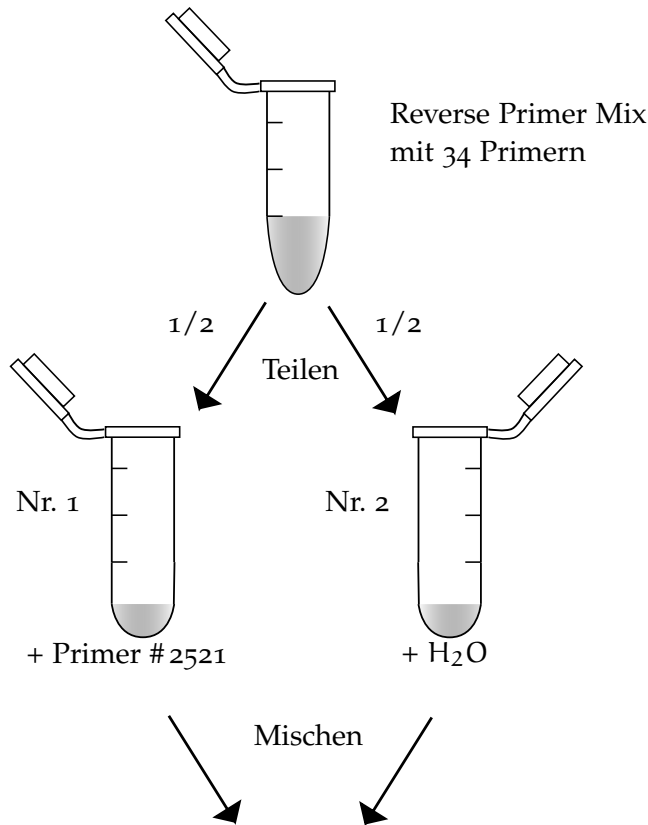
#### 2.5.4 Untersuchung der Abhängigkeit der Fragmentmenge von der Primerkonzentration für eXpress-Profiling-Analysen

Es sollte nun überprüft werden, inwiefern die in der Kapillarelektrophorese detektierte Fluoreszenzmenge der analysierten Fragmente von der eingesetzten Primerkonzentration abhängt. Dazu wurde eine Verdünnungskurve mit einem der eXpress-Profiling-Primer hergestellt und vermessen. Es wurde der für eXpress-Profiling-Analysen verwendete Rückwärtsprimersatz in den in Kapitel 5.14.1 aufgeführten Konzentrationen, mit Ausnahme des Primers #2521, hergestellt. Dieser Primer wurde ausgewählt, da das amplifizierte RNA-Fragment in allen vorangehenden Analysen stark exprimiert wurde und sich somit für die Herstellung einer Verdünnungskurve gut eignete. Dieser Rückwärtsprimersatz wurde anschließend, wie in Abbildung 2.39 gezeigt, in zwei Teile gesplittet. Dabei wurde einem der beiden Teile der Rückwärtsprimer #2521 mit der in Kapitel 5.14.1 angegebenen Konzentration zugefügt, wobei dem zweiten Teil des Primermixes dasselbe Volumen an Wasser zugegeben wurde.

Diese beiden Primermixe wurden anschließend, wie in Abb. 2.39 angeben, in unterschiedlichen Verhältnissen gemischt, um eine Verdünnungskurve des Primers #2521 herzustellen. Mit diesen Primermixen A-F wurde wie in Kapitel 5.14 angegeben, die eXpress-Profiling-Analyse mit einem RNA-Pool als 8-fach Ansatz durchgeführt. Die relativen Peakflächen wurden in Abbildung 2.40 über die Verdünnungsstufen aufgetragen. Eine Regressionsanalyse, welche für diese Messdaten die Kurvengleichung

$$y = -0,7522x^2 + 1,1395x + 0,0266 \quad (2.8)$$

lieferte, bestätigte eine quadratische Anhängigkeit der detektierten Fluoreszenzmenge des entsprechenden Fragmentes zur eingesetzten Primerkonzentrationen.



- |     |       |       |   |       |       |
|-----|-------|-------|---|-------|-------|
| (A) | 100 % | Nr. 1 | + | 0 %   | Nr. 2 |
| (B) | 80 %  | Nr. 1 | + | 20 %  | Nr. 2 |
| (C) | 60 %  | Nr. 1 | + | 40 %  | Nr. 2 |
| (D) | 40 %  | Nr. 1 | + | 60 %  | Nr. 2 |
| (E) | 20 %  | Nr. 1 | + | 80 %  | Nr. 2 |
| (F) | 0 %   | Nr. 1 | + | 100 % | Nr. 2 |

Abbildung 2.39: Experimentelles Setup zum Austesten der Auswirkung der Primerkonzentrationen auf die Amplifikationsstärke in eXpress-Profiling-Analysen

*Es wurde ein Rückwärtsprimermix mit 34 von 35 Primern hergestellt und in zwei Teile gesplittet. Mix Nr. 1 wurde Primer #2521 in der in Kap. 5.14.1 angegebenen Konzentration zugegeben, Mix Nr. 2 wurde mit dem entsprechenden Volumen Wasser versetzt. Beide Primermixe wurden in unterschiedlichen Verhältnissen gemischt und anschließend für die eXpress-Profiling-Analyse zur Herstellung einer Verdünnungsreihe genutzt.*

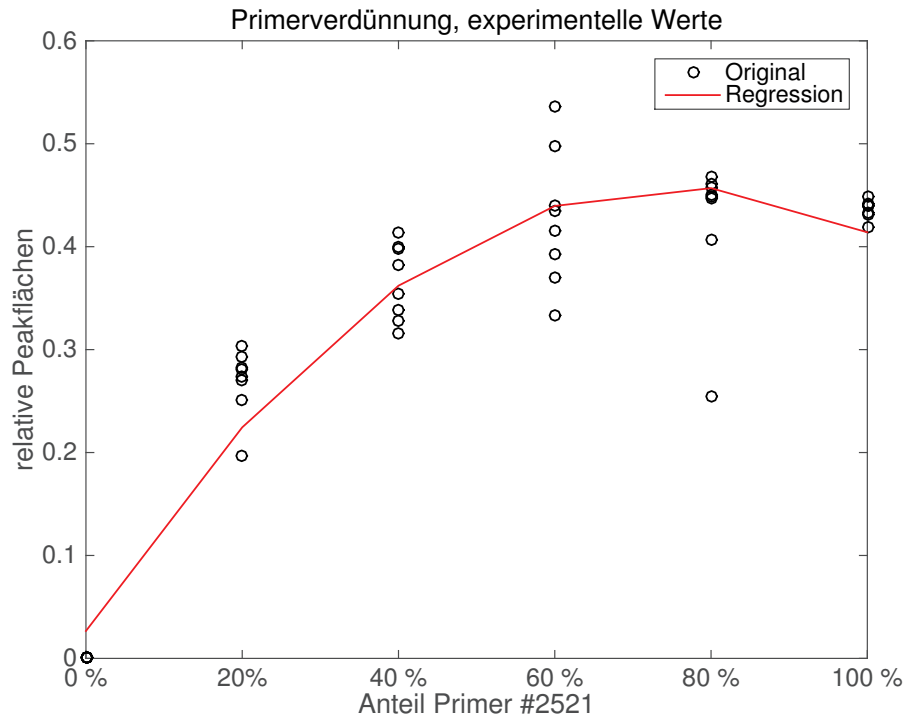


Abbildung 2.40: Ergebnisse des Primerkonzentrationstests

*Die relativen Fluoreszenzintensitäten des mit Primer #2521 amplifizierten Fragmentes wurden über die einzelnen Verdünnungsstufen aufgetragen. In schwarz sind die originalen Messdaten dargestellt, in rot die berechnete Regressionsgerade.*

Im Anschluss an die experimentelle Analyse des Einflusses der Primerkonzentration auf die Fluoreszenzmenge sollte das System mithilfe der Gleichung 2.5 modelliert und an die experimentellen Daten gefittet werden. Zur Modellierung der Abhängigkeit der DNA-Menge von der Primerkonzentration wurden die in Tabelle 2.15 angegebenen Parameter genutzt.

Die Reaktionskinetik wurde für die angegebenen Parameter in MATLAB implementiert. Die Parameter wurden dazu mithilfe des Least Squares Verfahrens und der Funktion *lsqcurvefit* auf die experimentellen Daten gefittet. Sowohl die Originaldaten als auch die gefittete Kurve sind in Abbildung 2.41 dargestellt.

Es konnte gezeigt werden, dass die modellierte Kinetik der RT-PCR-Reaktion des eXpress-Profiling-Verfahrens die experimentell ermittelten Daten in hohem Maße widerspiegelt und somit geeignet ist, die Änderungen in der amplifizierten DNA-Menge bei Modifikationen der Primerkonzentration theoretisch abzuschätzen.

Tabelle 2.15: Parameter der Modellierung

Parameter	Ausgangswert	gefitteter Wert
$\alpha$	100	100
$A_i$	0,028751	0,00021888
$[RNA_i]_0$	20	20
$n$	0,9	0,9335
$k'_{i,j}$	0,09	0,055379
$t$	100	100
Primer $_{i,j}$	0.1-100	-

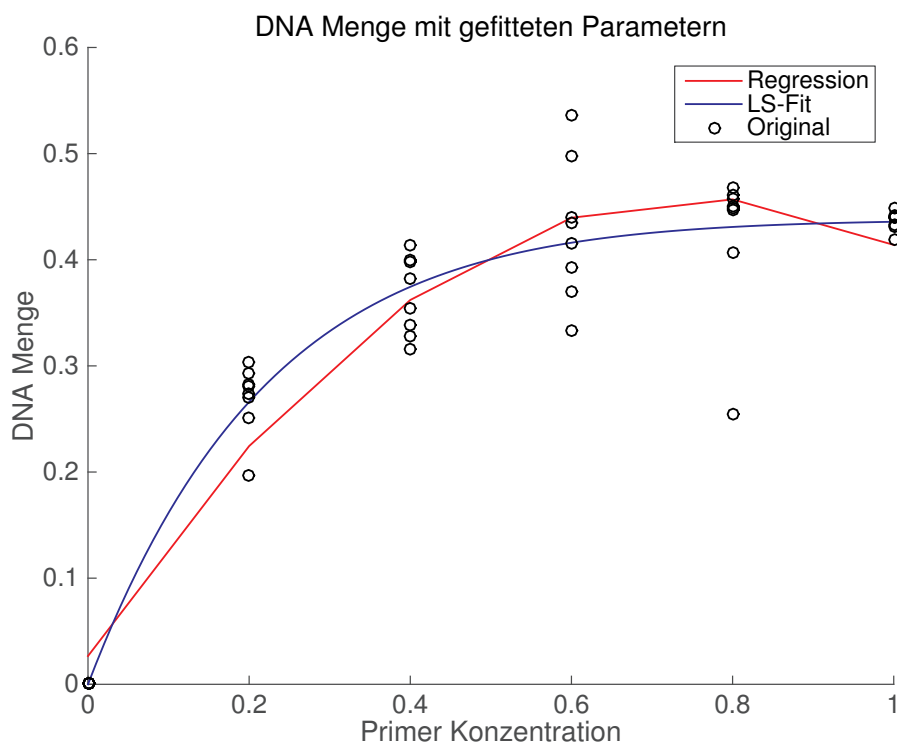


Abbildung 2.41: Fitting der modellierten Reaktionsgleichung

*In schwarz dargestellt sind die Originaldaten des Primerkonzentrationstests. Die zugehörige Regressionskurve ist in rot und die Kurve des Least Squares Fittings der modellierten Reaktionskinetik in blau dargestellt.*





---

## DISKUSSION

---

### 3.1 DAS DIFFERENZIERUNGSVERHALTEN DER SPORULATIONS- MUTANTEN

Die Analyse des Differenzierungsverhaltens der in dieser Arbeit betrachteten Sporulationsmutanten resultierte für beide Stämme in einer Bereitschaft zur Sporulation, die sich deutlich vom Wildtyp unterschied. So sporulierten nur 60 % der Plasmodien der Mutante N26B5, wohingegen die Sporulationsrate des Wildtyps bei gleichbleibender Hunger- und Belichtungsdauer bei rund 92 % lag. Für den Mutantenstamm N11D4 wurde trotz Induktion der zellulären Differenzierung durch Hungern und Belichtung keine Sporulation in den betrachteten Plasmodien festgestellt.

#### 3.1.1 *Die Mutante N26B5 ist vermindert zur Sporulation fähig*

Diese Sporulationsraten lassen darauf schließen, dass der durch die Mutagenese hervorgerufene Defekt in der Signalkaskade die Fähigkeit zur Sporulation im Stamm N26B5 nicht vollständig aufgehoben hat. Da jedoch nur 60 % der induzierten Plasmodien sporulierten, kann davon ausgegangen werden, dass die Signalkaskade in N26B5 durch die Mutation verändert wurde und nicht mehr dieselbe Effizienz wie in Wildtyp-Plasmodien aufweist. Eine mögliche Erklärung für die verminderte Sporulationsbereitschaft des Mutantenstammes N26B5 wäre die Lokalisation dieses Defektes innerhalb des Regulationsnetzwerkes, das den Vorgang der Sporulation steuert. Es wäre möglich, dass diese Veränderung eher im mittleren bis unteren Bereich der Signalkaskade lokalisiert ist. So könnte das Signal, das während des Differenzierungsvorganges über diese Kaskade läuft, über einen alternativen Signalweg abgefangen und an dem Defekt vorbeigeführt werden, sodass die Sporulation der Plasmodien dennoch ermöglicht werden kann. Dieser alternative Signalweg könnte in der Aktivierung eines Transkriptionsfaktors enden, der mit geringerer Affinität an die DNA bindet als der ursprünglich aktivierte Transkriptionsfaktor und somit in einer verminderten Sporulationseffizienz resultiert. Eine weitere Erklärung

für das Zustandekommen der verminderten Sporulationsraten wäre, dass der Transkriptionsfaktor durch den alternativen Signalweg mit verminderter Effizienz aktiviert wird, was ebenfalls zu einer geringeren Transkription der betroffenen Gene führen und die zelluläre Differenzierung stark einschränken würde.

Diese beobachteten Effekte lassen sich ebenfalls durch Waddington's Theorie der epigenetischen Landschaften erklären. Der durch die Mutagenese hervorgerufene Defekt in der Signalkaskade würde somit eine Veränderung der Topographie der von Waddington beschriebenen Landschaft darstellen. Diese Veränderung könnte ein zusätzlicher Berg oder ein zusätzliches Tal sein, das die Zelle daran hindert, ihrem ursprünglichen Differenzierungsweg zu folgen. Die Plasmodien sind demzufolge gezwungen sich auf einem alternativen Weg durch die epigenetische Landschaft zu bewegen um ihren vollständig ausdifferenzierten Zustand zu erreichen.

### 3.1.2 Die Mutante N11D4 ist nicht zur Sporulation fähig

Die Plasmodien der Sporulationsmutante N11D4 wiesen weder mit noch ohne Induktion der Differenzierung sporulierte Zellen auf. Vermutlich ist der durch die Mutagenese verursachte Defekt bereits in den oberen Abschnitten in der Signalkaskade, in unmittelbarer Nähe zum Phytochrom-Photorezeptor, lokalisiert. Diese Konstellation führt nun dazu, dass das vom Photorezeptor aufgenommene Signal nicht ausreichend in die Zelle weitergeleitet werden kann, um die Signalkaskade zum Auslösen des Differenzierungsprozesses zu aktivieren. Daher ist es der Zelle nicht möglich einen alternativen Signalweg zu beschreiten, der im Stande ist, die zelluläre Differenzierung wie im Mutantenstamm N26B5 einzuleiten. Lamparter und Marwan postulierten, dass Phytochrom in *Physarum polycephalum* erst während der Hungerphase synthetisiert wird (Lamparter und Marwan, 2001). Während der Kultivierung der Mutante N11D4 wurde festgestellt, dass dieser Stamm im Vergleich zu weiteren Mutanten ein besonders langsames Wachstumsverhalten aufwies. Daher könnte eine weitere Erklärung für die ausbleibende Sporulation dieser Mutante eine unzureichende Expression des Rezeptors sein, was dazu führen könnte, dass eine bestimmte Signalschwelle innerhalb der Zelle nicht überschritten werden und die Regulationskaskade nicht in Gang gesetzt werden kann. Ein solches Defizit könnte eventuell über längere Belichtungszeiten der Zellen ausgeglichen werden.

Betrachtet man das Sporulationsverhalten der Mutante N11D4 unter Zuhilfenahme der Analogie der epigenetischen Landschaften, so würde der hier verursachte Defekt in der Signalkaskade einem besonders tiefen Tal gleichen, welches zusätzlich zu Beginn der Differenzierungstrajektorien in die Landschaft eingebracht wurde. Wird die Dif-

ferenzierung in der Mutante N11D4 induziert, so bewegen sich die Zellen bereits zu Beginn ihres Differenzierungsweges in dieses Tal, welches sie aus eigener Kraft nicht wieder verlassen können und dort verharren.

### 3.2 DIE ZELLULÄRE DIFFERENZIERUNG VERLÄUFT HOCH SPEZIFISCH IN EINZELZELLEN

Mithilfe der Hauptkomponentenanalyse konnten die durch Waddington beschriebenen Entscheidungsprozesse, die eine Zelle während eines Differenzierungsprozesses durchläuft, dargestellt werden. Es konnten spezifische und stabile Differenzierungszustände identifiziert werden, die die Plasmodien während der Sporulation durchlaufen. So fokussieren sich alle induzierten Plasmodien um vier Stunden nach Belichtung auf eine Region in den PCA-Plots. Jedoch sind ausschließlich die sporulierenden Zellen in der Lage diesen Zustand wieder zu verlassen und sich um acht Stunden nach Belichtung in eine zweite, sporulationsspezifische Region fortzubewegen. Diese beiden Regionen des PCA-Plots symbolisieren die in Waddingtons Theorie beschriebenen Täler, die stabile Differenzierungszustände markieren. Die Sporulations-negativen Zellen sind somit nicht in der Lage, den ersten stabilen Zustand nach vier Stunden zu verlassen und sich weiter bergab durch die Landschaft in ihren terminalen, ausdifferenzierten Zustand zu bewegen. Es konnte weiterhin beobachtet werden, dass diese Fokussierung um vier Stunden nach Start des Experimentes spezifisch für die belichteten Zellen ist. Plasmodien, die nicht belichtet wurden, streuen in den PCA-Plots deutlich mehr. Ihnen fehlt offenbar der Stimulus, sich gerichtet entlang ihrer Differenzierungstrajektorie zu bewegen.

Die Trajekturen, die die Zellen während des Differenzierungsprozesses durch die epigenetische Landschaft beschreiten, sind für jede Zelle hoch spezifisch und erbringen somit den Nachweis, dass es sich bei jedem Differenzierungsprozess eines Plasmodiums um eine spezifische Einzelentscheidung handelt und nicht um ein generalisiertes Differenzierungsmuster, dass in jeder Zelle auf die gleiche Art und Weise abläuft. Dabei konnte belegt werden, dass das Verhalten der uninduzierten Plasmodien in *Physarum polycephalum* während der Sporulation deutlich ungerichteter ist, als in induzierten Zellen. Belichtete Plasmodien beschreiten einen gerichteten, wenn auch individuellen Weg während des Differenzierungsvorganges.

### 3.3 IDENTIFIKATION VON SPORULATIONSRELEVANTEN GENEN

Die Änderungen der Expressionslevel in den hier untersuchten Genen wurden mithilfe des Mann-Whitney- und des Wilcoxon-Vorzeichen-Rangtests analysiert. Dadurch sollten mögliche Kandidatengene identifiziert werden, die mit der zellulären Differenzierung im Zusammenhang stehen.

#### 3.3.1 Zeitverläufe der Genexpression an Sporulationsmutanten

Ein Vergleich der differentiell regulierten Gene der sporulierten, nicht sporulierten und nicht induzierten Plasmodien des Stammes N26B5 diente zur Identifikation von Genen, deren differentielle Regulation spezifisch in sporulierenden Zellen auftrat. Diese Gene sind : *pptB*, *pldB*, *pikB*, *ralA*, *pumA*, *anxA*, *meiB*, *uchA*, *ribA* und *ehdA*, *spiA*, *gapA*, *pwiA* und *rgsA*. Durch die zeitaufgelöste Betrachtung der Expressionsprofile dieser Gene konnte geschlussfolgert werden, dass für einen korrekten Ablauf des Differenzierungsvorganges die Herunterregulation der Gene *pptB*, *pikB*, *ralA*, *pumA*, *meiB* und *ribA* erforderlich ist, bevor im weiteren Verlauf eine Hochregulation der sporulationsrelevanten Gene *ehdA*, *spiA*, *gapA*, *pwiA* und *rgsA* erfolgen kann. Weiterhin konnten in den uninduzierten Plasmodien beider Stämme Gene identifiziert werden, die während des Analysezeitraumes eine signifikante Änderung in ihren Expressionsleveln aufwiesen, die nicht mit der Sporulation im Zusammenhang standen. Dabei könnte es sich um Zellzyklus-regulierte Gene handeln. Um eine Abhängigkeit der Quantität dieser Genprodukte vom Zellzyklus nachzuweisen, sollten die Expressionslevel in engmaschigen Zeitabständen, in etwa alle drei bis vier Stunden, in uninduzierten Plasmodien überprüft werden.

Die Ergebnisse der Hauptkomponentenanalyse, die vermuten ließen, dass sich sporulierte und nicht sporulierte Zellen bis zu vier Stunden nach Belichtung nahezu gleich verhalten, konnten hier noch einmal anhand der Genexpressionslevel nachgewiesen werden. Daraus kann geschlussfolgert werden, dass der Zeitraum, in dem die Entscheidung zur Sporulation in der Zelle getroffen wird, in diesem Mutantenstamm ebenfalls nach diesen vier Stunden stattfinden muss. Daher sollte bei zukünftigen Analysen ein besonderes Augenmerk auf diesen Abschnitt der Differenzierung gerichtet werden.

Die Genexpressionslevel der Sporulationsmutante N11D4 unterscheiden sich gravierend von denen der Mutante N26B5. Es konnten in N11D4 keine der Genexpressionsmuster identifiziert werden, die in N26B5 während des Vorganges der Sporulation auftraten. Der durch die Mutagenese verursachte Defekt im Stamm N11D4 scheint die Aktivierung der sporulationsspezifischen Signalkaskade vollkommen zu hemmen, sodass keinerlei Differenzierung in diesen Zellen möglich

ist. Somit eignet sich diese Mutante besonders zur Durchführung von Fusions- und Komplementationsanalysen um zu untersuchen, inwiefern eine Wiederherstellung des Wildtyp-Phänotypes in N11D4 möglich ist. Die Lokalisation der Defekte, die durch die Mutagenese in der Genomsequenz des Organismus verursacht wurden, ist in den hier analysierten Plasmodien nicht bekannt. Daher kann das Wissen über die genaue Positionierung dieser Defekte Aufschluss darüber geben, welche Gene in den Mutantenstämmen verändert wurden. Insbesondere für den Stamm N11D4 wären solche Informationen besonders wertvoll, da es sich hier um eine Veränderung handelt, die die komplette Differenzierung dieses Stammes verhindert.

### 3.3.2 Unterschiede der Genexpressionsmuster zum Wildtyp

Durch den Vergleich der Expressionslevel zwischen den Sporulationsmutanten und dem Wildtyp sollten Gene identifiziert werden, die einen alternativen Signalweg zur Sporulation der Plasmodien ermöglichen. Der Mann-Whitney-Test bestätigte, dass die Expressionslevel der Sporulationsmutante N26B5 und des Wildtyps in den Dunkelkontrollen nahezu identisch sind. Jedoch konnten große Unterschiede in den Proben gefunden werden, die von sporulierten Plasmodien zum Zeitpunkt um acht Stunden nach Belichtung abgenommen wurden. Diese Ergebnisse lassen darauf schließen, dass sich der in N26B5 verursachte Defekt erst im späteren Verlauf der Differenzierung auf den Ablauf der Signalkaskade auswirkt. Aus diesen signifikant unterschiedlichen Genen im Vergleich der acht-Stunden-Proben wurden sieben Gene in N26B5 als sporulationsrelevant gekennzeichnet. Trotz dieser nicht unerheblichen Zahl von Genen, in denen sich die Mutante N26B5 und der Wildtyp signifikant voneinander unterscheiden, konnte die Sporulation in N26B5 ermöglicht werden. Es konnten in der Mann-Whitney-Analyse Gene identifiziert werden, die sich zwar signifikant zwischen Mutante und Wildtyp unterscheiden, jedoch für N26B5 nicht als sporulationsrelevant eingestuft wurden. Diese Gene (*nhpA*, *psgA*, *ardA*, *ribB*, *damA*, *arpA* und *rasA*) könnten daran beteiligt sein, einen alternativen Zweig der sporulationspezifischen Signalkaskade zu aktivieren und die Sporulation in der Mutante N26B5 zu ermöglichen.

Der Vergleich der Genexpression zwischen dem Wildtyp und der Mutante N11D4 konnte aufgrund des experimentellen Setups nur zwischen den jeweiligen Dunkelkontrollen gezogen werden. Auffällig war hierbei, dass die Vergleiche beider Dunkelkontrollen von N11D4 mit dem Wildtyp stark unterschiedliche Ergebnisse lieferten. Die Analyse von N11D4 aus Teilversuch #1 mit dem Wildtyp lieferte eine Vielzahl von Genen, die sich in ihren Expressionsleveln stark voneinander unterschieden. Jedoch wiesen die Daten aus Teilversuch #2

,trotz gleicher experimenteller Behandlung, kaum Abweichungen zu den Wildtypdaten auf. Ursachen für diese Abweichungen könnten geringfügige Unregelmäßigkeiten in den Kultivierungsbedingungen sein. Erfahrungswerte aus früheren Experimenten weisen darauf hin, dass die Plasmodien mitunter sehr sensibel auf Schwankungen von Temperatur oder Sauerstoffgehalt reagieren. Beide Teilversuche wurden mit Plasmodien aus derselben Kultivierung durchgeführt. Um ein besseres Handling während der Probenahme gewährleisten zu können, wurden beide Versuche mit zwei Stunden Versatz zueinander durchgeführt. Daher könnte eine weitere Erklärung für dieses Verhalten eine Änderung der Expressionslevel bestimmter Gene sein, die vom Zellzyklus abhängig ist und somit in periodischen Abständen auftritt. Aufgrund der Vergleiche mit dem Stamm N26B5 ist jedoch davon auszugehen, dass sich der Stamm N11D4 bereits in der Dunkelkontrolle stark von den gemessenen Transkriptmengen des Wildtyps unterscheidet.

#### 3.4 FUSIONSANALYSEN AN SPORULATIONSMUTANTEN

Durch die Fusion zweier unterschiedlicher Sporulationsmutanten von *Physarum polycephalum* sollte eine neuartige Methode etabliert werden, um das Reaktionsnetzwerk analysieren zu können, das der zellulären Differenzierung zugrunde liegt.

Anhand der hier durchgeführten Fusionsanalysen an den Mutantensstämmen N26B5 und N11D4 konnte nachgewiesen werden, dass eine Fusion von Zellen dieser beiden Stämme durch Zellkontakt möglich ist. Die in diesen Fusionszellen gemessenen Expressionslevel bestätigten, dass sich die aus den beiden Fusionsteilen stammenden Zellkernpopulationen während der Fusion in Hinblick auf ihren Teilungs- und Transkriptionsstatus synchronisieren. In den hier konstruierten Fusionszellen konnten nach erfolgreicher Synchronisation keine Unterschiede in den Transkriptmengen der analysierten Gene zwischen den beiden Hälften festgestellt werden. Die Fusionsplasmodien verhielten sich im Anschluss an die Fusion wie Einzelzellen.

Mithilfe der Hauptkomponentenanalyse konnte in den Fusionsplasmodien aus Teilversuch #1 (N26B5  $\frac{1}{2}$  + N11D4 DK) eine Fokussierung der Analysedaten zum Zeitpunkt um acht Stunden nach Belichtung nachgewiesen werden, wie sie ebenfalls in den induzierten Zellen der nicht fusionierten Plasmodien auftrat. Dieser Effekt ist jedoch in den Fusionsplasmodien des Umkehrversuches (N11D4  $\frac{1}{2}$  + N26B5 DK) nicht zu erkennen. Hier weisen die Zellen ein Verhalten auf, das in vorherigen Analysen in uninduzierten Plasmodien beider Mutantensstämmen beobachtet werden konnte. Aus diesen Ergebnissen kann geschlossen werden, dass sich die durch Aktivierung der Signalkaskade in N26B5 die transkribierten mRNAs und die translatierten

Proteine über die Zytoplasmaströmung in der Fusionszelle verteilen und die Signalwege zur zellulären Differenzierung im Stamm N<sub>11</sub>D<sub>4</sub> aktivieren. Die Analysedaten weisen somit darauf hin, dass sich in diesen Fusionsplasmodien der Phänotyp des Stammes N<sub>26</sub>B<sub>5</sub> ausprägt.

Trotz erfolgreich nachgewiesener Fusion und anschließender Synchronisation der beiden Fusionspartner konnten Unterschiede in der Ausprägung der resultierenden Expressionszustände nachgewiesen werden. Wie zuvor angenommen, konnte in mehreren Fusionszellen eine exakte Mischung der Transkriptmengen beider Fusionspartner bestätigt werden. Es konnten jedoch ebenfalls Fusionszellen identifiziert werden, deren Transkriptmengen sich nicht wie die zuvor erwähnte Mischung beider Fusionspartner, sondern wie exakt eine der beiden Ausgangszellen verhielten. Dieses Zustandekommen von differentiell unterschiedlichen Transkriptionsniveaus in Fusionszellen, die alle nach demselben experimentellen Schema behandelt wurden, ist ein weiterer Beweis für den in Walter u. a., 2013 beschriebenen Umschaltmechanismus der zellulären Differenzierung. Dieser Umschaltmechanismus sollte in weiterführenden Analysen und unter Betrachtung von Komplementationseffekten weiter klassifiziert werden.

#### 3.4.1 *Analyse auf Komplementationseffekte*

Durch den Vergleich der Genexpressionslevel der beiden Fusionsplasmodienhälften mit ihren Ausgangszellen sollten Unterschiede in den Transkriptmengen herausgefiltert werden, die einen Hinweis auf die Entstehung von Komplementationseffekten in den Fusionsplasmodien darstellen könnten. Mithilfe der durchgeführten Versuche wurde eine Vielzahl an Komplementationen in den analysierten Zellen identifiziert. Dabei zeigte sich deren Auftreten als abhängig davon, welcher der beiden Mutantensämme in den jeweiligen Fusionszellen beleuchtet wurde.

In Marwan, 2003 wurde bereits ein Modell aufgestellt, das den Aufbau der Sporulations-Signalkaskade in Fusionsplasmodien erläutern soll. Es wurde davon ausgegangen, dass der Fluss durch die entsprechende Signalkaskade unidirektional, einem festgelegten Aufbau von mutantenspezifischen Blöcken folgend, vonstatten geht. Dabei hängt die Entstehung von Komplementationseffekten davon ab, in welcher Reihenfolge die dominanten und rezessiven Blöcke der beiden Mutantensämme in der Signalkaskade angeordnet sind. Die Ausprägung der Komplementationseffekte in den hier durchgeführten Fusionsexperimenten lässt darauf schließen, dass in den konstruierten Heterokarya keine starre Anordnung dieser mutantenspezifischen Blöcke in der Signalkaskade vorliegt. Vielmehr scheint das Signal auf verzweigten Wegen durch die Zelle zu laufen, sodass sich für eine spezifische Gruppe #1 von Genen die Mutation in dem Stamm N<sub>11</sub>D<sub>4</sub>

limitierend auf das Voranschreiten der Signalgebung auswirkt. Für eine Gruppe #2 von Genen wirkt sich jedoch die Mutation des Stammes N26B5 dominant und somit limitierend auf die Signalweiterleitung aus (vgl. Abbildung 2.20). Diese Ergebnisse könnten durch die in Marwan, 2003 dargestellte Gendosiseffektkurve beschrieben werden. Diese Kurven sind genspezifisch und erläutern, ob sich eine Mutation bei einem Wildtyp-Phänotyp von 50 % rezessiv oder dominant verhält. Anhand dieser Auftragungen können Experimente zur zeitaufgelösten somatischen Komplementation etabliert und die regulatorische Hierarchie zwischen dominanten und rezessiven Mutationen erklärt werden (Marwan, 2003).

Bedingt durch das experimentelle Setup der hier durchgeführten Fusionsexperimente können kleinere Schwankungen in den Gendosen der beiden verwendeten Sporulationsmutanten in den Fusionsplasmoidien entstehen. Diese Schwankungen sind sowohl abhängig von der Größe der zugeschnittenen Plasmodienstücke, welche zur Fusion zusammengebracht werden, als auch von der Menge an Zellmaterial, welches sich auf den entsprechenden Teilen des Nährbodens befindet.



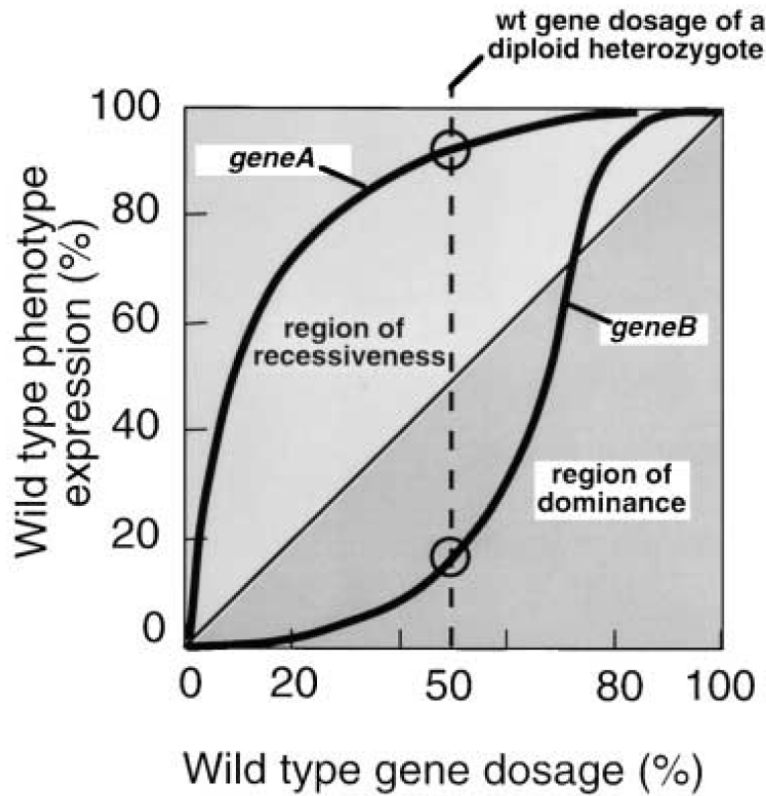


Abbildung 3.1: Gendosiseffektcurve, aus Marwan, 2003

Schema zur Erklärung von Dominanz, Semidominanz- und Rezessivität eines Mutantenallels in einer diploiden Heterozygote anhand von Gendosis-Effekten. Der Anteil der Expression des Wildtyp-Phänotyps wird gegen die Gendosis in % aufgetragen, wobei 100 % dem Wildtyp-Level entsprechen. Die resultierende Gendosis-effektcurve ist von Gen zu Gen unterschiedlich. Exemplarisch dargestellt sind zwei Gene A und B, deren Null-Mutationen rezessiv ( $A^-$ ) oder dominant ( $B^+$ ) in einer heterozygoten Situation ausgeprägt sind. Zu welchem Grad eine Null-Mutation dominant oder rezessiv ist, hängt vom Grad der Expression des Phänotyps bei 50 % der Wildtyp-Gendosis ab, die durch die Gendosis-effektcurve bestimmt wird.

### 3.5 ENTWICKLUNG EINES ALGORITHMUS ZUR DATENAUSWERTUNG

Zur Rekonstruktion des Differenzierungsnetzwerkes, das die Sporulation in *Physarum polycephalum* steuert, wurde in dieser Arbeit ein Clusteralgorithmus entwickelt. Dieser Algorithmus clustert die analysierten Plasmodien anhand der Ähnlichkeit ihrer Genexpressionsverhältnisse von Analysezeitpunkt zu Analysezeitpunkt. Somit können Gruppen von differenzierungsspezifisch korrelierten Genen zuverlässig identifiziert und diese Gruppen individuell zu den Plasmodien zugeordnet werden, in denen diese Korrelationen auftreten. Die Ausgabe der Ergebnisse erfolgt sowohl tabellarisch, als auch grafisch als Heatmap oder Kreisplot.

#### 3.5.1 Theoretische Ansätze

Wird er Phytochrom-Photorezeptor in *Physarum polycephalum* in einem kompetenten Plasmodium durch Belichtung mit Rotlicht angeregt, so läuft das induzierte Signal durch die Regulationskaskade, die in der Aktivierung eines oder mehrerer Gene endet. Sollte über einen spezifischen Regulationsweg die Transkription mehrerer Gene aktiviert werden, so sollten sich deren Transkriptmengen in einem bestimmten Zeitintervall in gleichem Verhältnis zueinander ändern. Daher wurde in dem hier beschriebenen Algorithmus die Ähnlichkeit der Genexpressionsverhältnisse zwischen zwei Zeitpunkten der zellulären Differenzierung als Maß für die Korrelation spezifischer Gene zugrunde gelegt. Die Schwellwerte anhand derer zwischen Korrelation oder nicht entschieden wird, sind benutzerdefiniert und gewährleisten so eine hohe Individualität und Genauigkeit bei der Analyse der Daten. Anhand der Schwellwerte für minimale Gen- und Plasmodienanzahl in den berechneten Clustern kann unspezifisches Rauschen herausgefiltert werden. Im Hinblick auf eine schnelle und unkomplizierte Auswertung der Daten wurde der Algorithmus besonders benutzerfreundlich implementiert. Um Genexpressionsdaten mithilfe dieser Software auswerten zu können, müssen vom Anwender lediglich die in Kapitel 2.4.1 beschriebenen Schwellwerte und die zu analysierenden Datensätze vorgegeben werden. Weiterhin wurde die Software so implementiert, dass sie zukünftig um weitere Analyse- und Darstellungsmöglichkeiten anhand der bis jetzt errechneten Daten erweitert werden kann. Die Verwendung dieses Clusteralgorithmus mit seinen vielfältigen Möglichkeiten zur Datenauswertung und -darstellung wird die Analyse und Rekonstruktion von Genexpressionsdaten in zukünftigen Arbeiten deutlich vereinfachen und beschleunigen.

Die mit diesem Algorithmus analysierten Datensätze unterscheiden sich in den resultierenden Ergebnissen stark voneinander. Diese Un-

terschiede waren abhängig von dem untersuchten Mutantenstamm und den experimentellen Konditionen, mit denen die Mutanten behandelt wurden. Dabei zeigten sich jedoch unter den Plasmodien innerhalb eines Datensatzes große Ähnlichkeiten in den berechneten Genexpressionsmustern. Diese spezifischen Ergebnisse und die berechneten Wahrscheinlichkeiten für das signifikante Auftreten der ermittelten Cluster belegen, dass der hier programmierte Algorithmus in der Lage ist, individuelle, genregulatorische Muster innerhalb der Expressionsdaten zu identifizieren und darzustellen. Weiterhin können nun anhand dieser Resultate die von Waddington postulierten Signalwege und alternativen genregulatorischen Programme nachgewiesen werden. Die Ergebnisse zeigen deutlich die kleinen Variationen in den Regulationsmustern zwischen den Plasmodien eines Datensatzes, die auf die Existenz von alternativ abrufbaren Programmen der Genregulation schließen lassen. Zur Untermauerung dieser These konnte bereits in Walter u. a., 2013 nachgewiesen werden, dass bestimmte Gene unter denselben experimentellen Voraussetzungen mehrere Expressionszustände aufweisen können. Diese Art von Umschaltmechanismus scheint an dem Zustandekommen dieser alternativen Genregulationsprogramme beteiligt zu sein und sollte in zukünftigen Arbeiten dringend weiter untersucht werden.

### 3.5.2 Spezifische Genregulationsprogramme können nachgewiesen werden

Die Analyse auf Genexpressionscluster in den sporulierten Plasmodien des Mutantenstammes N26B5 resultierte in Ergebnissen, die es ermöglichen, die spezifisch aktivierten Signalkaskaden zur Genregulation nachzuweisen. Es konnte hier gezeigt werden, dass sich die Anzahl der berechneten Korrelationen in diesen Plasmodien von Analyseintervall #1 (0 h - 4 h nach FR) zu Analyseintervall #2 (4 h - 8 h nach FR) drastisch erhöht. Diese Erhöhung der Korrelationen deutet darauf hin, dass die differenzierungsspezifische Signalkaskade in dieser Gruppe von Zellen aktiviert wurde und somit eine Vielzahl von Verknüpfungen der einzelnen Gene und ihrer Produkte untereinander auslöst. Somit lässt sich belegen, dass die Sporulation in *Physarum polycephalum* durch ein weit verzweigtes Netzwerk an gemeinsam regulierten Genen gesteuert wird. Im Gegensatz zu den sporulierten Plasmodien dieses Stammes zeigte sich in den Sporulations-negativen Zellen ein anderes Bild der differentiellen Regulation. Hier traten bereits im ersten Zeitintervall von der DK zu vier Stunden nach Belichtung deutlich mehr Korrelationen auf als in den sporulierten Zellen. Jedoch konnte in dieser Population an Plasmodien nachgewiesen werden, dass sich die Anzahl der korrelierten Gene im zweiten Zeitabschnitt im Vergleich zu den sporulierten Zellen deutlich verringert. Rätzel, 2015 und Hoffmann u. a., 2012 postulierten in ihren bisherigen Arbeiten, dass viele der

sporulationsrelevanten Änderungen in den Genexpressionsleveln während der zellulären Differenzierung zum Zeitpunkt des Point of No Return stattfinden. Der PNR wird von sporulierenden Plasmodien circa sechs Stunden nach Induktion der Zelldifferenzierung erreicht. Die Ergebnisse der Clusteranalyse scheinen jedoch darauf hinzudeuten, dass bereits zwischen dem Zeitpunkt der Induktion und vier Stunden nach Belichtung starke Wechselwirkungen zwischen den Genen der Sporulations-negativen Plasmodien auftraten. Diese Korrelationen lösen sich im Anschluss an den PNR wieder auf und die Zellen sind nicht in der Lage zu sporulieren. Aufgrund dieser Ergebnisse sollten in zukünftigen Analysen die Genregulationsvorgänge in sporulierten und nicht sporulierten Plasmodien vor Eintritt des Point of No Return verglichen werden.

In den Analysen des Mutantenstammes N11D4 konnten in den belichteten Plasmodien zu beiden Vergleichspunkten kaum Genkorrelationen nachgewiesen werden. Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass die Aktivierung der Signalkaskade zur Induktion des Sporulationsvorganges in diesem Stamm nicht möglich ist. Lediglich in den uninduzierten Zellen der Mutante N11D4 konnten Korrelationen zwischen den analysierten Genen nachgewiesen werden. Diese waren jedoch weitaus geringer ausgeprägt als in den Plasmodien des Mutantenstammes N26B5. Eine Verbindung zwischen diesen Korrelationen und der zellulären Differenzierung kann in dieser Mutante nahezu ausgeschlossen werden. Daher könnte das Auftreten dieser Korrelationen auf interne Regulationsvorgänge zurückzuführen sein, wie sie zum Beispiel bei der Regulation des Zellzyklus auftreten.

### 3.6 VALIDIERUNG DES EXPRESS-PROFILING-SYSTEMS

Die Durchführung aller bisherigen Genexpressionsanalysen zur Rekonstruktion des Sporulationsnetzwerkes in *Physarum polycephalum* erfolgte mit dem käuflich erhältlichen GeXP-Kitsystem der Firma Beckman Coulter. Aufgrund der großen Probenumfänge und der damit entstehenden hohen Kosten wurde ein alternativer Chemikaliensatz entwickelt, der die Komponenten der RT-PCR-Reaktion kostensparend ersetzen soll. Dieses neu etablierte Reaktionssystem sollte im Hinblick auf eine gute Anwendbarkeit hin optimiert, überprüft und anschließend mathematisch modelliert werden.

#### 3.6.1 Experimentelle Optimierung

Durch die Optimierung der Zugabemethode der Taq-Polymerase und der RNase-Inhibitor-Konzentration konnte das neue eXpress-Profiling-System für zukünftige Genexpressionsanalysen einsatzfähig gemacht werden. Die Verdünnung des RNase-Inhibitors ermög-

lichte die Reduktion der Kosten für die RT-PCR-Reaktion um 77 %, wodurch die Kosten für Genexpressionsanalysen mit dem neu etablierten Kitsystem im Vergleich zu dem Originalsystem von Beckman Coulter deutlich gesenkt werden konnten. Um die Durchführung von eXpress-Profiling-Analysen noch anwenderfreundlicher zu gestalten, könnte wie in Rummel, 2014 beschrieben, das umständliche Zugeben der Taq-Polymerase per Hand durch die Verwendung von Aptamersequenzen vermieden werden. Diese Sequenzen binden bei niedrigen Temperaturen stabil an die Taq-Polymerase und verhindern somit die Amplifikation unspezifischer Produkte (Lin und Jayasena, 1997).

### 3.6.2 *Mathematische Modellierung des Systems*

Sowohl die Peakquantifizierung als auch die Auswertung der Analysedaten werden durch komplexe Algorithmen der Analysesoftware gewährleistet. Es sollte hier die Genauigkeit des Peakquantifizierungsalgorithmus in Hinblick auf das Verhältnis von eingesetzter DNA zu detektierter Fluoreszenzmenge überprüft werden. Die Analysen zeigten eine lineare Abhängigkeit von Fluoreszenz- zu DNA-Menge. Abweichungen in den höheren Verdünnungsstufen könnten durch Pipettierungenauigkeiten verursacht worden sein. Bei der experimentellen Durchführung der Analysen werden jedoch ausreichend große Volumina eingesetzt, sodass diese Pipettierfehler zu vernachlässigen sind. Es konnte somit nachgewiesen werden, dass die Verdopplung der eingesetzten DNA in den hier verwendeten Konzentrationsbereichen eine Verdopplung der detektierten Fluoreszenzmengen zur Folge hat.

Weiterhin wurde überprüft, inwiefern die detektierten Fluoreszenzmengen von den Primerkonzentrationen abhängen, welche in der Reaktion eingesetzt wurden. Die Messungen mit unterschiedlich stark verdünnten Primermengen zeigten eine quadratische Abhängigkeit zu den resultierenden Fragmentmengen. Dieses Verhältnis kommt dadurch zustande, dass die Primer der RT-PCR-Reaktion im Überschuss vorliegen. Somit wirkt sich eine Verdünnung der Primerkonzentration vorerst nicht limitierend auf die Amplifikationsgeschwindigkeit aus.

Die Reaktionskinetiken des eXpress-Profiling-Systems wurden mithilfe einer Modellgleichung dargestellt, um zukünftige Änderungen der Primerkonzentrationen im Vorfeld theoretisch abschätzen zu können. Anhand der zuvor ermittelten experimentellen Daten sollte die Modellgleichung überprüft und die Parameter an die experimentell ermittelten Werte angepasst werden. Die Ergebnisse des Parameter-Fittings belegten, dass die modellierte Reaktionsgleichung die experimentellen Werte in hohem Maße widerspiegelt und zukünftig so-

wohl für die Abschätzung der Primerkonzentrationen des eXpress-Profiling-Systems, als auch für weitere Modellierungen des Reaktionssystems genutzt werden kann.

Es konnte weiterhin nachgewiesen werden, dass das hier verwendete eXpress-Profiling-System für Genexpressionsanalysen sehr genaue und verlässliche Daten liefert, auf deren Grundlage eine Rekonstruktion des Differenzierungsnetzwerkes in *Physarum polycephalum* ermöglicht wird.

---

## AUSBLICK

---

In der hier durchgeführten Arbeit wurde die zelluläre Differenzierung am Beispiel der Sporulation des Modellorganismus *Physarum polycephalum* analysiert. Dabei wurden die Transkriptmengen ausgesuchter Gene von sporulationsdefizienten Mutanten sowohl an aufeinanderfolgenden Zeitpunkten während der Differenzierung, als auch an Fusionsplasmodien beider Mutanten gemessen und ausgewertet.

In zukünftigen Analysen ist die Durchführung von Sporulationskontrollen an Fusionsplasmodien von besonderer Bedeutung, um auch phänotypisch auf Komplementationen testen zu können. Dazu müssten die konstruierten Fusionszellen vergrößert werden, um ausreichend Zellmaterial für die RNA-Isolierung und die Sporulationskontrollen gewinnen zu können. Zur Gewinnung neuartiger Informationen über das Regulationsnetzwerk der zellulären Differenzierung in *Physarum polycephalum* bietet sich die Möglichkeit, die Fusionszeitpunkte in diesen Versuchen zu variieren. Besonders interessant wäre hier zu überprüfen, ob durch variable Fusionszeitpunkte des Heterokaryons N11D4  $\frac{1}{2}$  + N26B5 DK die Fähigkeit zur Sporulation in N11D4 wieder hergestellt werden kann. Durch derartige Versuche ist es möglich, die Hierarchie der Blöcke in der Signalkaskade zu identifizieren, die in den Sporulationsmutanten verändert wurden.

Eine weitere Möglichkeit zur Durchführung von Fusionsexperimenten ist die Variation der Gendosis der beiden Fusionspartner. Mit Hilfe eines solchen experimentellen Setups kann bestimmt werden, welcher Anteil eines Stammes des Modellorganismus benötigt wird, um einen Mutanten-Phänotyp zu komplementieren. Derartige Experimente ermöglichen ebenfalls die Analyse der Gendosiseffektkurven der hier untersuchten Gene und somit die Rekonstruktion des in Walter u. a., 2013 beschriebenen Umschaltmechanismus. In der Bachelorarbeit von Nicole Gebert (Gebert, 2013) wurden bereits Möglichkeiten entwickelt, mit deren Hilfe die Anteile der beiden Zellkernarten eines Heterokaryons über DNA-Polymorphismen der beiden Stämme bestimmt werden können.

Ein besonders reizvoller Ansatz zur Erweiterung der Genexpressionsanalysen ist die Messung spezifischer Proteine an Wildtyp- und Mutantenstämmen, die mit der Sporulation im Zusammenhang stehen. Mithilfe der Massenspektrometrie kann hier beispielsweise eine Vielzahl an Proteinen in einem einzelnen Experiment identifiziert werden, wodurch die Wechselwirkungen innerhalb der Signalkaskade direkt auf dem Protein-Level nachvollzogen werden können.

Die exakte Lokalisation der Sporulationsdefekte in den Signalkaskaden der hier verwendeten Mutanten ist nicht bekannt. Könnten in den vielkernigen Plasmodien des Modellorganismus *Physarum polycephalum* gezielt Gene ausgeschaltet werden, so würde das die Arbeit an der Analyse der Regulationskaskade beschleunigen. Zu diesem Zweck arbeitete Frau Dominique Kopp in ihrer Masterarbeit (Kopp, 2016) an der Etablierung der CRISPR/Cas9-Technik. Dieses Tool ermöglicht es Leserastermutationen in die DNA eines Organismus einzubringen, die die Expression des Zielgens unterbinden. Mithilfe dieser Methode sollte es zukünftig möglich sein jedes gewünschte Gen in *Physarum polycephalum* auszuschalten und so das Regulationsnetzwerk der zellulären Differenzierung detailliert analysieren zu können.



# 5

---

## MATERIAL UND METHODEN

---

### 5.1 VERWENDETE CHEMIKALIEN

Tabelle 5.1: Verwendete Chemikalien

Name	Hersteller
Agarose	Sigma-Aldrich
Ammoniumsulfat	Roth
Ammoniumsulfat 1 M Lösung	Sigma-Aldrich
Bacto-Agar	Otto Nordwald (Difco Lab.)
Bacto Soyton	Otto Nordwald (Difco Lab.)
Bacto Trypton	Otto-Nordwald (Difco Lab.)
Betain	Sigma-Aldrich
BSA, Albumin Fraktion V	Roth
Calciumcarbonat	Fluka
Calciumchlorid-Dihydrat	Roth
Citronensäure, wasserfrei	Roth
Chloroform	Roth
D(+)-Biotin	Roth
D(+)-Glucose-Monohydrat	Roth
Dimethylsulfoxid, DMSO	Roth
Di-Natriumhydrogenphosphat-Dihydrat	Roth
Dithiothreitol (DTT)-Lösung, RNase-frei, 1 M	Sigma-Aldrich
EDTA-Dinatriumsalz-Dihydrat	Roth
Eisen(II)-chlorid-Tetrahydrat	Merck
Eisensulfat-Heptahydrat	Merck
Essigsäure	Roth
Ethidiumbromid	Roth
Ethanol 100 %	Roth
Ficoll 400	Serva

Name <sup>1</sup>	Hersteller
Genomelab™ Separationspuffer	ABSciex GmbH
Glycerin	Roth
Hemin	Fluka
Hi-Di-Formamid	Invitrogen
Isoamylalkohol	Roth
Kaliumchlorid	Roth
Kaliumchlorid 1 M Lösung	Sigma-Aldrich
Kaliumdihydrogenphosphat	Roth
Kupfer(II)-chlorid	Fluka
Lambda DNA	Fermentas
Magnesiumchlorid-Hexahydrat	Merck
Magnesiumchlorid 1 M Lösung	Sigma-Aldrich
Magnesiumsulfat-Heptahydrat	Roth
Mangan(II)-chlorid-Dihydrat	Merck
Mineralöl	ABSciex GmbH
Natriumacetat-Lösung 3 M, pH 5.5	Sigma-Aldrich
Natriumdihydrogenphosphat-Dihydrat	Sigma-Aldrich
Niacin	Sigma-Aldrich
Niacinamide	Sigma-Aldrich
Orange G	Sigma-Aldrich
peqGOLD TriFast™	Peqlab
Phenol, wassergesättigt	Roth
Salzsäure	Roth
SEPHADEX G-100, DNA Grade	Sigma-Aldrich
Stickstoff, flüssig	Westfahlen AG
Thiamin-Hydrochlorid	Roth
Tris-Borat-EDTA Puffer, 10 x TBE	Sigma-Aldrich
Tris	Roth
Tris-HCl 1 M Lösung, pH 9	Sigma-Aldrich
Tris 2 M Lösung, pH 8	Sigma-Aldrich
Tween 20	Roth
Wasser	Sigma-Aldrich
Yeast Extract	Otto-Nordwald (Difco Lab.)
Zinksulfat-Heptahydrat	Merck

<sup>1</sup> Weiterhin wurden die SI-Einheitszeichen und Abkürzungen für chemische Elemente verwendet. Es wurde zu jeder Zeit Nuklease- und Template-freies, deionisiertes Wasser verwendet.

## 5.2 VERWENDETE GERÄTE

Tabelle 5.2: Verwendete Geräte

Hersteller	Bezeichnung	Typ
Air liquide	TP60	Stickstofftank
Beckman Coulter	Avanti J-26 XP	Zentrifuge
Beckman Coulter	CEQ8800	Sequenzierer
Biometra	Tprofessional	PCR-Cycler
Biometra	UVsolo	Geldokumentation
Eppendorf	Thermomixer comfort	Schüttelinkubator
Eppendorf	5417 R	Zentrifuge
Heraeus	Biofuge	Zentrifuge
Heraeus	Heraguard	Sterilbank
Heraeus	Herasafe	Sterilbank
Heraeus	HF 486	Freezer –80 °C
Hettich	Rotanda 46 RC	Kühlzentrifuge
IBS	Fireboy	Brenner
Infors	Minifors	Tischfermenter
Infors	Multitron II (3x)	Schüttelinkubator
Lauda	E100/RE 104	Kühlthermostat
Liebherr		Freezer
Liebherr	Gastroline	Kühlschrank
Memmert		Inkubator
Mettler-Toledo		Waage
Nanodrop	ND1000	Photometer
Scotsman	AF20	Eismaschine
Severin		Mikrowelle
SHP	Laboklav 135 MSLV	Autoklav
Peqlab	PerfectBlue	Horizontale Elektrophorese
Peqlab	PerfectSpinP	Plattenzentrifuge
Peqlab	Precellys 24-Dual	Zellaufschluss
Pharmacia	EPS 300	Spannungsgerät
Thermo scientific	FR215TEC	Freezer
VWR		Vortexer
WPI	SP200IZ SYRINGE PUMP	Spritzenpumpe
		Plattenkringelapplikator
		Rotlichtwagen

## 5.3 VERBRAUCHSMATERIALIEN

Tabelle 5.3: Verbrauchsmaterialien

Produkt	Hersteller
Adhesive PCR Film	Thermo Scientific
Cryoröhrchen mit Außengewinde, 2 mL	Roth
Cryoröhrchen mit Außengewinde &- Silikondichtung, 1.2 mL	Roth
Einmalspritzen, Omnifix®- Luer-Lock-Anschluss, 60 mL	Roth
Filter Acro®50, 0.2 µm, 0.45 µm	VWR
Injekt®-F 1 mL Spritze	Braun Melsungen AG
MF-Millipore Membranfilter 0,025 µm	Merk Millipore
PCR Plate, 0.2 mL 96 Well	Thermo Scientific
peqGold PhaseTrap A 2 mL Tubes	Peqlab
Petrischalen 94 mm x 16 mm	Greiner Bio-One
Pipettenspitzen filterlos- 10µL, 20µL, 200µL, 1000 µL	Ratiolab
Pipettenspitzen mit Filter- 10µL, 20µL, 200µL, 1000 µL	Biozym
PP Probenplatte 96 Well	Corning Life Science Europe
PP Flat Bottom Pufferplatte 96 Well	Corning Life Science Europe
Precellys Glaskügelchen Ø 0.5 mm	Peqlab
Rotilabo®Rundfilter (113A), 15 mm	Roth
Safe-Lock Tubes 1,5 mL, 2 mL	Eppendorf
Serologische Rotilabo®-Pipetten, 25 mL	Roth
Test Tubes, 15 mL, 50 mL	Greiner Bio-One
Thermowell Sealing Tape	Corning Life Science Europe

## 5.4 ENZYME

Tabelle 5.4: Verwendete Enzyme

Name	Firma
RevertAid™ Reverse Transkriptase Taq-Polymerase <sup>1</sup>	Thermo Scientific
RiboLock RNase Inhibitor	Thermo Scientific

## 5.5 STÄMME

Die in dieser Arbeit verwendeten Stämme von *Physarum polycephalum* wurden als Amöben mutagenisiert, apogam zu Plasmodien kultiviert und auf ihren Phänotyp gescreent. Die daraus resultierenden Mutanten wurden für diese Arbeit zur Verfügung gestellt.

Tabelle 5.5: *Physarum polycephalum*-Stämme

Stamm	Genotyp	Phänotyp	Referenz
#31	<i>matA2, fusA1, gadAh, npfC<sup>+</sup>, whiA<sup>+</sup></i>	Wildtyp	Starostzik und Marwan, 1998
N11D4	<i>matA2, fusA1, gadAh, whiA<sup>+</sup></i>	Sporulationsmutante	Starostzik und Marwan, 1998
N26B5	<i>matA2, fusA1, gadAh, whiA<sup>+</sup></i>	Sporulationsmutante	Starostzik und Marwan, 1998

<sup>1</sup> Freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Dr. Anke Jungebloud nach Pluthero, 1993

## 5.6 PRIMER

Tabelle 5.6: Verwendete Primer

ID <sup>1</sup>	Startpos. <sup>2</sup>	Primersequenz	Locus
2262	18212(c)	GTTTGCCGGTCAATAAATG	J02459
2365	0(c)	gtacgactcactatagga	
2428	1076	aggtgacactatagaata- CCTTTGGGTAGCTGGGTACA	NR_074204
2429	1244(c)	gtacgactcactatagga CAGCCCTCAATCCGAACTAC	NR_074204
2451	18072	gtacTGATAAGTGGAATGCCATGTG	J02459
2453	18161	gtACACGGAGGAAGGCAAACCT	J02459
2454	18141	gtacTATTGGCCTCAGCATGGAG	J02459
2455	18127	gtacCATTATGTGCGGGTATTGG	J02459
2456	18111	gtacGACCAAAGACGGCAAACATTA	J02459
2457	18101	gtacAAATTGAGCAGACCAAAGACG	J02459
2458	18086	gtaCCATGTGGGCTGTCAAAT	J02459
2459	18052	gtacAAAGAGTGGAAGGATGCCAGT	J02459
2460	18032	gtacGCAGACTGGAGGAGTTTTTCG	J02459
2461	18019	gtacGAGGATAACGCCAGCAGACT	J02459
2462	18006	gtacAGTCCGAGCTGACGGAGGATA	J02459
2463	17988	gtaCAAGGAGCTGCTGGAAAAG	J02459
2464	17967	gtacGATAACCGAATCCCATCTCG	J02459
2465	17959	gtacAAAGGCAAGATAACCGAATCC	J02459
2466	17959	gtacggagaacaggt AAAGGCAAGATAACCGAATCC	J02459
2467	17933	gtacATGCGGAAGGTTACCTGGAT	J02459
2468	17933	gtacacaacgaatgacagcaa ATGCGGAAGGTTACCTGGAT	J02459
2469	17893	gtacAAATCGGCATTCGTGGAG	J02459
2470	17873	gtacGCAGTGTGAACACCGTTGG	J02459
2471	17873	gtactgtaagaaccgattcag GCAGTGTGAACACCGTTGG	J02459
2472	17837	gtacATATCAAACCGGGCCATGAT	J02459
2473	17817	gtaCTGGATAGCCGCCAGTATCA	J02459

<sup>1</sup> Die Zahlen geben die Nummern der Laborsammlung wieder.

<sup>2</sup> Primer, die auf dem Gegenstrang liegen, sind mit einem (c) gekennzeichnet.

ID <sup>1</sup>	Startpos. <sup>2</sup>	Primersequenz	Locus
2480	122	aggtgacactatagaata- GACTGCCAGAAGAAAGGACG	contig08681_1.exp
2481	182(c)	gtacgactcactataggga- ATCGCACCTTGAACCTTGTT	contig08681_1.exp
2482	396	aggtgacactatagaata- CCACTGCTGCAGACAAGAAG	contig12862_1.exp
2483	462(c)	gtacgactcactataggga- TTATGCGAGAGCAGCCTTTT	contig12862_1.exp
2484	140	aggtgacactatagaata- AAGGCATGTTATTTACGCCG	contig00120_1.exp
2485	218(c)	gtacgactcactataggga- GGGTGCGTAGTATCTCCCTG	contig00120_1.exp
2486	288	aggtgacactatagaata- AACAAACTTGGACACCCAGC	contig11497_1.exp
2487	372(c)	gtacgactcactataggga- CTGTAAAGGAACCGGGAAAA	contig11497_1.exp
2488	40	aggtgacactatagaata- CGAAAAACGAACACCCTTGT	contig02400_1.exp
2489	130(c)	gtacgactcactataggga- CACATTCCATGTTTTTGCCA	contig02400_1.exp
2490	559	aggtgacactatagaata- GGAGGTTTTACCCACGAACA	EL579430
2491	655(c)	gtacgactcactataggga- TTGTTCGTGTTTCAGGTCCAA	EL579430
2492	340	aggtgacactatagaata- ATCGAATCAGGTCTCGCTGT	contig05597_1.exp
2493	442(c)	gtacgactcactataggga- TTCAAGCAGGTCACAAGGTG	contig05597_1.exp
2494	308	aggtgacactatagaata- AAAAATGCTCGATTTGGTCG	contig00369_1.exp
2495	416(c)	gtacgactcactataggga- CGATAATCTTCTCGATCCGC	contig00369_1.exp
2496	5	aggtgacactatagaata- GATTGCCTACGTTTGTGCCT	contig11781_1.exp
2497	119(c)	gtacgactcactataggga- TTCCAAAATCGGCTAGCAAC	contig11781_1.exp

<sup>1</sup> Die Zahlen geben die Nummern der Laborsammlung wieder.

<sup>2</sup> Primer, die auf dem Gegenstrang liegen, sind mit einem (c) gekennzeichnet.

ID <sup>1</sup>	Startpos. <sup>2</sup>	Primersequenz	Locus
2498	251	aggtgacctatagaata- GATATGTCAACAATCGCCCC	contig03233_1.exp
2499	371(c)	gtacgactcactataggga- CTGACGGATGAGGAGCTTTC	contig03233_1.exp
2500	188	aggtgacctatagaata- TGGTGTGATGGTTGGTATGG	EL564418
2501	214(c)	gtacgactcactataggga- AGGTGTGGTGCCAGATTTTC	EL564418
2502	231	aggtgacctatagaata- TCTCCAAGAAAGCGATGGTC	contig03326_1.exp
2503	369(c)	gtacgactcactataggga- AAGCTCACCAGGAAGGATCA	contig03326_1.exp
2504	152	aggtgacctatagaata- AACACATGATTGGGTGAGCA	EL577944
2505	296(c)	gtacgactcactataggga- TTTACTTGCGGTGTGGAACC	EL577944
2506	335	aggtgacctatagaata- GCCACCGATTAAATATCCCC	contig02333_1.exp
2507	485(c)	gtacgactcactataggga- TAGTGCTAGGGGCCAATGAG	contig02333_1.exp
2508	671	aggtgacctatagaata- AATCACAGCAAACGCCAATA	PpolyN1a03e03.t7
2509	833(c)	gtacgactcactataggga- CCGTGAGTTCCGAGTCCTAA	PpolyN1a03e03.t7
2510	118	aggtgacctatagaata- GTGGAGAGCCTGGAGTGGTA	PpolyNOa06h03.t7
2511	292(c)	gtacgactcactataggga- TTTTTGATCACATTTCGGGC	PpolyNOa06h03.t7
2512	72	aggtgacctatagaata- GCCATTTATTTTCACAGCCC	PpolyNOa09a09.t7
2513	252(c)	gtacgactcactataggga- TGCGCAAATAGTTGATGTCC	PpolyNOa09a09.t7
2514	5	aggtgacctatagaata- GATTGGACAACCTTGAGCC	PpolyN1a05c09.m13r
2515	191(c)	gtacgactcactataggga- TGCTCTTTTGCCTTCGAAAT	PpolyN1a05c09.m13r

<sup>1</sup> Die Zahlen geben die Nummern der Laborsammlung wieder.

<sup>2</sup> Primer, die auf dem Gegenstrang liegen, sind mit einem (c) gekennzeichnet.



ID <sup>1</sup>	Startpos. <sup>2</sup>	Primersequenz	Locus
2516	87	aggtgacctatagaata- TGAGTTGTTTTGACTGCGGA	contig05590_1.exp
2517	279(c)	gtacgactcactataggga- TTTATGGGCAAAGAATTCGC	contig05590_1.exp
2518	672	aggtgacctatagaata- CCACAAGGGCACCTATGACT	PpolyN1d32d11.t7
2519	870(c)	gtacgactcactataggga- TCTGGAAGTGGGCTATGAGG	PpolyN1d32d11.t7
2520	39	aggtgacctatagaata- ATCAAGCCAACTTCGACTGC	contig00262_1.exp
2521	243(c)	gtacgactcactataggga- TGTGTCTCCGTTGTCCTCTG	contig00262_1.exp
2522	355	aggtgacctatagaata- GTGGCTGGTGTGTCTTCCTT	contig12081_1.exp
2523	565(c)	gtacgactcactataggga- TTCTTGGTCACGACAGCTTG	contig12081_1.exp
2524	24	aggtgacctatagaata- ATCGCACAACCCACTACTCC	contig00969_1.exp
2525	240(c)	gtacgactcactataggga- CCTTCAAGATCCCCAACCTT	contig00969_1.exp
2526	237	aggtgacctatagaata- TGGGAACAAAACGGACTCTC	PpolyNoao5c07.t7
2527	459(c)	gtacgactcactataggga- CGGAATTGCTGAGATTGGAT	PpolyNoao5c07.t7
2528	1160	aggtgacctatagaata- TGGTGAGTCAGCATAACCCAA	PLD1_738_polyA
2529	1389(c)	gtacgactcactataggga- ACAACTGCGGCAGAGAGAT	PLD1_738_polyA
2530	124	aggtgacctatagaata- TGAGAAAGCCGAAGAGGATG	contig10470_1.exp
2531	359(c)	gtacgactcactataggga- CTCTTGGCAAAGAAGGCTTG	contig10470_1.exp
2532	1056	aggtgacctatagaata- AAACACAGGACTTTTTGCCG	PpolyN1d18do6.t7
2533	1297(c)	gtacgactcactataggga- GGTTGACTGGTGGATGGAAC	PpolyN1d18do6.t7

<sup>1</sup> Die Zahlen geben die Nummern der Laborsammlung wieder.

<sup>2</sup> Primer, die auf dem Gegenstrang liegen, sind mit einem (c) gekennzeichnet.

ID <sup>1</sup>	Startpos. <sup>2</sup>	Primersequenz	Locus
2534	424	aggtgacctatagaata- AGGTTATGATGCCGTGAACC	contig10153_1.exp
2535	671(c)	gtacgactcactataggga- AGGAAAGCCATTTTGTGTGC	contig10153_1.exp
2536	288	aggtgacctatagaata- GACCTCAACCACATTGCCTT	PpolyN1d50g09.t7
2537	541(c)	gtacgactcactataggga- GGGTTTGGAGATGACCTTGA	PpolyN1d50g09.t7
2538	262	aggtgacctatagaata- TTGTGGGATCTGGGAACATT	contig00397_1.exp
2539	521(c)	gtacgactcactataggga- CTTCCCCATATAAAGGCGCT	contig00397_1.exp
2540	338	aggtgacctatagaata- AAGCTCACGCAGGAGTTCAT	contig04854_1.exp
2541	612(c)	gtacgactcactataggga- GAAATCATACTGCGAGTGG	contig04854_1.exp
2542	242	aggtgacctatagaata- CTGTTTTTCCTGACTGGGGA	PpolyN1d66e10.t7
2543	522(c)	gtacgactcactataggga- TATCACCGCCTAAATCTGCC	PpolyN1d66e10.t7
2544	735	aggtgacctatagaata- ATGCCGATTTGTTGGAGAAG	PpolyN1d106h10.t7
2545	1022(c)	gtacgactcactataggga- TGTTGACCCAATAGCATCCA	PpolyN1d106h10.t7
2546	238	aggtgacctatagaata- TTACTGGGGGTTACTGCGAT	contig01538_1.exp
2547	531(c)	gtacgactcactataggga- TCATCTCTCCGTCATGCTG	contig01538_1.exp
2548	388	aggtgacctatagaata- GGTGCCCTTAAGCAAATCAA	PpolyN1a08g07.t7
2549	688(c)	gtacgactcactataggga- GGTGCTGCAGACATCCTGTA	PpolyN1a08g07.t7
2550	o	AGGTGACACTATAGAATA	

<sup>1</sup> Die Zahlen geben die Nummern der Laborsammlung wieder.

<sup>2</sup> Primer, die auf dem Gegenstrang liegen, sind mit einem (c) gekennzeichnet.

## 5.7 MEDIEN

## 5.7.1 Hemin-Lösung

Tabelle 5.7: Hemin-Lösung

Zusammensetzung	Reinheitsgrad	Menge für 600 mL
Hemin	≥ 98,00 % HPLC	0,3 g

Hemin in 150 mL 1 N NaOH lösen und mit MilliQ-Wasser auf 600 mL auffüllen. Lösung in 30-40 mL Aliquots abfüllen und autoklavieren. Flaschen nach dem Autoklavieren fest verschließen und im Dunkeln lagern. So bleibt die Lösung bis zu mehreren Monaten lagerfähig.

## 5.7.2 Sporulations-Agar

Tabelle 5.8: Sporulations-Agar

Zusammensetzung	Menge für 1 L
Bacto-Agar	17 g
MilliQ-Wasser	950 mL
mit Rührfisch autoklavieren	
Nach Abkühlen auf 50 °C Zugabe von:	
Lösung 1 (auf 50 °C vorgewärmt)	47 mL
Lösung 2 (auf 50 °C vorgewärmt)	10 mL
Lösung 3 (auf 50 °C vorgewärmt)	11 mL

Nach dem Abkühlen auf 42 °C werden Platten mit je 30 mL gegossen.

Tabelle 5.9: Lösung 2

Zusammensetzung	Reinheitsgrad	Menge für 1 L
Niacin $C_6H_5NO_2$		0,10 g
Niacinamide $C_6H_6N_2O$		0,10 g
MilliQ-Wasser		10 mL

Lösung in Schott-Flaschen abfüllen und mit Rührfisch autoklavieren.

Tabelle 5.10: Lösung 3

Zusammensetzung	Reinheitsgrad	Menge für 1 L
Calciumcarbonat CaCO <sub>3</sub>	≥ 99,00%p.a.(KT)	1.10 g
MilliQ-Wasser		11 mL

Lösung in Schott-Flaschen abfüllen und mit Rührfisch autoklavieren.

Tabelle 5.11: Lösung 1

Zusammensetzung	Reinheitsgrad	Menge für 1 L
Salz-Stock-Lösung		30 mL
Kupferchlorid-Lösung		7 mL
Kaliumdihydrogenphosphat-Lösung		10 mL

Lösung in Schott-Flaschen abfüllen und mit Rührfisch autoklavieren.

Tabelle 5.12: Salz-Stock-Lösung

Zusammensetzung	Reinheitsgrad	Menge für 1 L
Calciumchlorid-Dihydrat CaCl <sub>2</sub> x 2 H <sub>2</sub> O	≥ 99,00 % p.a., ACS	20 g
Magnesiumsulfat-Heptahydrat MgSO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O	≥ 99,00 % p.a., ACS	20 g
Citronensäure, wasserfrei	≥ 99,50 % p.a.	36,60 g
In 600 mL MilliQ-Wasser lösen, dann Zugabe von:		
Salzsäure HCL	≥ 32,00 % p.a., ISO	4 mL
Eisen(II)-Chlorid-Tetrahydrat FeCl <sub>2</sub> x 4 H <sub>2</sub> O	≥ 99,00 % p.a.	2,80 g
Zinksulfat-Heptahydrat ZnSO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O	≥ 99,50 % - 103,00 % p.a.	1,12 g
Mangan(II)-chlorid-Dihydrat MnCl <sub>2</sub> x 2 H <sub>2</sub> O	≥ 99,00 %	2,28 g

Lösung mit MilliQ-Wasser auf 1 L auffüllen.

Tabelle 5.13: Kupferchlorid-Lösung, 0,02 M

Zusammensetzung	Reinheitsgrad	Menge für 1 L
Kupfer(II)-chlorid CuCl <sub>2</sub>	≥ 98,00 % (RT)	2,689 g

In MilliQ-Wasser lösen und auf 1 L auffüllen.

Tabelle 5.14: Kaliumdihydrogenphosphat-Lösung, 0,03 M

Zusammensetzung	Reinheitsgrad	Menge für 1 L
Kaliumdihydrogenphosphat K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	≥ 99,00 % p.a., ACS	4,083 g

In MilliQ-Wasser lösen und auf 1 L auffüllen.

### 5.7.3 Sporulationsmedium, flüssig

Tabelle 5.15: Sporulationsmedium

Zusammensetzung	Reinheitsgrad	Menge für 1 L
Chlorid-Stammlösung (10 %)		6,0 mL
Sulfat-Stammlösung (10 %)		6,0 mL
Citronensäure, wasserfrei	≥ 99,0 % p.a.	3,69 g
Eisen(II)-chlorid-Tetrahydrat FeCl <sub>2</sub> × 4 H <sub>2</sub> O	99,0 % p.a.	Merck
In MilliQ-Wasser lösen		0,75 L
pH-Wert mit 30 % KOH einstellen auf 4,6		
Auffüllen auf		1 L

Lösung in Schott-Flaschen abfüllen und autoklavieren.

Tabelle 5.16: Chlorid-Stammlösung (10 %)

Zusammensetzung	Reinheitsgrad	Menge für 1 L
Calciumchlorid-Dihydrat CaCl <sub>2</sub> × 2 H <sub>2</sub> O	≥ 99,0 % p.a., ACS	100,0 g
Mangan(II)-chlorid-Dihydrat MnCl <sub>2</sub> × 2 H <sub>2</sub> O	≥ 99,0 % p.a.	11,6 g

In MilliQ-Wasser lösen und auf 1 L auffüllen.

Tabelle 5.17: Sulfat-Stammlösung (10 %)

Zusammensetzung	Reinheitsgrad	Menge für 1 L
Magnesiumsulfat-Heptahydrat $\text{MgSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$	$\geq 99,0$ % p.a., ACS	100,0 g
Zinksulfat-Heptahydrat $\text{ZnSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$	$\geq 99,5 - 103,0$ % p.a.	8,97 g

In MilliQ-Wasser lösen und auf 1 L auffüllen.

#### 5.7.4 Wachstumsmedium für Mikroplasmodien

Tabelle 5.18: Wachstumsmedium für Mikroplasmodien, WM

Zusammensetzung	Reinheitsgrad	Menge für 1 L
Bacto-Trypton		10 g
Yeast Extract		1,50 g
D(+)-Glucose Monohydrat	$\geq 99,50$ % Ph.Eur.	11 g
Citronensäure, wasserfrei	$\geq 99,50$ % p.a.	3,54 g
Eisensulfat-Heptahydrat $\text{FeSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$	$\geq 99,50$ % ACS	0,084 g
Calciumchlorid-Dihydrat $\text{CaCl}_2 \times 2 \text{H}_2\text{O}$	$\geq 99,00$ % p.a., ACS	0,60 g
Kaliumdihydrogenphosphat $\text{KH}_2\text{PO}_4$	p.a., ACS	2,00 g
in MilliQ-Wasser lösen 100x MMZ-Lösung zugeben		ca 0,7 L 10 mL

Der pH-Wert wird mit 4 N NaOH auf 4,6 eingestellt, die Lösung in Schott-Flaschen eingefüllt und autoklaviert.

Tabelle 5.19: 100x MMZ-Lösung

Zusammensetzung	Reinheitsgrad	Menge für 1 L
Magnesiumsulfat-Heptahydrat $\text{MgSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$	$\geq 99,00 \%$ p.a., ACS	60,00 g
Mangan(II)-chlorid-Dihydrat $\text{MnCl}_2 \times 2 \text{H}_2\text{O}$	$\geq 99,00 \%$ p.a.	6,00 g
Zinksulfat-Heptahydrat $\text{ZnSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$	$\geq 99,50 \%$ - 103,00 % p.a.	

In MilliQ-Wasser lösen und auf 1 L auffüllen.

## 5.8 KULTIVIERUNG VON *PHYSARUM POLYCEPHALUM* PLASMODIEN FÜR GENEXPRESSIONSANALYSEN

Zur Kultivierung von sporulationskompetenten Plasmodien zur Analyse der Genexpression wurden Flüssigspherulen in 50 ml Wachstumsmedium (s. Kapitel 5.7.4) + 1 % Hemin in einen 500 mL Schüttelkolben mit Schikane überimpft. Diese wurden bei 24 °C und 150 rpm in einem Multitron II Schüttelinkubator der Firma Intron geschüttelt, bis sich Mikroplasmodien entwickelten. Diese Mikroplasmodienkulturen wurden anschließend, nach Erreichen einer konstanten Wachstumsrate, in einem Rhythmus von 3,5 Tagen in einen neuen Kolben mit 50 mL WM + 1 % Hemin überimpft. Das Animpfvolumen für die Schüttelkolben sollte so gewählt werden, dass sich nach Ablauf der 3,5 Tage eine hohe Zelldichte in den Kulturen eingestellt hat. Für die in dieser Arbeit verwendeten Kulturen wurden folgende Volumina zur Beimpfung eines 500 mL Schüttelkolbens gewählt:

Tabelle 5.20: Animpfvolumina für 500 mL Schüttelkolben

Stamm	Volumen in mL
#31	1,5
N26B5	1,5
N11D4	3

### 5.8.1 Kultivierung im Fermenter

Da die Sporulation von *Physarum polycephalum* gezielt induziert werden sollte, wurde die Arbeit von der Kultivierung im Fermenter bis zum Einfrieren der Proben für die RNA-Isolierung ausschließlich

unter sterilen Bedingungen und in Dunkelheit durchgeführt. Für kurze Intervalle ist die Arbeit unter Grünlicht zulässig, das es keinen Einfluss auf die Sporulationskompetenz hat (Nakagaki u. a., 1996).

Um die Ausbeute an Zellmasse zu erhöhen, wurde ein 5 L Minifors Tischfermenter der Firma Infors mit 1,5 L WM + 1 % Hemin (s. Kap. 5.7.4 und 5.7.1) befüllt und mit 100 mL einer 3,5 Tage alten Mikroplasmoidien Schüttelkultur beimpft. Zur Inokulation der Fermenter wurden für die in dieser Arbeit verwendeten Stämme folgende Volumina verwendet:

Tabelle 5.21: Animpfvolumina für Fermenter

Stamm	Volumen in mL
#31	30
N26B5	30
N11D4	40

Die Mikroplasmoidien wurden für 4 Tage bei 24 °C, 250 rpm und einer Begasungsrate von 1 L Luft/min im Fermenter unter der Verwendung eines Marinegegenrührers kultiviert. Es hat sich eine Abluftkühltemperatur von 15 °C als günstig erwiesen, da sich so kein Kondenswasser bildet.

Nach der Ablauf der Kultivierungszeit wurde der Fermenterinhalt über eine am Ernterohr des Fermenters angebrachte Schlauchverbindung in einen 3 L Erntekolben abgelassen und anschließend in vier 500 mL Zentrifugengefäße überführt. Es wurden je zwei Zentrifugengefäße gegeneinander austariert und die Mikroplasmoidien durch Zentrifugation bei 24 °C, 1700 rpm, Beschleunigung 9 und Bremse 4 für 5 min pelletiert. Das Medium wurde dekantiert und die Zentrifugenbecher zu etwa einem 3/4 ihres Volumens mit Sporulationslösung (s. Kap. 5.7.3) aufgefüllt. Das Pellet wurde durch mehrmaliges kräftiges Schütteln resuspendiert und erneut unter den oben genannten Bedingungen zentrifugiert. Im Anschluss wurde das Medium dekantiert und die Pellets aus je zwei Zentrifugenbechern zusammengeführt. Diese wurden erneut zu etwa einem 3/4 ihres Volumens mit Sporulationslösung aufgefüllt, durch kräftiges Schütteln resuspendiert und ein drittes Mal unter den oben genannten Bedingungen zentrifugiert. Der Überstand wurde dekantiert, das Zellpellet auf eine Petrischale (Ø 18 mm, mit einem Papierhaushaltstuch und 6 Blatt Rotilabo® Rundfilter ausgelegt, autoklaviert) überführt und für ca. 45 min in Dunkelheit bei Raumtemperatur inkubiert.



### 5.8.2 Plattieren der Mikroplasmodien

Anschließend wurde das Zellpellet mit einem Löffelspatel in eine 60 mL Omnifix<sup>®</sup> Einmalspritze mit Luer-Lock Anschluss überfüllt, welche mit einem Kunststoffschlauch (4 mm x 6 mm mit Luer-Verschluss) verbunden war. Zur Applikation der Zellmasse auf die Sporulationsplatten (vgl. 5.7.2) wurde die Spritze in eine WPI Spritzenpumpe gespannt und die Zellmasse mit einer Pumprate von 18,66 mL/min auf die Platten aufgebracht. Diese Pumprate ergibt mit dem Spritzendurchmesser von 27,7 mm die Applikation von 1 g Zellmasse je Platte. Die beimpften Sporulationsplatten wurden für sechs Tage in Dunkelheit bei 22 °C in einem Memmert Inkubator inkubiert. Diese Hungerphase ermöglicht das Erreichen der Sporulationskompetenz der Plasmodien.

## 5.9 ENTNAHME VON PROBEN FÜR GENEXPRESSIONSANALYSEN

Nach Ablauf der Hungerphase wurden die Proben nach dem in Abb. 5.1 dargestellten Schema entnommen.

In diesem experimentellen Setup wurde mit zwei Sporulationsmutanten von *P. polycephalum*, N26B5 und N11D4, gearbeitet. Zu Beginn der Probenahme wurde von allen Plasmodien beider Stämme ein Achtel des Zellmaterials als Dunkelkontrolle mit einem Glaslöffel von der Agarplatte abgenommen. Das Pellet wurde mit einem in Stickstoff vorgekühltem Plastikspatel vom Löffel abgenommen und in einem mit Flüssigstickstoff gefülltem Cryoröhrchen schockgefroren. Um die Rückfütterung der Plasmodien mit Zellresten zu verhindern, wurde der abgeerntete Agar mit einem Spatel von den Platten entfernt.

Anschließend wurde Stamm A (Stamm N26B5, vgl. Abbildung 5.1) für 30 min mit dunkelrotem Licht ( $\lambda \geq 700$  nm, 13 Wm<sup>2</sup>), wie in Marwan, 1998 beschrieben, belichtet, um die Sporulation zu induzieren, während Stamm B (Stamm N11D4, vgl. Abbildung 5.1) uninduziert verblieb. Vier Stunden nach der Belichtung wurde von den Plasmodien beider Stämme erneut ein Achtel des zu Beginn des Experimentes vorhandenen Zellmaterials wie bereits beschrieben abgenommen und eingefroren. Zusätzlich wurde von den Plasmodien beider Stämme je ein Achtel samt Agar von der Petrischale entnommen und auf einer neuen Petrischale zur Fusion zusammengebracht. Dabei wurden die beiden Agarstücke relativ auf eine Weise zueinander verschoben, dass große Adern der beiden Plasmodien möglichst nahe zusammengebracht wurden. Dadurch sollte erreicht werden, dass die Fusion möglichst schnell erfolgte. Acht Stunden nach Belichtung wurde erneut ein Achtel jedes Plasmodiums beider Stämme abgenommen und eingefroren. Zusätzlich wurden die Fusionsplasmodien zum Zeitpunkt acht Stunden nach Belichtung (bzw. vier

Stunden nach Fusion) an der ursprünglichen Fusionsstelle getrennt und das Zellmaterial separat für die RNA-Isolation abgenommen. Der Rest des Zellmaterials verblieb als Sporulationskontrolle auf den Platten.

Zusätzlich wurde ein Kontrollexperiment dahingehend durchgeführt, dass Stamm N11D4 belichtet (A) und Stamm N26B5 nicht belichtet (B) wurde.

Die Plasmodien wurden zwischen den Probenahmen weiterhin bei 22 °C in Dunkelheit inkubiert. Die eingefrorenen Proben wurden bis zur Isolierung der RNA bei -80 °C gelagert.

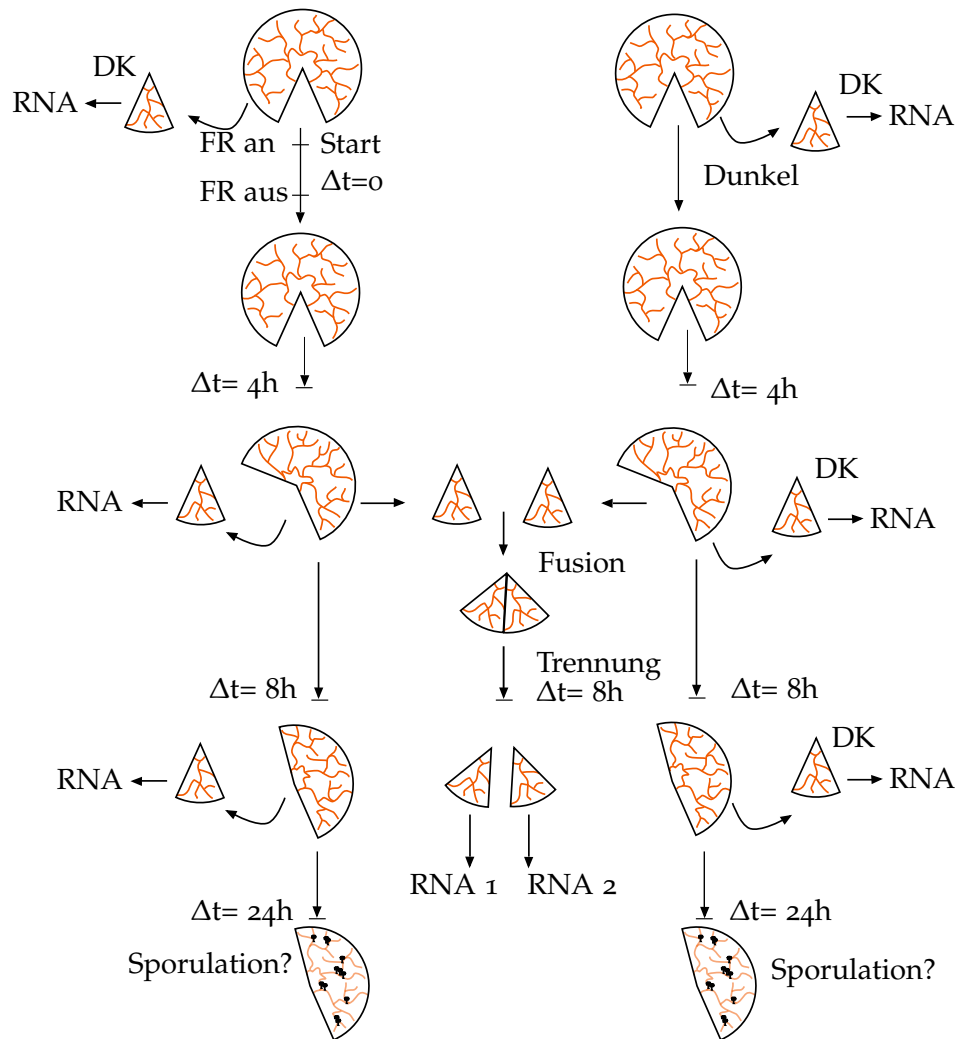


Abbildung 5.1: Dargestellt ist ein Schema zur simultanen Probenahme für Zeitreihenanalysen (links bzw. rechts) und Fusionsexperimente (Mitte). Erläuterungen im Text.

## 5.10 ISOLIERUNG DER RNA

Die Isolierung der RNA erfolgte modifiziert nach der Methode von Chomczynski und Sacchi, 2006.

Für den Zellaufschluss wurde je Probe ein 2 mL Schraubdeckelgefäß mit ca. 200 µL Precellys Glaskügelchen und 1,5 mL peqGold TriFast™-Lösung vorgelegt. Die eingefrorenen Plasmodien wurden auf Trockeneis bereitgehalten, zügig in die Schraubdeckelgefäße überführt und anschließend sofort mit dem Precellys 24 Homogenisator für 10 s bei 5900 rpm homogenisiert. Zeitgleich wurden die Peqgold PhaseTrap A Tubes bei RT und 16000 × g für 1 min zentrifugiert, um das darin enthaltene Wachs zu pelletieren. Das Zellhomogenisat wurde in ein 2 mL Peqgold PhaseTrap A Tube überführt und mit 300 µL Chloroform versetzt. Die Tubes wurden für 30 s kräftig per Hand geschüttelt und anschließend 1 min bei RT und 16000 × g zentrifugiert, um die Phasen zu trennen. Die in den Tubes enthaltene, wachsartige Substanz bildet während der Zentrifugation eine Trennschicht zwischen wässriger Oberphase und Inter- bzw. organischer Phase. Die wässrige Phase, welche die zu isolierenden Nukleinsäuren enthält, wird so vor Kontaminationen durch DNA und der Phenolphase geschützt. Die wässrige Phase wurde abgenommen und in ein neues, Template- und Nuklease-freies 2 mL Eppendorf Reaktionsgefäß überführt und sofort auf Eis gestellt.

Zur Fällung der RNA wurden 0,9 V einer Ethanol/Essigsäure Lösung (−20 °C) je Tube zugegeben und durch Invertieren gemischt. Die Tubes wurden anschließend 24 h bei −20 °C gelagert.

#### Ethanol/Essigsäure-Lösung

3,5 V Ethanol (≥ 99,8 %)  
1 V Essigsäure (1 M)

Die Proben wurden am nächsten Tag für 15 min bei 13000 rpm und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, zu jeder Probe 400 µL 3 M Natriumacetat (kalt, auf Eis) zugegeben und erneut 10 min bei 13000 rpm und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und jede Probe mit 400 µL 70 % Ethanol gewaschen. Anschließend wurde für 10 min bei 13000 rpm und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde erneut verworfen, ein zweites Mal mit 400 µL 70 % Ethanol gewaschen und 10 min bei 13000 rpm und 4 °C zentrifugiert. Nach dem Verwerfen des Überstandes wurde das Pellet für 10 min bei geöffnetem Deckel auf Eis getrocknet, um Ethanolreste entweichen zu lassen. Im Anschluss wurde das Pellet in 90 µL H<sub>2</sub>O resuspendiert.

### 5.11 KONZENTRATIONSBESTIMMUNG DER RNA

Die Konzentrationsbestimmung der RNA erfolgte am Nanodrop ND1000 durch die Absorption von UV-Licht bei einer Wellenlänge von 260 nm ( $A_{260}$ ). Zusätzlich wurden die Absorptionen bei den Wellenlängen von 230 nm ( $A_{230}$ ) und 280 nm ( $A_{280}$ ) bestimmt, um Rückschlüsse auf die Reinheit der Proben zu erhalten. Die Werte für  $A_{260}:A_{230}$  und  $A_{260}:A_{280}$  sollten  $\geq 2$  sein. Kleinere Werte des Verhältnisses von  $A_{260}:A_{230}$  deuten auf eine Verunreinigung mit organischen Verbindungen hin, wohingegen Werte des Verhältnisses von  $A_{260}:A_{280}$  kleiner 2 auf Verunreinigungen mit Proteinen hindeuten (Thermo Fisher Scientific, 2008).

### 5.12 DNASE-VERDAU UND AUFREINIGUNG

Um Verunreinigungen durch DNA aus den Proben zu entfernen, wurde ein DNase-Verdau durchgeführt. Dazu wurden die Proben mit 10  $\mu$ L rDNase-Puffer und 1  $\mu$ L rDNase versetzt. Werden mehrere Proben dem Verdau unterzogen, empfiehlt es sich, einen Mastermix anzufertigen. Die Proben wurden gut durchmischt, kurz anzentrifugiert, für 12 min bei 37 °C inkubiert und anschließend auf Eis gestellt.

Die anschließende Aufreinigung der Proben erfolgte mit dem RNA Clean-up Kit der Firma Macherey Nagel nach den Angaben des Herstellers. Lediglich Schritt Nr. 6 des Aufreinigungsprotokolls wurde wie folgt abgeändert.

Die RNA wurde mit 60  $\mu$ L RNase-freiem Wasser eluiert und 1 min bei 8000 x g zentrifugiert. Das Eluat wurde noch einmal auf die Säule gegeben und für 1 min bei 8000 x g zentrifugiert. Anschließend wurden erneut 60  $\mu$ L RNase freies Wasser auf die Säule gegeben und nach den oben gegebenen Vorgaben zentrifugiert.

### 5.13 AGAROSE-GELELEKTROPHORESE

Die Qualitätskontrolle der RNA-Proben erfolgte in einem 1 % Agarosegel. Eine intakte Präparation sollte im Gel zwei diskrete Banden für die 18 S und 28 S rRNA anzeigen. Dabei sollte das Verhältnis der Fluoreszenzintensitäten der 18 S und 28 S rRNA 2:1 betragen. Wiesen die Banden dieses Verhältnis nicht auf oder waren nur undeutlich zu erkennen, so wurde die RNA während der Präparation teilweise abgebaut (Jansohn und Rothhämel, 2012).

Für die Agarose-Gelelektrophorese wurde ein 1 % Agarosegel hergestellt, in die Gelkammer überführt und mit 1x TBE-Puffer überschichtet. Es wurden 300 ng RNA mit 1x Ladepuffer versetzt, auf 15  $\mu$ L aufgefüllt und in die Taschen des Gels pipettiert. Der Lauf wurde nach Zugabe von 20  $\mu$ L Ethidiumbromid (5 mg/mL) in den unteren

Puffertank bei 150 Volt für 45 min gestartet. Die verwendeten Reagenzien und Puffer waren frei von RNasen.

**1 % Agaroselösung**

0,7 g Agarose  
700 mL 1x TBE  
7 µL Ethidiumbromid (5 mg/mL)

**10x Ladepuffer**

25 % Ficoll-400  
100 mM Tris-HCl (pH 7,4)  
100 mM EDTA

Orange G bis zur gewünschten Färbung

5.14 GENEXPRESSIONSANALYSEN NACH DEM EXPRESS PROFILING-VERFAHREN

Das Gene-eXpress-Profiling ist eine von der Firma Althea Technologies Inc. entwickelte Methode zur Durchführung von Multiplex-Fragment-Expressionsanalysen. In einer modifizierten Endpunkt RT-PCR-Reaktion werden bis zu 35 fluoreszenzmarkierte Fragmente erzeugt, die anschließend kapillarelektrophoretisch aufgetrennt und quantifiziert werden (Schäfer, 2005). Die so erhaltenen Daten dienen der Berechnung der zugrundeliegenden RNA-Mengen. Die generelle Vorgehensweise zur Durchführung einer Genexpressionsanalyse nach dem eXpress-Profiling-Verfahren ist in Abbildung 5.2 dargestellt.

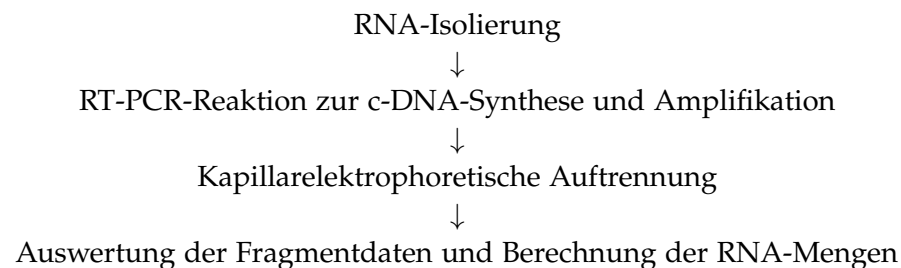


Abbildung 5.2: Übersicht über die eXpress-Profiling-Analysemethode

*Nach der Isolation der RNA folgt eine RT-PCR-Reaktion, in der die RNA der 35 Gene mit genspezifischen Primern in ssDNA umgeschrieben wird. Diese DNA-Fragmente werden anschließend mit fluoreszenzmarkierten Universalprimern amplifiziert, wodurch eine kapillarelektrophoretische Auftrennung und Quantifizierung ermöglicht wird. Mit den daraus erhaltenen Daten ist es möglich, die RNA-Mengen zu berechnen.*

## 5.14.1 Reverse-Transkriptase-Reaktion

Zur Untersuchung der Transkripte in einer Genexpressionsanalyse wurde eine Reverse-Transkriptase-Reaktion durchgeführt, um die RNA in ssDNA umzuschreiben. Dazu wurden die Volumina der in Tabelle 5.22 aufgeführten Komponenten mit der Anzahl der zu analysierenden Proben multipliziert und in einem Mastermix zusammenpipettiert. Das Zusammenstellen des Mastermixes erfolgte im Template-freien Areal, um eine Kontamination mit nicht erwünschten Templates zu vermeiden. Zusätzlich wurden je Lauf eine NT (no template)-Kontrolle und eine RT<sup>-</sup>-Kontrolle mitgeführt, um die Sauberkeit der Proben und Chemikalien zu überprüfen und eventuelle Kontaminationen mit genomischer DNA stichprobenartig auszuschließen. Es wurden je Probe 13 µL Mastermix vorgelegt und im Template-Areal die Proben- und Referenz-RNA zugegeben und gut durchmischt. Als Referenz-RNA diente die 16S rRNA des Organismus *Halobacterium salinarum*<sup>1</sup>. Der Lauf wurde nach kurzem Anzentrifugieren der Proben mit dem in Tab. 5.23 aufgeführten Programm gestartet.

Tabelle 5.22: Reaktionsansatz der RT-Reaktion

Komponente	Volumen in µL	Ausgangskonzentration
Template-freies Areal		
RV-Primer Mix <sup>2</sup>	2	
RT-Puffer <sup>3</sup>	4	
Revert Aid <sup>TM</sup> - Reverse Transkriptase	1	10 U/µL
dNTP-Mix	4	je 5 mM
RNase-Inhibitor	0,1	40 U/µL
Wasser	1,9	
Template-Areal		
Referenz-RNA	2	5 pg/µL
Proben-RNA	5	15 ng/µL

<sup>1</sup> Freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Heike Rummel (Rummel, 2014)

<sup>2</sup> Vergleiche Tabelle 5.25

<sup>3</sup> Vergleiche Tabelle 5.24

Tabelle 5.23: Temperaturprofil der RT-Reaktion

Schritt	Temperatur	Zeit
1	8 °C	1 min
2	37 °C	5 min
3	42 °C	60 min
4	95 °C	5 min
5	4 °C	∞

Tabelle 5.24: Zusammensetzung des 5x RT-Puffers

Komponente	Endkonzentration in mM
Tris-HCL, pH 8,3	250
KCl	250
MgCL <sub>2</sub>	20
DTT	50

Tabelle 5.25: Primer für die RT-PCR-Reaktion

RV-Primer-ID	Konzentration der RV-Primer in µM	FW-Primer-ID	Fragmentgröße in nt
#2481	0,00025	#2480	117
#2483	0,03125	#2482	123
#2485	0,125	#2484	135
#2487	0,0625	#2486	141
#2489	0,00391	#2488	147
#2491	0,0039	#2490	153
#2493	0,03125	#2492	159
#2495	0,0039	#2494	165
#2497	0,5	#2496	171
#2499	0,5	#2498	177
#2501	0,00098	#2500	183
#2503	0,0156	#2502	195
#2505	0,0156	#2504	201
#2507	0,5	#2506	207
#2509	0,05	#2508	219

RV-Primer-ID	Konzentration der RV-Primer in $\mu\text{M}$	FW-Primer-ID	Fragmentgröße in nt
#2511	0,125	#2510	231
#2513	0,125	#2512	237
#2515	0,125	#2514	243
#2517	0,5	#2516	249
#2519	0,5	#2518	255
#2521	0,5	#2520	261
#2523	0,0625	#2522	267
#2525	0,5	#2524	273
#2527	0,03125	#2526	279
#2529	0,0625	#2528	286
#2531	0,5	#2530	292
#2533	0,5	#2532	298
#2535	0,5	#2534	304
#2537	0,125	#2536	310
#2539	0,5	#2538	316
#2541	0,5	#2540	331
#2543	0,5	#2542	337
#2545	0,5	#2544	344
#2547	0,5	#2546	350
#2549	0,5	#2548	357
Referenz-Peak #2429	0,5	#2428	224

#### 5.14.2 Polymerase-Kettenreaktion

Zur Amplifikation der in der RT-Reaktion erzeugten ssDNA-Fragmente wurde im Template-freien Bereich ein Mastermix aus den in Tab. 5.26 aufgeführten Komponenten hergestellt. Die Volumina der Komponenten wurden mit der Anzahl der Proben multipliziert. Der Universalprimer setzt sich, wie in Tab. 5.27 angegeben, zusammen. Es wurden je Probe 10  $\mu\text{L}$  Mastermix vorgelegt und 8  $\mu\text{L}$  der RT-Reaktion zugegeben. Nach gründlichem Mischen und anschließendem Anzentrifugieren wurden die Proben mit einem Tropfen Mineralöl überschichtet und die Reaktion nach dem in Tab. 5.28 aufgeführten Temperaturprogramm gestartet. Die Reaktion wurde als „manuelle Hot-Start“-PCR durchgeführt, d.h., die Taq-Polymerase wurde erst bei einer Blocktemperatur von 95 °C zugegeben.



Tabelle 5.26: Reaktionsansatz für die PCR-Reaktion

Komponente	Volumen in $\mu\text{L}$	Ausgangskonzentration
Template-freies Areal		
FW-Primer-Mix <sup>1</sup>	2	je 0,2 $\mu\text{M}$
Universalprimer-Mix	1,4	je 16,67 $\mu\text{M}$
dNTP-Mix	1,2	je 5 mM
BSA	0,22	1 mg/mL
Ammoniumsulfat	0,4	1,5 M
Tween 20	0,02	10 %
Magnesiumchlorid	0,046	1 M
Glycerin	0,56	90 %
DMSO	0,3	100 %
Betain	2,67	6 M
Tris-HCL (pH 8,0)	0,7	2 M
KCl	0,13	1,5 M
H <sub>2</sub> O	0,354	
Template-Areal		
RT-Ansatz	8	
Taq-Polymerase	2	

Tabelle 5.27: Zusammensetzung des Universalprimer-Mixes

Primer ID	Volumen	Konzentration	Orientierung
#2365	1 V	25 $\mu\text{M}$	Reverse
#2550	0,5 V	50 $\mu\text{M}$	Forward

Tabelle 5.28: Temperaturprofil der PCR-Reaktion

Schritt	Temperatur	Zeit	Zyklus
1	95 °C	5 min	go to 2. 35x
2	94 °C	30 s	
3	55 °C	30 s	
4	70 °C	1 min	
5	4 °C	$\infty$	

<sup>1</sup> Vergleiche Tab. 5.25

## 5.14.3 Erstellen der Standardkurve

Zur Quantifizierung der Transkriptmengen aller 35 Gene wurde eine Standardkurve erstellt. Die RNA der zu analysierenden Proben wurde auf eine Konzentration von 64 ng/ $\mu\text{L}$  eingestellt, gepoolt und folgende Verdünnungsreihe hergestellt:

Tabelle 5.29: Verdünnungsreihe zum Erstellen der Standardkurve

Nr.	V Probe in $\mu\text{L}$	V $\text{H}_2\text{O}$ in $\mu\text{L}$	m(RNA) in 5 $\mu\text{L}$ in ng
1	5 je Probe		320
2	20 Nr. 1	20	160
3	20 Nr. 2	20	80
4	20 Nr. 3	20	40
5	20 Nr. 4	20	20
6	20 Nr. 5	20	10
7	20 Nr. 6	20	5
8	20 Nr. 7	20	2,5
9	20 Nr. 8	20	1,25

Die Synthese und Amplifikation der ssDNA-Fragmente aus diesen Proben erfolgte als Doppelbestimmung, wie in Kap. 5.14.1 und 5.14.2 beschrieben.

## 5.14.4 Fragmentanalyse in der Kapillarelektrophorese

Um die Expressionslevel der 35 Gene quantifizieren zu können, wurden die amplifizierten Proben kapillarelektrophoretisch aufgetrennt. Für gewöhnlich muss die PCR-Reaktion vor der Analyse verdünnt werden. Hierfür hat sich eine 1:20 Verdünnung der Proben mit 38  $\mu\text{L}$  Hi-Di-Formamid und 2  $\mu\text{L}$  PCR-Reaktion als günstig erwiesen. Je Probe wurden 38,5  $\mu\text{L}$  Hi-Di-Formamid mit 0,5  $\mu\text{L}$  DNA-Größenstandard (vgl. Kap. 5.14.6) als Mastermix in einer 96-Well Platte vorgelegt und mit 1  $\mu\text{L}$  der verdünnten PCR-Reaktion gemischt. Die Proben wurden kurz anzentrifugiert und mit einem Tropfen Mineralöl überschichtet. Zuletzt wurden die entsprechenden Reihen der Pufferplatte mit dem Genomelab<sup>TM</sup> Separationspuffer befüllt. Die Auftrennung der Fragmente erfolgte im Ceq8800<sup>TM</sup> der Firma Beckman Coulter unter folgenden Bedingungen:

**Analyseparameter für die Kapillarelektrophorese**

Kapillarentemperatur: 50 °C

Denaturierung bei 90 °C für 120 s

Probeninjektion bei 2,0 kV für 30 s

Separation bei 6,0 kV für 45 min

Für die Analyse der in der Kapillarelektrophorese erzeugten Daten wurde ein Rampenschwellwert von 1 % und eine relative Peak-Höhenschwelle von 0,5 % gewählt. Der Rampenschwellwert dient zur Definition eines Mindestsignalanstieges an der Peak-Vorderflanke, welcher erreicht werden muss, damit ein Peak als solcher erkannt wird. Die relative Peak-Höhenschwelle gibt die Mindesthöhe an, die ein Peak erreichen muss, um in der Fragmentliste oder den Fragmentdaten verzeichnet zu werden (Beckman Coulter Inc., 2003).

#### 5.14.5 Datenauswertung und Quantifizierung der Transkriptmengen

Während der kapillarelektrophoretischen Auftrennung der Proben passieren die DNA-Fragmente einen Detektor am Ende der Kapillare. Über die Anregung mit einem Laser und anschließende Detektion des emittierten Signals können bis zu vier verschiedene Fluorophore gleichzeitig detektiert werden. Die Intensitäten des Fluoreszenzlichtes werden quantitativ als Funktion der Zeit erfasst und in einem Elektropherogramm dargestellt. Die Detektion von Fragmentensignalen wird, wie in Bartz, 2014 beschrieben, von der Gerätesoftware durchgeführt und umfasst folgende Schritte:

- Die Hintergrundfluoreszenz, die je nach Alter der Kapillare und Fluoreszenzfarbstoff schwanken kann, wird abgezogen.
- Unspezifische Ausschläge, welche durch ungebundene Fluorophore oder nicht eingebaute Oligonukleotide hervorgerufen werden, werden eliminiert.
- Abzug der Kreuzfluoreszenz: Die Emissionsspektren der Fluorophore können sich teilweise überlappen. Um bei der Quantifizierung nur das Signal eines Fluorophores zu berücksichtigen, müssen die Signale der anderen Farbstoffe abgezogen werden.
- Detektion der Standardfragmente: Die Fragmente des DNA-Größenstandards sind durch die Verwendung eines anderen Fluoreszenzfarbstoffes von den übrigen Fragmenten unterscheidbar. Die Standardfragmente werden detektiert und den bekannten Fragmentlängen zugeordnet, wobei die Gerätesoftware aus den Laufzeiten und Fragmentlängen eine Eichkurve erstellt und die Umrechnungsparameter durch kubische Regression erstellt.
- Anhand der Umrechnungsparameter werden aus den Laufzeiten aller übrigen Signale die Fragmentlängen errechnet und die relativen Signalflächen als Flächen der Peaks bestimmt. Durch die Einstellung des Rampenschwellwertes und der relativen Peak-Höhenschwelle kann angegeben werden, wie stark ein Signal ansteigen, beziehungsweise wie groß ein Signal sein muss,

um bei der Auswertung berücksichtigt zu werden. Die Signale werden anschließend als Liste ausgegeben.

Um die Daten quantifizieren zu können, wurde für jedes Gen eine Standardkurve angefertigt. Dazu wurden alle Proben in äquimolaren Mengen zu einem Pool vereinigt. Aus diesem Pool wurden neun Verdünnungsstufen von 320 ng RNA bis 1,25 ng RNA hergestellt und gemessen. Die Berechnung der Standardkurven erfolgte, wie in Bartz, 2014 beschrieben, aus den Daten der Fragmentlisten. Diese Auswertung wurde mit einem Pearl-Skript automatisiert und umfasst folgende Schritte:

- Es werden Signale gesucht, deren Fragmentlängen mit den Längen der zu analysierenden Gene und des Standardfragmentes übereinstimmen. Dabei können die Fragmentlängen um  $\pm 0,9$  nt von den spezifischen, artifiziellen Fragmentlängen abweichen. Erfüllen mehrere Signale dieses Kriterium, so wird das Signal mit der größten Signalstärke ausgewählt.
- Die so ermittelten Signale wurden auf die Intensität des Referenzfragmentes (REF) normiert, um eine Vergleichbarkeit von Probe zu Probe zu erreichen. Die absoluten Signalstärken können von Lauf zu Lauf und von Kapillare zu Kapillare variieren.
- Die normierten Peakflächen (NPA) wurden für jedes Fragment doppellogarithmisch über die eingesetzten RNA-Mengen aufgetragen und mittels linearer Regression Anstieg und Schnittpunkt mit der Ordinatenachse berechnet (vgl. Formel 5.1). Die Anstiege der Regressionsgeraden aller Fragmente wurden gemittelt. Mit Hilfe dieses gemittelten Anstiegs konnten die neuen Schnittpunkte der Geraden mit der Ordinatenachse berechnet werden. Diese gemittelte Geradengleichung diente zur Berechnung der RNA-Mengen.

$$\lg(\text{NPA}) = a * \lg(m(\text{RNA})) + b \quad (5.1)$$

- Zur Berechnung der RNA-Mengen wurden die Proben einzeln vermessen und die Fluoreszenzintensitäten der jeweiligen Fragmente auf die Intensität des Standardpeaks normiert. Anhand der so erhaltenen NPA's und den zuvor berechneten Geradengleichungen der Standardkurve konnten die RNA-Mengen über Gleichung 5.2 berechnet werden, wobei Y den Schnittpunkt mit der Ordinatenachse des Fragmentes x, MA den gemittelten Anstieg der Regressionsgeraden und m(RNA) die eingesetzte RNA-Menge für die Reverse-Transkriptase Reaktion darstellt.

$$\text{RN}(\text{RNA}) = \frac{10^{\frac{\lg(\text{NPA}) - Y}{MA}}}{m(\text{RNA})} \quad (5.2)$$

Alle Schritte zur Quantifizierung der RNA-Mengen sind schematisch in Abbildung 5.3 dargestellt.

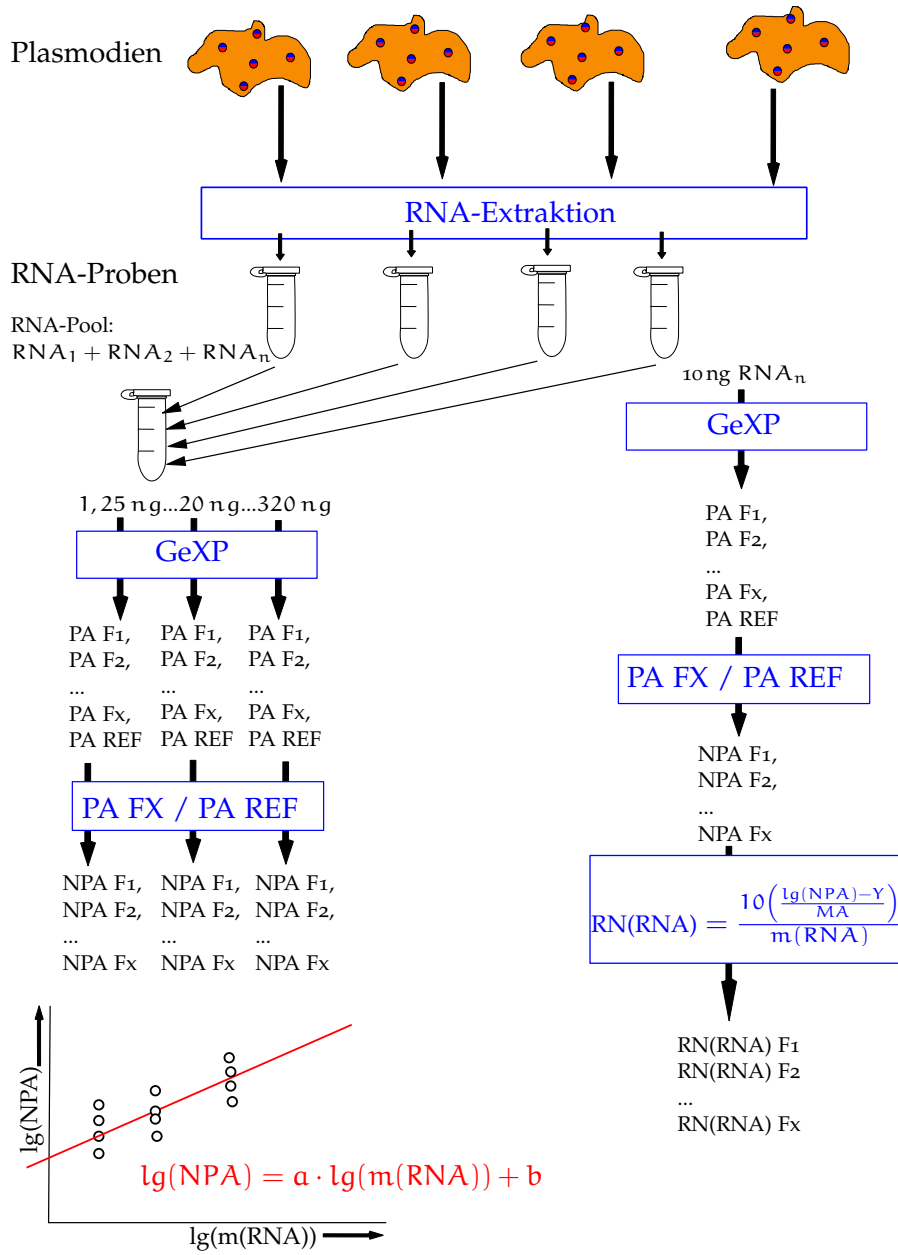


Abbildung 5.3: Datenverarbeitung für eXpress-Profiling-Analysen

### 5.14.6 Herstellung eines DNA-Größenstandards für die Kapillarelektrophorese

Um die Laufzeiten der Fragmente in den Proben in Fragmentlängen umrechnen zu können, wurde jeder Probe in der Kapillarelektrophorese ein DNA-Größenstandard zugesetzt. Dieser Größenstandard enthält Fragmente bekannter Größe und trägt zur Unterscheidung von den Probenfragmenten eine andere Fluoreszenzmarkierung.

Die PCR erfolgte nach dem in Tabelle 5.30 aufgeführten Pipettierschema, allerdings als Doppelansatz. Aus allen Komponenten wurde, multipliziert mit der Anzahl der Standardfragmente und mit Ausnahme der Vorwärtsprimer, ein Mastermix hergestellt. Es wurden 45  $\mu\text{L}$  dieses Mastermixes in je ein Reaktionsgefäß vorgelegt und jeweils mit 5  $\mu\text{L}$  eines, der in Tabelle 5.32 aufgeführten Vorwärtsprimer, vermischt. Die 50  $\mu\text{L}$  Reaktionsansätze wurden anschließend auf je zwei Wells einer 96-Well-Platte aufgeteilt. Die Platte wurde luftdicht verschlossen und kurz anzentrifugiert. Die Reaktion wurde nach dem in Tabelle 5.31 aufgeführten Temperaturprofil gestartet. Die Platte wurde jedoch erst bei einer Blocktemperatur von 96 °C in den Thermocycler gestellt, um die PCR als „Hot-Start“ durchzuführen.

Tabelle 5.30: Pipettierschema für den DNA-Größenstandard

Komponente	Konzentration	Volumen in $\mu\text{L}$
$\lambda$ -DNA	300 ng/ $\mu\text{L}$	0,08
Vorwärtsprimer <sup>1</sup>	2,5 ng/ $\mu\text{L}$	2,5
Rückwärtsprimer (#2262)	25 ng/ $\mu\text{L}$	0,25
dNTP-Mix	je 5 mM	1
PCR-Puffer	10 x	2,5
MgCl <sub>2</sub>	50 mM	1
DTT	100 mM	0,335
BSA	500 $\mu\text{g}/\text{ml}$	0,55
DMSO	1%	1
Taq-Polymerase	5 U/ $\mu\text{L}$	0,25
H <sub>2</sub> O		15,5

#### 10 x Puffer:

650 mM Tris-HCl  
 166 mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>  
 0,1 (v/v) Tween 20  
 pH 8,8

Tabelle 5.31: Temperaturprofil der PCR für den DNA-Größenstandard

Nr.	Temperatur	Zeit	Schrittgröße	Zyklus
1	96 °C	5 min		
2	99 °C	15 s		
3	66 °C	40 s	-0,5 °C	zurück zu 2., 20 Zyklen
4	72 °C	90 s		
5	98 °C	15 s		
6	52 °C	40 s		
7	72 °C	90 s		zurück zu 5., 30 Zyklen
8	72 °C	2 min		
9	15 °C	∞		

Die Fragmente sollten anschließend in äquimolaren Mengen vereinigt werden. Dazu mussten zuerst die Konzentrationen der Fragmente bestimmt werden. Es wurde je Reaktionsansatz 1 µL abgenommen und zu einem Pool vereinigt. Dieser Pool wurde 30 min in einer Mikrodialyse mit MF-Millipore Membranfiltern (0,025 µm) gegen bidestilliertes Wasser entsalzt. Anschließend wurde die Probe in mehreren Verdünnungsstufen (unverdünnt, 1:2, 1:4, 1:8) wie in Kapitel 5.14.4 beschrieben in einer Kapillarelektrophorese aufgetrennt und quantifiziert. Die Proben wurden im Anschluss anhand ihrer Fluoreszenzintensitäten so vereinigt, dass die Fragmente in der Mischung in etwa die selbe Fluoreszenzintensität aufwiesen.

Anschließend wurden die Proben einmal mit 1 V Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol (25:24:1) extrahiert und die Phasen bei 13000 rpm und 4 °C für 1 min getrennt. Die wässrige Phase wurde abgenommen und die DNA nach Zugabe von 1/10 V Natriumacetat (pH 5,2) und 2,2 V Ethanol (100%) präzipitiert. Die DNA wurde bei 13000 rpm und 4 °C für 10 min pelletiert, anschließend getrocknet und in 100 µL H<sub>2</sub>O resuspendiert. Um die Proben zu entsalzen, wurde eine Gelfiltration durchgeführt. Dazu wurde je Probe eine 1 mL Spritze mit Watte verschlossen, mit 1 mL Sephadex G-100 befüllt, in ein 15 mL Röhrchen gestellt und bei 100 g für 2 min zentrifugiert. Zum Äquilibrieren wurde 1 mL H<sub>2</sub>O auf die Säulen gegeben und für 2 min bei 100 g zentrifugiert. Die Säulen wurden in ein neues 15 mL Röhrchen gestellt und mit den Proben beladen. Die Zentrifugation erfolgte wie bereits beschrieben. Das Eluat konnte nun als DNA-Größenstandard verwendet werden. Falls notwendig, konnte das Eluat mit Hi-Di-Formamid geeignet verdünnt werden.

<sup>1</sup> vgl. Tabelle 5.32

Tabelle 5.32: Vorwärtsprimer für den DNA-Größenstandard

FW-Primer-ID	Fragmentgröße in nt
#2453	69
#2454	92
#2455	107
#2456	124
#2457	135
#2458	149
#2451	165
#2459	185
#2460	206
#2461	219
#2462	232
#2463	249
#2464	272
#2465	280
#2466	291
#2467	305
#2468	324
#2469	345
#2470	365
#2471	383
#2472	402
#2473	422



## 5.15 STATISTISCHE AUSWERTUNG

## 5.15.1 Mann-Whitney-U-Test

Um zu überprüfen, ob sich die Expressionslevel der analysierten Gene aus zwei Gruppen A und B signifikant unterscheiden, wurde ein Mann-Whitney-U-Test durchgeführt. Der Mann-Whitney-U-Test oder auch Wilcoxon-Rangsummentest ist ein nicht-parametrischer Signifikanztest, der unter folgenden Bedingungen angewandt werden kann:

- Die Stichproben sind voneinander unabhängig
- Die zu vergleichenden Stichproben sollten stetige Verteilungsfunktionen aufweisen

Für den zweiseitigen Test wird die Nullhypothese  $H_0$ : "die Stichproben der zwei Gruppen unterscheiden sich im Mittel nicht voneinander", gegen die Alternativhypothese  $H_1$ : "die Stichproben der zwei Gruppen stammen nicht aus derselben Grundgesamtheit", geprüft.

Zur Ermittlung der Rangsummen  $R_1$  und  $R_2$  der zwei Gruppen werden die Werte beider Stichproben mit der Stichprobenanzahl  $n_1$  und  $n_2$  in aufsteigender Reihenfolge geordnet und mit einer Rangnummer versehen. Die Rangsummen lassen sich nun durch Addition der Rangzahlen jeder Gruppe ermitteln (Lorenz, 1992).

Die Prüfgröße  $U$  wird anschließend wie folgt berechnet:

$$U_1 = n_1 * n_2 + \frac{n_1(n_1 + 1)}{2} - R_1 \quad (5.3)$$

$$U_2 = n_1 * n_2 + \frac{n_2(n_2 + 1)}{2} - R_2 \quad (5.4)$$

$$U = \min(U_1, U_2) \quad (5.5)$$

$$U \leq U_{\text{krit}}(n_1, n_2, \alpha) \quad (5.6)$$

Für einen zweiseitigen Test kann die Nullhypothese bei einem Signifikanzniveau  $\alpha$  von 5 % verworfen werden, wenn die Prüfgröße einen Wert kleiner oder gleich der kritischen Prüfgröße  $U_{\text{krit}}$  einnimmt.

Der U-Test wurde in Matlab<sup>®</sup> unter Zuhilfenahme der Funktion *ranksum* mit einem Signifikanzniveau von  $\alpha = 5\%$  in dem Skript *U\_Test\_Diss.m* implementiert und ist dieser Arbeit als DVD beigelegt.

5.15.2 *Wilcoxon-Vorzeichen-Rangtest*

Der Wilcoxon-Vorzeichen-Rangtest ist ein parameterfreier Signifikanztest, mit dem überprüft werden kann, ob sich die Mediane zweier verbundener Stichproben  $X$  und  $Y$  signifikant unterscheiden. Dabei sollten die Grundgesamtheiten der Stichproben eine stetige Verteilung von gleicher Form aufweisen, verbunden und mindestens intervallskaliert sein (Köhler, Schachtel und Voleske, 2012).

Zur Analyse auf signifikante Unterschiede zwischen den Stichproben  $X$  und  $Y$  werden zuerst die Messwertdifferenzen  $d_i$  mit

$$d_i = x_i - y_i \quad (5.7)$$

berechnet. Alle Differenzen mit  $d_i = 0$  bleiben im Weiteren unberücksichtigt, wobei nur noch  $n$  Differenzen mit  $d_i \neq 0$  betrachtet werden. Diese Werte werden beginnend mit der kleinsten Differenz entsprechend ihrer Absolutbeträge  $|d_i|$  in eine Rangfolge mit den Rängen  $r(|d_i|)$  gebracht. Nun werden die Summen  $W^+$  über die Rangzahlen  $r(|d_i|)$  aller positiven ( $d_i > 0$ ) und  $W^-$  über die Summe der Rangzahlen  $r(|d_i|)$  aller negativen Messwertdifferenzen ( $d_i < 0$ ) ermittelt. Der kleinere der beiden Werte  $W^+$  und  $W^-$  wird als  $W_{Vers}$  verwendet, um den Wert  $W_{Tab}$  mit der Anzahl der Differenzen  $n$  und dem selbst gewählten Signifikanzniveau  $\alpha$  aus den entsprechenden Tabellen abzulesen. Die Werte  $W_{Vers}$  und  $W_{Tab}$  werden verglichen. Wenn:

- $W_{Vers} \geq W_{Tab} \Rightarrow$  die Nullhypothese  $H_0$ , die Mediane der Grundgesamtheiten unterscheiden sich nicht, wird angenommen
- $W_{Vers} < W_{Tab} \Rightarrow$  die Nullhypothese  $H_0$  wird verworfen. Es gilt die Alternativhypothese  $H_1$ , die Mediane der Grundgesamtheiten sind verschieden (Köhler, Schachtel und Voleske, 2012).

Der Wilcoxon-Vorzeichen-Rangtest wurde in Matlab<sup>®</sup> unter Zuhilfenahme der Funktion *signrank* mit einem Signifikanzniveau von  $\alpha = 5\%$  in dem Skript *U\_Test\_Diss.m* implementiert und ist dieser Arbeit als DVD beigelegt.

5.15.3 *Hauptkomponentenanalyse (Hubert und Engelen, 2004)*

Die Hauptkomponentenanalyse (Principle Component Analysis oder auch PCA) ist ein Verfahren zur Reduktion der Dimensionalität großer Datensätze, wie sie zum Beispiel häufig in der Analyse von Microarraydaten auftreten.

Aus den Originaldaten  $X_j$  wird eine Menge an nicht korrelierten, orthogonalen Variablen  $P_j$  erstellt, welche Linearkombinationen der um

den Mittelwert zentrierten Variablen  $\tilde{X}_j = X_j - \bar{X}_j$  sind. Diese Variablen werden Loadings oder Hauptkomponenten genannt und korrelieren mit der Kovarianzmatrix  $S$  der Daten mit:

$$S = \frac{1}{n-1} \sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})(x_i - \bar{x})' \quad (5.8)$$

Für jede Hauptkomponente existiert ein zugehöriger Eigenwert, welcher angibt, welchen Anteil die entsprechende Hauptkomponente zur Variabilität der Daten beiträgt.

Der Anteil, den jede Hauptkomponente  $P_j$  zur Variabilität der Daten beiträgt, wird durch ihren zugehörigen Eigenwert  $\tilde{\lambda}_j$ , durch folgende Bedingung angegeben:  $\tilde{\lambda}_j = \text{Var}(\tilde{P}_j)$ . Anschließend werden die Hauptkomponenten nach absteigender Reihenfolge ihrer Eigenwerte sortiert, wobei die ersten Hauptkomponenten  $k$  den Großteil der Varianz in den Daten erklären. Die Datenpunkte werden nun in einen Unterraum projiziert, welcher von den  $k$  Hauptkomponenten aufgespannt wird. Dabei ist es nun möglich, die Koordinaten der Datenpunkte in Abhängigkeit der Hauptkomponenten zu berechnen, woraus sich die so genannten Scores für  $i = 1, \dots, n$  ergeben:

$$\tilde{t}_i = \tilde{P}'(x_i - \bar{x}) \quad (5.9)$$

In Bezug auf das Original-Koordinatensystem wird der projizierte Datenpunkt als angepasster Wert berechnet (Hubert und Engelen, 2004).

$$\hat{x}_i = \bar{x} + \tilde{P}\tilde{t}_i \quad (5.10)$$

Die Hauptkomponentenanalyse wurde in Matlab<sup>®</sup> unter Zuhilfenahme der Funktion *pca* in dem Skript *PCA\_Diss.m* implementiert und ist dieser Arbeit als DVD beigelegt.

## 5.16 CLUSTERANALYSE

Die Analyse der Genexpressionsdaten erfolgte mit dem in Kapitel 2.4 beschriebenen Clusteralgorithmus. Die Implementierung dieses Algorithmus erfolgte in Matlab<sup>®</sup>. Zur Analyse der Daten auf spezifische Cluster muss vorerst der gesamte Datensatz als Workspace in das Programm eingelesen werden. Bevor die Analyse starten kann, müssen die Daten vorverarbeitet werden. Mithilfe des Skriptes *Sortierung\_Gene.m* werden die analysierten Gene nun entsprechend ihrer differentiellen Regulation von herunterreguliert zu hochreguliert geordnet, was die grafische Aufarbeitung stark vereinfacht und die Übersichtlichkeit der resultierenden Plots erhöht. Die in Kapitel 2.3.3 beschriebene Normierung der Daten erfolgt anschließend mit dem Skript *DataPreprocessing.m*. Dort werden die Daten entsprechend der

durchgeführten Teilversuche in einzelne Datasets zerlegt, wodurch die weiterführende Analyse übersichtlicher gestaltet wird. Diese Zerlegung muss vom Nutzer manuell durchgeführt und auf den jeweiligen Versuchsaufbau angepasst werden. Innerhalb dieses Skriptes wird ebenfalls die Berechnung der Genexpressionsverhältnisse zwischen den beiden Analysezeitpunkten durchgeführt, die geclustert werden sollen.

Die eigentliche Clusteranalyse wird anschließend mit dem Skript *Clustering.m* durchgeführt. Dort müssen vom Nutzer lediglich die gewünschten Schwellwerte für SIM (similarity), GEL (gene expression level), MNP (minimal number of plasmodia) und MNG (minimal number of genes) und die Datensätze für die Analyse vorgegeben werden. Der Algorithmus wurde so programmiert, dass jeweils zwei Datensätze mit Genexpressionsverhältnissen gleichzeitig analysiert werden. So lassen sich zum Beispiel die Genexpressionsverhältnisse zwischen dem Zeitschritt Dunkelkontrolle – 4 h nach Belichtung und dem Zeitschritt 4 h nach Belichtung – 8 h nach Belichtung in den grafischen Auftragsungen vergleichen und Änderungen in den Genexpressionsclustern besser veranschaulichen. Das Einlesen der zuvor sortierten und normierten Datensätze erfolgt automatisch. Nach Abschluss der Analyse werden die berechneten Clustertabellen im Command Window und als Variable *ClusterTable\_save* ausgegeben.

Zur Erstellung der Kreisplots wurde die Datei *Kreisplots.m* verwendet. Der Aufruf dieser Datei erfolgt im Command Window mit folgendem Befehl: `Kreisplots({1}, {[1-3]}, 5, Cluster, data, Dataset, gene_marwan)`. Als Option wird innerhalb dieses Befehles an erster Stelle der Datensatz ausgewählt, für den die Kreisplots erstellt werden sollen. Anschließend erfolgt die Angabe der Plasmodien, für die die Cluster geplottet werden sollen. An dritter Stelle wird die x-fache Änderung der Genexpressionslevel, ab der eine Änderung als signifikant gelten soll, angegeben. Für dieses Beispiel sollen also die Kreisplots für Datensatz 1, die Plasmodien 1-3 mit einer minimalen Änderung der Genexpressionsverhältnisse von 5 ausgegeben werden. Die berechneten Clustertabellen und Plots können anschließend aus Matlab® zur weiteren Anwendung exportiert werden.

Alle hier genannten Dateien, die zur Analyse von Genexpressionsclustern verwendet wurden, sind dieser Arbeit als DVD beigelegt.

### 5.17 PETRI-NETZE

Petri-Netze stellen eine formale Modellersprache mit strikt definierter mathematischer Syntax dar, mit deren Hilfe eine Vielzahl verteilter Systeme verschiedenster Anwendungsfelder beschrieben

werden können (Blätke, 2017). So eignen sich Petri-Netze sowohl zur Modellierung von technischen, als auch von biologischen Systemen. Durch die graphische Darstellungsweise lassen sich besonders biologische Sachverhalte relativ einfach und intuitiv darstellen und das Systemverhalten des entstandenen Modells analysieren (Heiner, Gilbert und Donaldson, 2008).

Alle im Folgenden beschriebenen Grundlagen zu Petri-Netzen sind entnommen aus Blätke, Heiner und Marwan, 2011.

Petri-Netze werden durch einen eindeutigen, direkten und bipartiten Graphen repräsentiert. Sie setzen sich aus vier verschiedenen Grundbausteinen zusammen: den Plätzen, Transitionen, Kanten und Marken (vgl. Abbildung 5.4).

### *Plätze*

Plätze sind passive Knoten, werden als Kreise dargestellt und sind die einzigen Elemente, die Marken enthalten können. Sie repräsentieren spezifische Bedingungen oder Zustände des Petri-Netzes, wie Enzyme oder Gene. Es existieren bestimmte Sonderformen von Plätzen, wie zum Beispiel die logischen Plätze. Logische Plätze dienen als Verbindung, um verstreute gleiche Komponenten innerhalb des Petri-Netzes zu vereinen. Sie werden grau hinterlegt dargestellt.

### *Marken*

Marken werden innerhalb des Petri-Netzes als Punkte oder Zahl dargestellt und markieren den Wert einer Bedingung. Die sind die einzigen Elemente, deren Anzahl veränderlich ist. Marken können zum Beispiel die Anzahl von Molekülen oder Konzentrationen darstellen.

### *Transitionen*

Transitionen hingegen sind aktive Knoten, mit deren Hilfe bestimmte Aktionen modelliert werden können. Sie werden als Rechtecke dargestellt und vernichten oder erzeugen Marken auf Plätzen. Durch die Aktivierung einer Transition (auch Schalten oder Feuern) verändert sich die Anzahl der Marken auf den Plätzen, die mit der Transition durch eine Kante verbunden sind. Führt eine Kante von einem Platz  $P_1$  zu einer Transition  $T_1$ , so ist  $P_1$  der Vorplatz zu  $T_1$ . Wird hingegen die Transition  $T_1$  über eine Kante mit dem Platz  $P_2$  verbunden, so ist  $P_2$  der Nachplatz von  $T_1$  (vgl. Abbildung 5.4, (b)). Die Marken werden durch die Transition  $T_1$  von  $P_1$  entfernt und in  $P_2$  neu erzeugt. Eine Transition kann nur dann aktiviert werden, wenn alle modellierten Vorbedingungen erfüllt sind. Besitzt eine Transition keine Vorplätze bzw. keine Vorbedingungen, so kann sie zu jeder Zeit

schalten. Transitionen repräsentieren in Petri-Netzen chemische oder biologische Reaktionen wie zum Beispiel Phosphorylierungen oder die Transkription von Genen.

Auch für Transitionen existieren bestimmte Sonderformen, wie zum Beispiel logische Transitionen. Diese dienen ebenfalls der Vernetzung wiederkehrender, gleicher Vorgänge im Netz und werden wie auch die logischen Plätze grau hinterlegt dargestellt.

### *Kanten*

Kanten stellen ebenfalls passive Elemente eines Petri-Netzes dar. Sie werden als Pfeile symbolisiert, stellen den kausalen Zusammenhang zwischen Plätzen und Transitionen dar und zeigen, wie sich Zustände bei einer bestimmten Aktivität ändern. Kanten können nur zwischen Elementen unterschiedlichen Typs existieren, d.h. zwischen Plätzen und Transitionen. Die Verbindung von zwei Plätzen oder zwei Transitionen mit einer Kante ist nicht möglich. Jeder Kante wird ein Kantengewicht zugeordnet, welches standardmäßig bei 1 liegt. Dieses gibt die Stöchiometrie der biochemischen Reaktion an und beschreibt somit, wieviele Komponenten an einer Reaktion beteiligt sind. Eine Transition benötigt oder erzeugt so viele Marken auf einem Platz, wie durch das Kantengewicht angegeben wird.

Auch für Kanten existieren unterschiedliche Typen, wie zum Beispiel Doppelkanten, Inhibitor-Kanten oder Lesekanten. Durch die Verwendung von Doppelkanten wird die Marke auf einem Platz bei Aktivierung der zugehörigen Transition gleichzeitig verbraucht und neu generiert. Wird ein Platz mit zwei Transitionen über Doppelkanten verbunden, so kann nur eine Transition je Zeitpunkt schalten. Anders verhält es sich bei der Verwendung von Lesekanten. Hier können beide Transitionen auch gleichzeitig aktiviert werden. Inhibitor-Kanten sind von Plätzen hin zu Transitionen gerichtet und verhindern die Aktivierung der entsprechenden Transition (vgl. Abbildung 5.4) (f).

Anhand dieser Elemente können nun verschiedenste biologische Sachverhalte als Petri-Netz dargestellt und modelliert werden. Dazu existiert eine Auswahl unterschiedlicher Petri-Netz-Typen, wie zum Beispiel das qualitative Petri-Netz (QPN), das stochastische Petri-Netz (SPN), das kontinuierliche (CPN) und das hybride Petri-Netz (HPN).

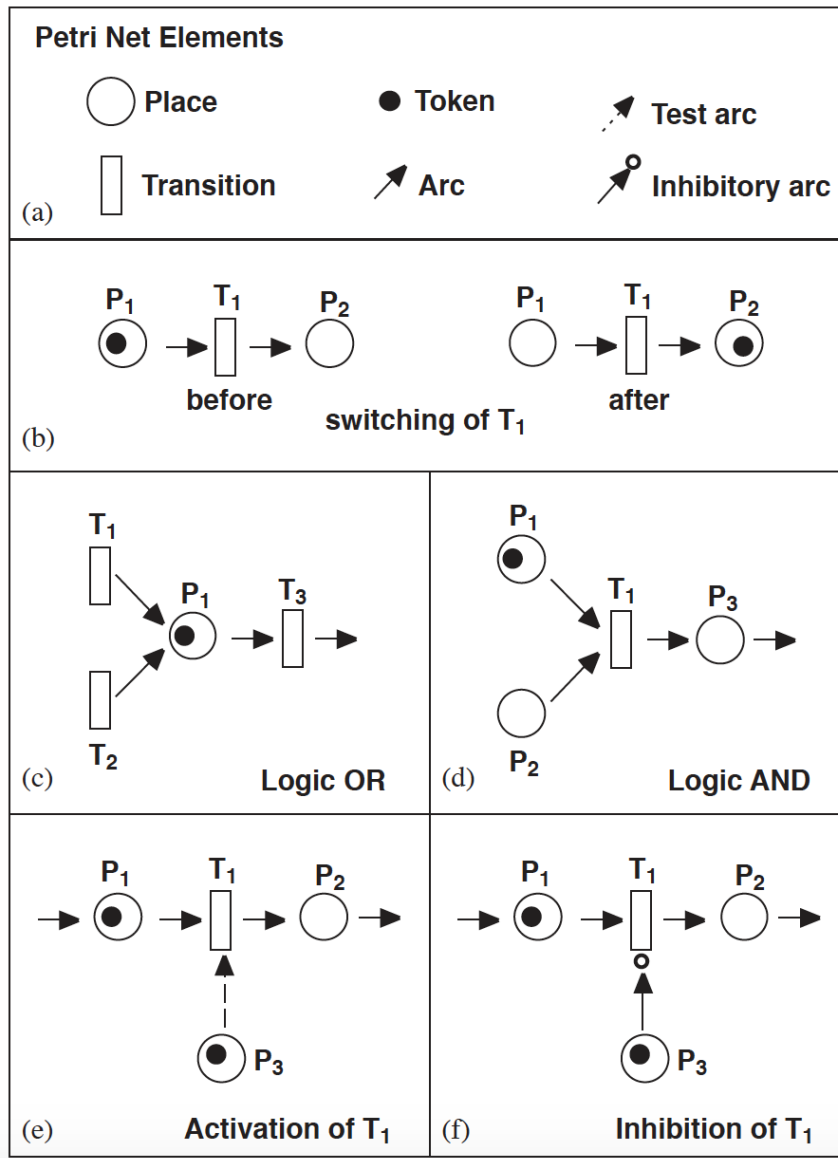


Abbildung 5.4: Petri-Netz-Formalismus aus Marwan, Sujatha und Starostzik, 2005

a) Einfache Petri-Netze werden aus vier unterschiedlichen Elementen aufgebaut: Plätze, Transitionen, Marken und Kanten. Komplexere Petri-Netze können auch Elemente wie Inhibitor- oder Test-Kanten beinhalten. b) Ein Petri-Netz mit zwei Plätzen. Enthält der Platz  $P_1$  eine Marke, so kann die Transition  $T_1$  feuern und die Marke bewegt sich zu  $P_2$ . c) Logisches ODER: die Transition  $T_3$  kann feuern, wenn  $P_1$  eine Marke enthält. Dabei ist es irrelevant, ob die Marke über  $T_1$  oder  $T_2$  weitergeleitet wurde. d) Logisches UND: Die Transition  $T_1$  kann nur feuern, wenn  $P_1$  und  $P_2$  je eine Marke enthalten. Jedes Feuern von  $T_1$  entfernt eine Marke von  $P_1$  und  $P_2$  und überträgt sie auf  $P_3$ . e) Aktivierung von  $T_1$ :  $T_1$  kann nur feuern, wenn  $P_1$  und  $P_3$  je eine Marke enthalten. Die Marke von  $P_1$  wird auf  $P_2$  übertragen. Die Marke von  $P_3$  wird jedoch nicht verbraucht, da  $P_3$  und  $T_1$  über eine Test-Kante verbunden sind. f) Kontrolle von  $T_1$  durch Inhibition von  $P_3$ .  $T_1$  kann die Marke von  $P_1$  nur zu  $P_2$  bewegen, wenn  $P_3$  keine Marke enthält. Wenn  $P_1$  mit einer Marke belegt ist, wird die Transition  $T_1$  geblockt.





Teil III

APPENDIX



# A

---

ANHANG

---

Tabelle A.1: Analysierte Gene Teil A nach Hoffmann u. a., 2012

Gen Nr.	Name	Similarity	Fragmentlänge in bp	Swissprot entry	E-value	% Query Coverage
1	<i>ribA</i>	60S ribosomal protein L38	117	Q1HRT4	2.00E-017	40.00
2	<i>nhpA</i>	Nonhistone chromosomal protein 6	123	Q4PBZ9	5.00E-017	30.00
3	<i>pksA</i>	Serine/threonine protein kinase phg2	135	Q54QQ1	9.00E-35	89.00
4	<i>ligA</i>	Checkpoint protein hus1 homologue 1 (LigA)	141	Q54NCO	1.00E-028	94.00
5	<i>ralA</i>	Circularly permuted Ras protein 1	147	Q75J93.1	4.00E-017	58.00
6	<i>damA</i>	DNA damage-binding protein 1a	153	Q9MoV3	8.00E-100	87.00
7	<i>ehdA</i>	EH domain-containing protein 1	159	Q641Z6	6.00E-025	94.00
8	<i>pumA</i>	Pumilio homologue 2	165	Q80U58	2.00E-046	80.00
9	<i>pakA</i>	Serine/threonine protein kinase pakC	171	Q55GV3	3.00E-048	79.00
10	<i>cdcA</i>	Cell division control protein 31	177	P06704	6.00E-027	38.00
11	<i>ardA</i>	Actin, plasmodial isoform	183	P02576	9.00E-109	69.00
12	<i>hstA</i>	Probable histone H2B 4	195	Q27876	1.00E-041	43.00
13	<i>psgA</i>	<i>Pltyсарum</i> specific gene	201			
14	<i>pptB</i>	Protein phosphatase 2C POL	207	Q8RWN7	0.016	14.00
15	<i>tspA</i>	Tumor suppressor p53-binding protein 1	219	P70399	2.00E-004	16.00

Tabelle A.2: Analyisierte Gene Teil B nach Hoffmann u. a., 2012

Gen Nr.	Name	Similarity	Fragmentlänge in bp	Swissprot entry	E-value	% Query coverage
16	<i>dspA</i>	Dual specificity protein phosphatase 12	231	Q9JIM4	1.00E-012	41.00
17	<i>pikB</i>	Phosphatidylinositol 3-kinase 2	237	F54674	3.00E-063	68.00
18	<i>uchA</i>	Programmed cell death protein 2	243	Q2YDC9	1.00E-006	32.00
19	<i>gapA</i>	Probable GTPase-activating protein 8	249	Q8HI00	3.00E-023	52.00
20	<i>meiB</i>	Meiosis protein meiz	255	Q64M78.1	9.00E-064	27.00
21	<i>pcnA</i>	Proliferating cell nuclear antigen	261	Q43124	9.00E-076	81.00
22	<i>ribB</i>	60S ribosomal protein L4-2	267	Q54Z69	4.00E-036	66.00
23	<i>arpA</i>	Probable basic-leucine zipper transcription factor G	273	Q54RZ9	2.00E-012	29.00
24	<i>rasA</i>	Ras-related protein RABD2a	279	P28188	3.00E-029	49.00
25	<i>pldA</i>	Phosphatidylinositol-glycan-specific phospholipase D	286	Q8R2H5	4.00E-062	91.00
26	<i>anxA</i>	Annexin-B12	292	P26256	6.00E-041	98.00
27	<i>pptA</i>	Phosphatase DCR2	298	Q05924	6.00E-019	59.00
28	<i>piwiA</i>	Piwi-like protein 1	304	Q96J94	2.00E-055	92.00
29	<i>cudA</i>	Putative transcriptional regulator cudA	310	O00841	1.00E-023	38.00
30	<i>pldC</i>	Phospholipase D	316	Q9LRZ5	4.00E-014	61.00

Tabelle A.3: Analysierte Gene Teil C nach Hoffmann u. a., 2012

Gen Nr.	Name	Similarity	Fragmentlänge in bp	Swissprot entry	E-value	% Query coverage
31	<i>pikC</i>	Phosphatidylinositol 4-kinase beta	331	Q49GP3	8.00E-050	94.00
32	<i>pldB</i>	Phosphatidylinositol-glycan-specific phospholipase D	337	P80108	1.00E-080	83.00
33	<i>spiA</i>	Protein spire	344	Q9U1K1	1.00E-004	31.00
34	<i>hcpA</i>	Histone chaperone ASF1A	350	Q2KIG1	5.00E-062	82.00
35	<i>rgsA</i>	Regulator of G-protein signalling 2	357	O08849	3.00E-005	31.00

Verläufe in der PCA für N26B5, induziert

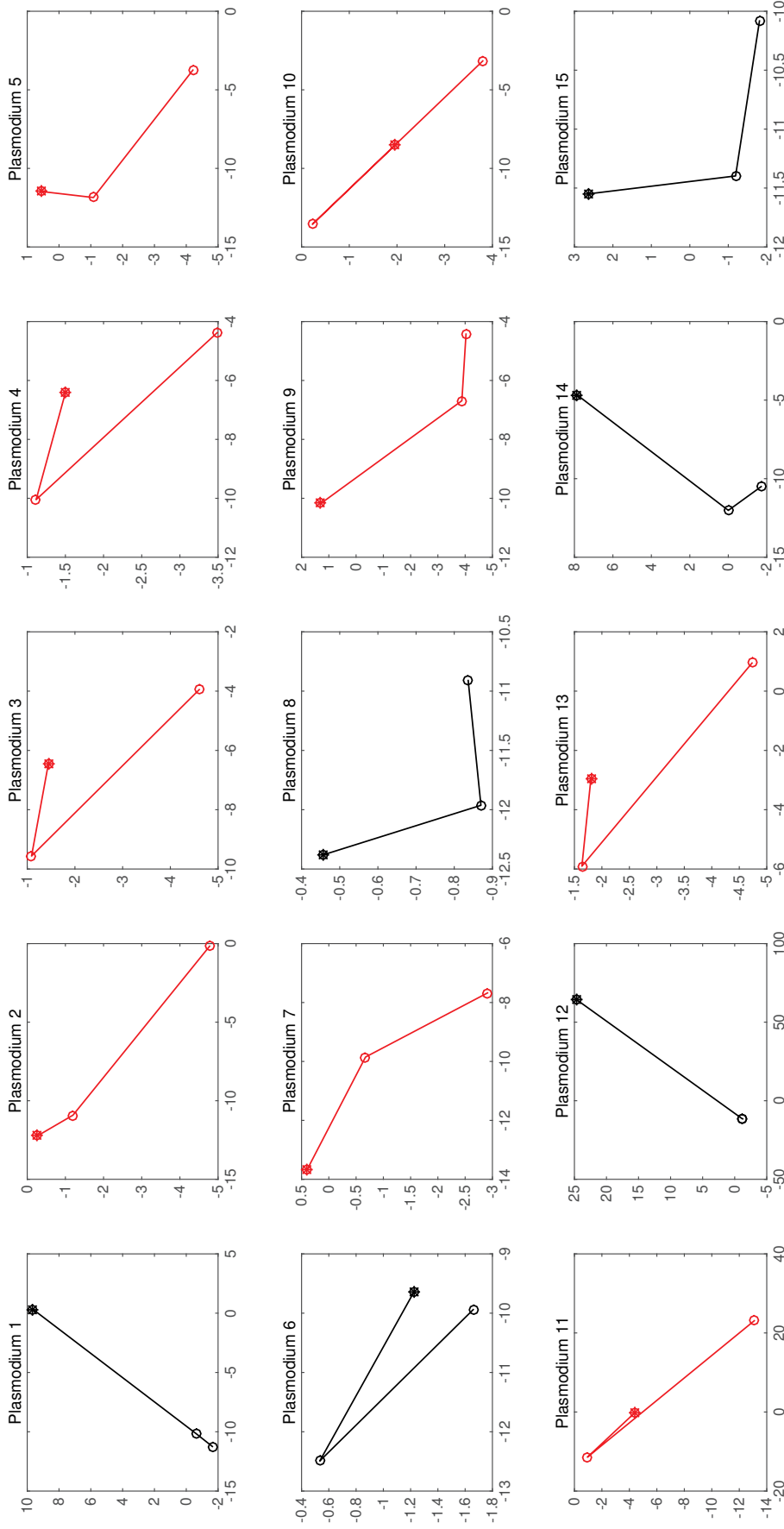


Abbildung A.1: Trajektorien der Plasmodien für N26B5, induziert, im PCA-Plot

Dargestellt sind die individuellen Trajektorien der Plasmodien für Stamm N26B5 (induziert) im PCA-Plot über alle analysierten Zeitpunkte (0 h, 4 h, 8 h). Der Startpunkt zu 0 h ist mit einem Stern (\*) markiert. Sporulierte Plasmodien sind in rot, nichtsporulierte Plasmodien in schwarz dargestellt.

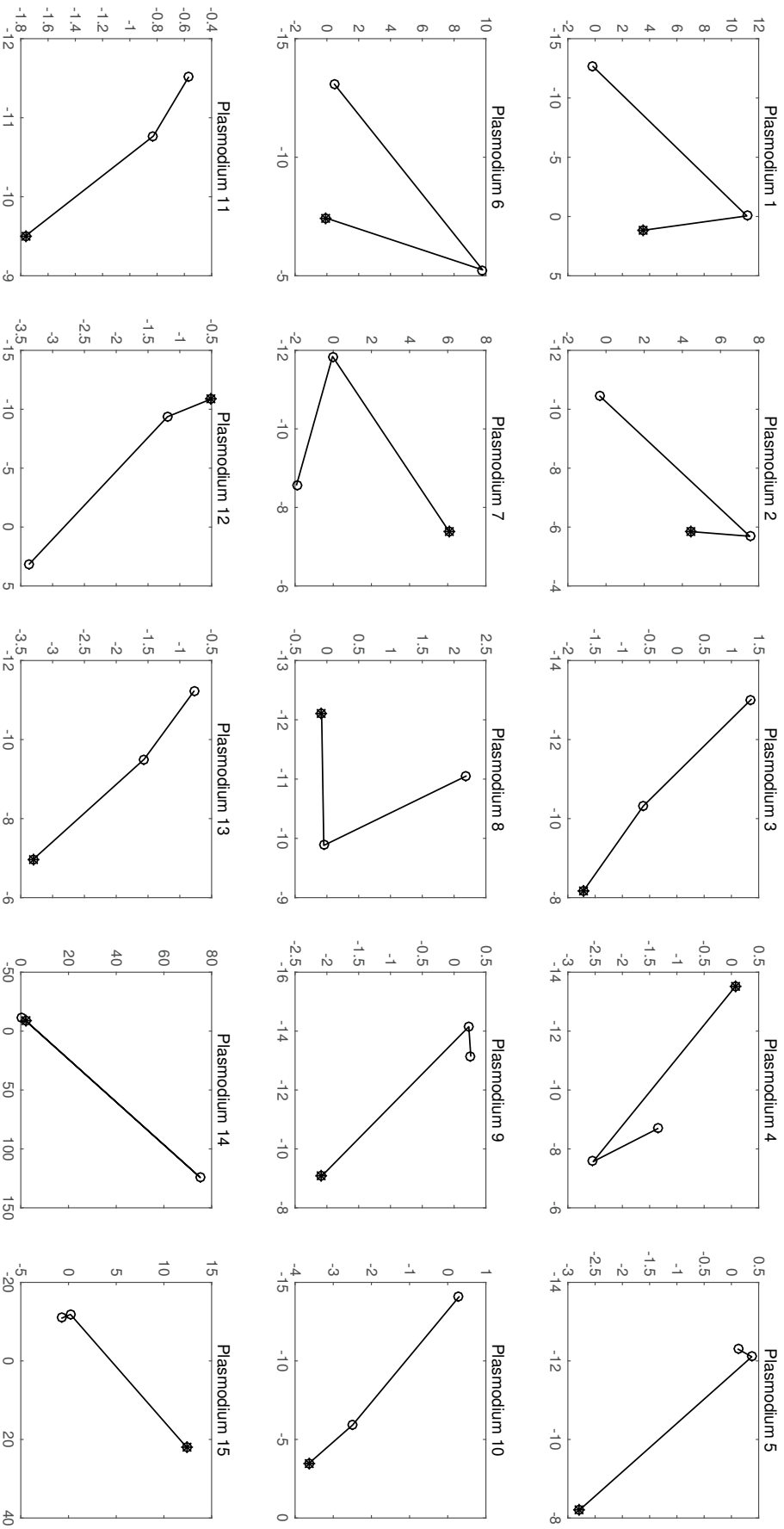


Abbildung A.2: Trajektorien der Plasmodien für N11D4, uninduziert, im PCA-Plot

Dargestellt sind die individuellen Trajektorien der Plasmodien für Stamm N11D4 (uninduziert) im PCA-Plot über alle analysierten Zeitpunkte (0 h, 4 h, 8 h). Der Startpunkt zu 0 h ist mit einem Stern (\*) markiert. Keines der Plasmodien sporulierte.



Verläufe in der PCA für N11D4, induziert

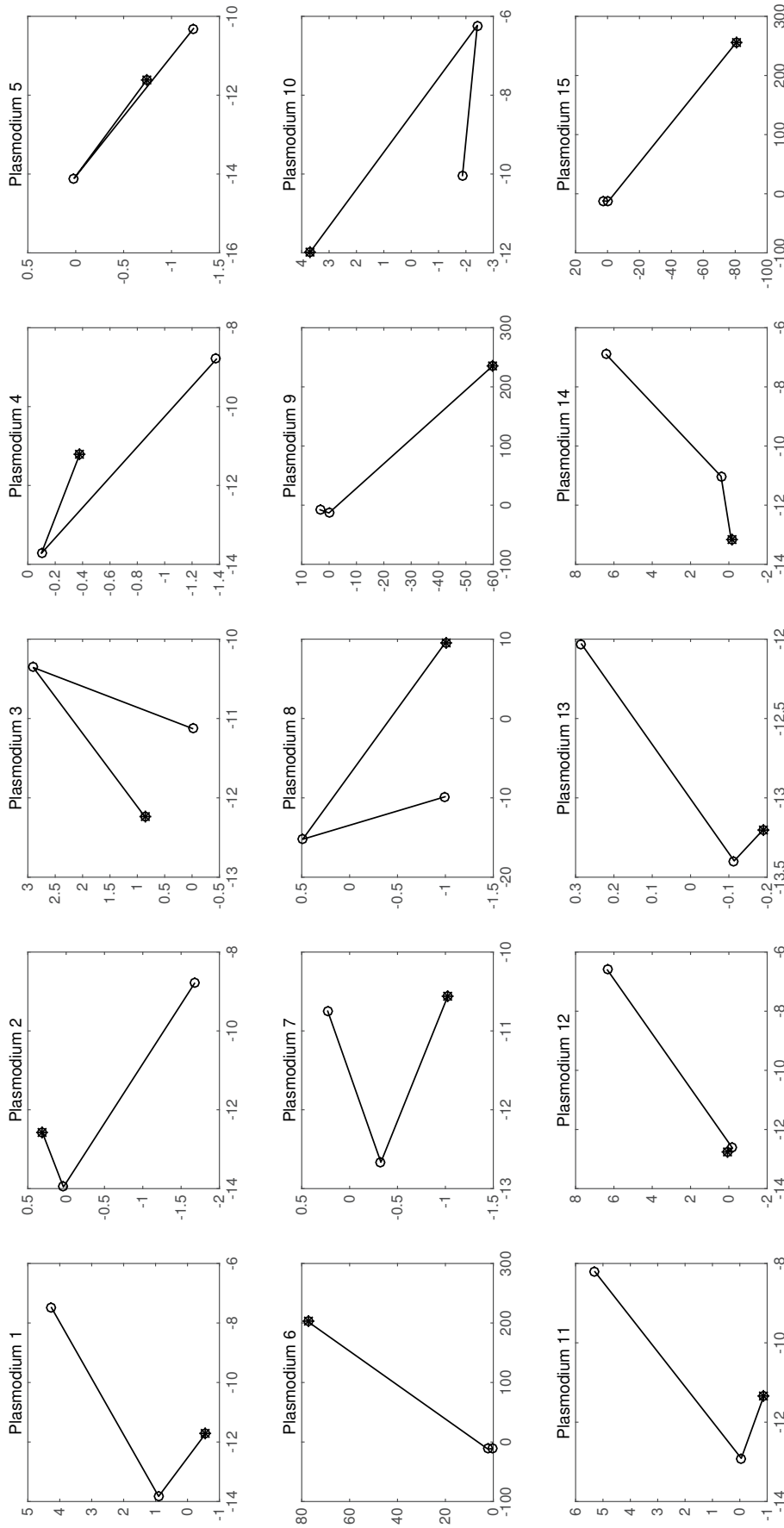


Abbildung A.3: Trajektorien der Plasmodien für N11D4, induziert, im PCA-Plot

Dargestellt sind die individuellen Trajektorien der Plasmodien für Stamm N11D4 (induziert) im PCA-Plot über alle analysierten Zeitpunkte (o h, 4 h, 8 h). Der Startpunkt zu 0 h ist mit einem Stern (\*) markiert. Keines der Plasmodien sporulierte.

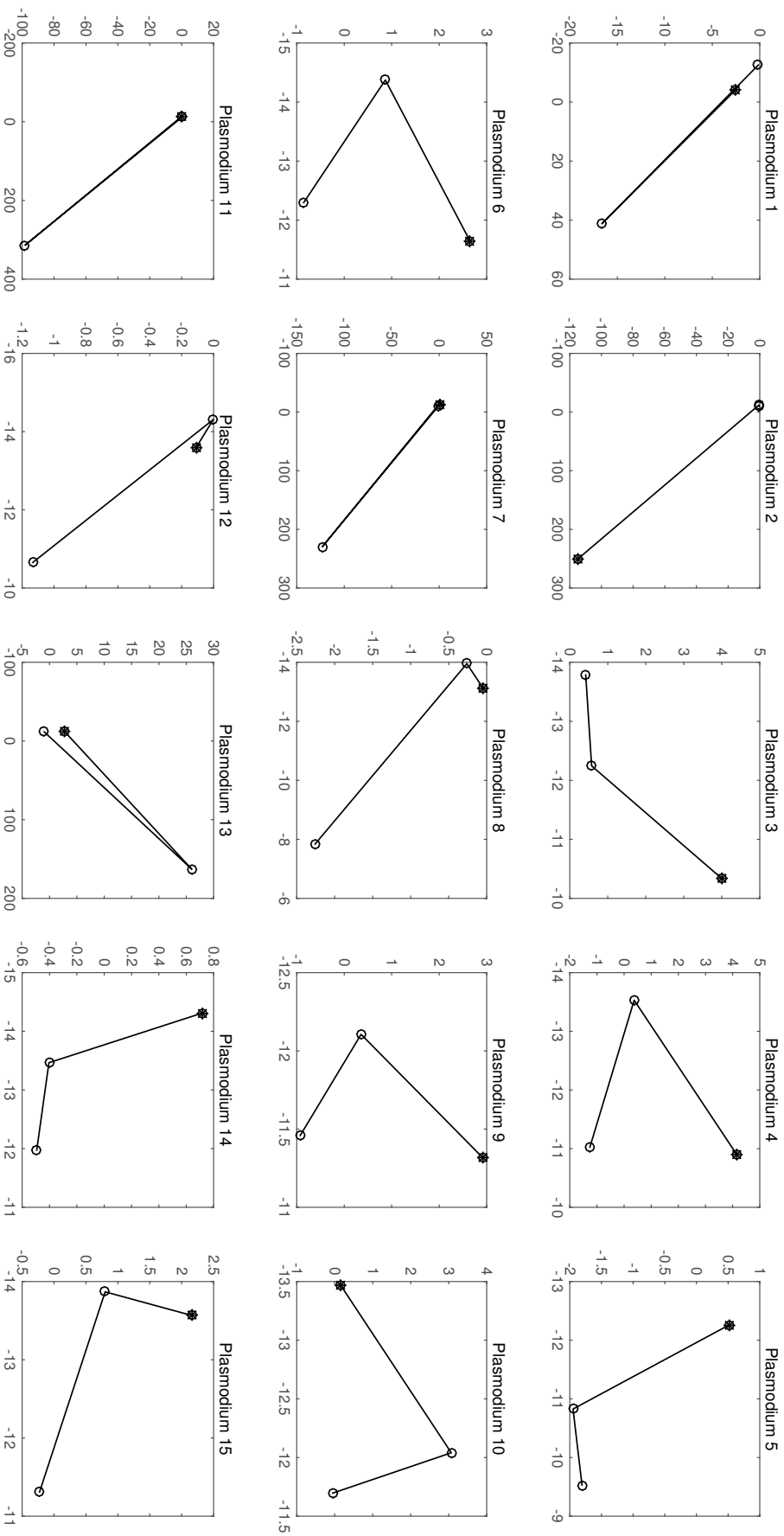


Abbildung A.4: Trajektorien der Plasmodien für N26B5, uninduziert, im PCA-Plot

Dargestellt sind die individuellen Trajektorien der Plasmodien für Stamm N26B5 (uninduziert) im PCA-Plot über alle analysierten Zeitpunkte (0 h, 4 h, 8 h). Der Startpunkt zu 0 h ist mit einem Stern (\*) markiert. Keines der Plasmodien sporulierte.

---

## LITERATUR

---

- Aldrich, H. C. und J. W. Daniel (1982). *Cell Biology of Physarum and Didymium*. New York: Academic Press (New York).
- Anderson, R. W., G. Hutchins, A. Gray, J. Price und S. E. Anderson (1989). „Regulation of Development by the matA Complex Locus in *Physarum polycephalum*“. In: *Microbiology* 135.5, S. 1347–1359.
- Anderson, Roger W. und Christine L. Truitt (1983). „A new type of plasmodium formation in *Physarum polycephalum*“. In: *Genetical Research* 42, S. 285–296.
- Ao, P. (2004). „Potential in stochastic differential equations: novel construction“. In: *Journal of Physics A: Mathematical and General* 37, S. L25–L30.
- Azadov, Konstantin (2008). *Clusteranalyse von Genexpressionsdaten*. Lehr- und Forschungseinheit Bioinformatik, Ludwig-Maximilians-Universität, München.
- Baldauf, Sandra L. und W. Ford Doolittle (Okt. 1997). „Origin and evolution of the slime molds (Mycetozoa)“. In: *PNAS* 94.22, S. 12007–12012.
- Barrantes, Israel, Gernot Glöckner, Sonja Meyer und Wolfgang Marwan (2010). „Transcriptomic changes arising during light-induced sporulation in *Physarum polycephalum*“. In: *BMC Genomics* 11.115.
- Bartz, Susann (2014). „Vergleich des Genexpressionsmusters einer Zelldifferenzierungsmutante von *Physarum polycephalum* mit dem Wildtyp“. Masterarbeit. Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg.
- Beckman Coulter Inc. (2003). *CEQ™8800 Genetik-Analyse-System – Kurzanleitung*. Beckman Coulter Inc.
- Bhattacharya, Sudin, Qiang Zhang und Melvin E. Andersen (2011). „A deterministic map of Waddington’s epigenetic landscape for cell fate specification“. In: *BMC Systems Biology* 5.85.
- Blätke, Mary-Ann (Juli 2017). „BIOMODELKIT – A Framework for Modular Biomodel-Engineering“. Diss. Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg.
- Blätke, Mary-Ann, Monika Heiner und Wolfgang Marwan (2011). *Tutorial – Petri-Nets in Systems Biology*. Techn. Ber. Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg.

- Brandmaier, Anton (2005). „Polymalatasenabhängigkeit des Transports von Polymalat in *Physarum polycephalum*“. Diss. Universität Regensburg.
- Burland, Timothy G., Lilianna Solnicakrezel, Juliet Bailey, David B. Cunningham und William F. Dove (1993). „Patterns of Inheritance, Development and the Mitotic Cycle in the Protist *Physarum polycephalum*“. In: *Advances in Microbial Physiology* 35, S. 1–69.
- Chapman, Aileen und J.G. Coote (1982). „Sporulation Competence in *Physarum polycephalum* CL and the Requirement for DNA Replication and Mitosis“. In: *Journal of General Microbiology* 128, S. 1489–1501.
- Chomczynski, Piotr und Nicoletta Sacchi (2006). „Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction: twenty-something years on“. In: *Nature Protocols* 1.2, S. 581–585.
- Daniel, John W. und Harold P. Rush (1961). „Method for inducing sporulation of pure cultures of the myxomycete *Physarum polycephalum*“. In: *Journal of Bacteriology* 83.2, S. 234–240.
- Davila-Velderrain, Jose, Juan C. Martinez-Garcia und Elena R. Alvarez-Buylla (2015). „Modeling the epigenetic attractors landscape: toward a post-genomic mechanistic understanding of development“. In: *Frontiers in Genetics* 6.160.
- Freidlin, M. I. und A. D. Wentzell (1984). „Random Perturbations of Dynamical Systems“. In: Bd. 260. Grundlehren der mathematischen Wissenschaften. Springer US, S. 15–43.
- Gebert, Nicole (2013). „Allel-spezifische PCR an SNP-Loci zur Quantifizierung der Zellkern-Anteile in Heterokarya“. Bachelorarbeit. Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg.
- Goldberg, Aaron D., C. David Allis und Emily Bernstein (2007). „Epigenetics: A Landscape Takes Shape“. In: *Cell* 128.4, S. 635–638.
- Golderer, Georg, Ernst R. Werner, Stefan Leitner, Peter Gröbner und Gabriele Werner-Felmayer (2001). „Nitric oxide synthase is induced in sporulation of *Physarum polycephalum*“. In: *Genes and Development* 15, S. 1299–1309.
- Guttes, E., Sophie Guttes und Harold P. Rusch (Okt. 1961). „Morphological observations on growth and differentiation of *Physarum polycephalum* grown in pure culture“. In: *Developmental Biology* 3.2, S. 588–614.
- Hayashi, Eiji, Natsuyo Aoyama, Yong Wu, Han-Chang Chi, Scott K. Boyer und David W. Still (2005). „Multiplexed, quantitative gene

- expression analysis for lettuce seed germination on GenomeLab™ GeXP genetic analysis system“. In: *Application information*.
- Heiner, Monika, David Gilbert und Robin Donaldson (2008). „Petri Nets for Systems and Synthetic Biology“. In: *Formal Methods for Computational Systems Biology*. Bd. 5016. LNCS. Berlin, Heidelberg: Springer, S. 215–264.
- Hoffmann, Xenia-Katharina, Jens Tesmer, Manfred Souquet und Wolfgang Marwan (Apr. 2012). „Futile attempts to differentiate provide molecular evidence for individual differences within a population of cells during cellular reprogramming“. In: *FEMS* 329, S. 78–86.
- Huang, Sui, Ingemar Ernberg und Stuart Kauffman (2009). „Cancer attractors: A systems view of tumors from a gene network dynamics and developmental perspective“. In: *Seminars in Cell and Developmental Biology* 20.7, S. 869–876.
- Hubert, Mia und Sanne Engelen (2004). „Robust PCA and classification in biosciences“. In: *Bioinformatics* 20.11, S. 1728–1736.
- James E. Ferrell, Jr. (2012). „Bistability, Bifurcations, and Waddington’s Epigenetic Landscape“. In: *Current Biology* 22, R458–R466.
- Jansohn, Monika und Sophie Rothhämel (2012). *Gentechnische Methoden*. 5th. Spektrum.
- Jehrke, Lisa (Sep. 2012). „Entwicklung einer kostengünstigeren Alternative zum "GenomeLab™ GeXP Start Kit" der Beckman Coulter GmbH für Genexpressionsanalysen“. Bachelorarbeit. Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg.
- Köhler, Wolfgang, Gabriel Schachtel und Peter Voleske (2012). *Biostatistik*. Bd. 5. Springer Spektrum.
- Kopp, Dominique (2016). „Etablierung einer Methode zur Inaktivierung von Genen in *Physarum polycephalum* basierend auf der CRISPR-Cas9-Technik“. Masterarbeit. Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg.
- Laffler, Thomas G. und William F. Dove (1977). „Viability of *Physarum polycephalum* Spores and Ploidy of Plasmodial Nuclei“. In: *Journal of Bacteriology* 131.2, S. 473–476.
- Lamparter, Tilman und Wolfgang Marwan (2001). „Spectroscopic detection of a phytochrome-like photoreceptor in the Myxomycete *Physarum polycephalum* and the kinetic mechanism for the photocontrol of sporulation by  $P_{fr}$ “. In: *Photochemistry and Photobiology* 73, S. 697–702.

- Lin, Yun und Sumedha D. Jayasena (1997). „Inhibition of Multiple Thermostable DNA Polymerases by a Herterdimeric Apdamer“. In: *Journal of Molecular Biology* 271, S. 100–111.
- Lorenz, Rolf (1992). *Grundbegriffe der Biometrie*. Gustav Fischer Verlag.
- Marquardt, Pauline, Britta Werthmann, Viktoria Rätzel, Markus Haas und Wolfgang Marwan (Juli 2017). „Quantifying 35 transcripts in a single tube: Model-based calibration of the GeXP RT-PCR assay“. In: *bioRxiv (Preprint)*.
- Marwan, Wolfgang (1998). „Kinetic analysis of a signal transduction pathway by time resolved somatic complementation of mutants“. In: *Journal of Experimental Biology* 201, S. 1991–1999.
- Marwan, Wolfgang (2003). „Theory of Time-Resolved Somatic Complementation and Its Use to Explore the Sporulation Control Network in *Physarum polycephalum*“. In: *Genetics* 164.1, S. 105–115.
- Marwan, Wolfgang (2006). *Die Kontrolle der Zelldifferenzierung: Neue Methoden zur Erforschung der Struktur und Funktion eines molekularen Netzwerkes*. Tätigkeitsbericht 2006, Max-Planck-Institut für Dynamik komplexer technischer Systeme.
- Marwan, Wolfgang und Christine Starostzik (2002). „The Sequence of Regulatory Events in the Sporulation Control Network of *Physarum polycephalum* Analysed by Time-resolved Somatic Complementation of Mutants“. In: *Protist* 153, S. 391–400.
- Marwan, Wolfgang, Arumugam Sujatha und Christine Starostzik (Okt. 2005). „Reconstructing the regulatory network controlling commitment and sporulation in *Physarum polycephalum* based on hierarchical Petri Net modelling and simulation“. In: *Journal of Theoretical Biology* 236.4, S. 349–365.
- Nakagaki, T., S. Umemura, Y. Kakiuchi und T. Ueda (1996). „Action spectrum for sporulation and photoavoidance in the plasmodium of *Physarum polycephalum*, as modified differentially by temperature and starvation“. In: *Photochemistry and Photobiology* 64, S. 859–862.
- Pluthero, F. G. (1993). „Rapid purification of high-activity Taq DNA polymerase“. In: *Nucleic Acids Research* 21.20, S. 4850–4851.
- Poulter, R. T. M. und Jennifer Dee (1968). „Segregation of factors controlling fusion between plasmodia of the true slime mould *Physarum polycephalum*“. In: *Genetical Research* 12, S. 71–79.
- Rätzel, Viktoria (Nov. 2015). „Dynamische Fließgleichgewichte und ihre Übergänge in Reaktionsnetzwerken: Experimenteller Nachweis der Quasipotential-Landschaft der zellulären Reprogrammierung“. Diss. Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg.

- Rätzel, Viktoria, Britta Ebeling, Xenia-Katharina Hoffmann, Jens Tesmer und Wolfgang Marwan (2013). „*Physarum polycephalum* mutants in the photocontrol of sporulation display altered patterns in the correlated expression of developmentally regulated genes“. In: *Development, Growth and Differentiation* 55, S. 247–259.
- Rothe, Dr. Marcus, Dr. Ramon Enriquez Schäfer, Dr. Jan Fiedler und Dr. Manfred Souquet Beckman Coulter GmbH (2005). „Genexpressionsanalyse mittels eXpress-Profiling und Kapillarelektrophorese“. In: *Laborwelt* 6.5, S. 18–21.
- Rummel, Heike (2014). „Optimierung der Reaktionsbedingungen einer Multiplex-RT-PCR zur Quantifizierung von Transkriptmengen nach der Methode des "Gene Express Profiling"“. Masterarbeit. Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg.
- Rush, H. P., W. Sachsenmaier, Kathryn Behrens und Vera Gruter (Okt. 1966). „Synchronization of mitosis by the fusion of the plasmodia of *Physarum polycephalum*“. In: *J Cell Biol* 31, S. 204–209.
- Sauer, H. W. (1982). *Developmental Biology of Physaum polycephalum*. Cambridge: Cambridge University Press.
- Sauer, H. W., K. L. Babcock und H. P. Rush (Okt. 1969). „Sporulation in *Physarum polycephalum*—A Model System for Studies on Differentiation“. In: *Experimental Cell Research* 57.2, S. 319–327.
- Schaap, Pauline u. a. (2015). „The *Physarum polycephalum* Genome Reveals Extensive Use of Prokaryotic Two-Component and Metazoan-Type Tyrosine Kinase Signaling“. In: *Genome Biol. Evol.* 8.1, S. 109–125.
- Schäfer, Ramon Enriquez (2005). „Die Multiplex Fragment-Expressionsanalyse - Eine neue Methode für die schnelle und zuverlässige Analyse der Genexpression“. In: *BIOspektrum* 11.
- Sitte, Peter, Hubert Ziegler, Friedrich Ehrendorfer, Andreas Bresinsky und Eduard Strasburger (1998). *Lehrbuch der Botanik für Hochschulen*. 34th. Stuttgart: Spektrum Akademischer Verlag.
- Starostzik, Christine und Wolfgang Marwan (1995a). „A photoreceptor with characteristics of phytochrome triggers sporulation in the true slime mould *Physarum polycephalum*“. In: *FEBS Letters* 370, S. 146–148.
- Starostzik, Christine und Wolfgang Marwan (1995b). „Functional mapping of the branched signal transduction pathway that controls sporulation in *Physarum polycephalum*“. In: *Photochemistry and Photobiology* 62, S. 930–933.
- Starostzik, Christine und Wolfgang Marwan (Juli 1998). „Kinetic analysis of a signal-transduction pathway by time-resolved somatic

- complementation of mutants". In: *Journal of Experimental Biology* 201, S. 1991–1999.
- Streuli, Charles (1999). „Extracellular matrix remodelling and cellular differentiation". In: *Current Opinion in Cell Biology* 11, S. 634–640.
- Strube, Jan (Juni 2013). „Optimierung der Reaktionsbedingungen zur Quantifizierung von Transkriptmengen in einer RT-PCR". Bachelorarbeit. Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg.
- Thermo Fisher Scientific (2008). *NanoDrop 1000 Spectrophotometer – Users Manual*. Thermo Fisher Scientific.
- Waddington, Conrad Hal (1957). *The Strategy of the Genes; a Discussion of some Aspects of Theoretical Biology*. London: Allen und Unwin.
- Walter, Pauline, Xenia-Katharina Hoffmann, Britta Ebeling, Markus Haas und Wolfgang Marwan (2013). „Switch-like reprogramming of gene expression after fusion of multinucleate plasmodial cells of two *Physarum polycephalum* sporulation mutants". In: *Biochemical and Biophysical Research Communications* 435, S. 88–93.
- Wang, Jin, Li Xu und Erkang Wang (2008). „Potential landscape and flux framework of nonequilibrium networks: Robustness, dissipation, and coherence of biochemical oscillations". In: *PNAS* 105.34, S. 12271–12276.
- Wang, Jin, Kun Zhang, Li Xu und Erkang Wang (2010). „Quantifying the Waddington landscape and biological paths for development and differentiation". In: *PNAS* 108.20, S. 8257–8262.
- Wang, Wei (2013). „Therapeutic Hints from Analyzing the Attractor Landscape of the p53 Regulatory Circuit Therapeutic Hints from Analyzing the Attractor Landscape of the p53 Regulatory Circuit". In: *Science Signaling* 6, pe5.
- Watson, James D., Tania Baker, Stephen Bell, Alexander Gann, Michael Levine und Richard Losick (2011). *Molekularbiologie*. 6th. München, Deutschland: Pearson Studium.
- Wheals, A. E. (1970). „A homothallic strain of the myxomycete *Physarum polycephalum*". In: *Genetics* 66.4, S. 623–633.
- Zhou, Peijie und Tiejun Li (2016). „Construction of the landscape for multi-stable systems: Potential landscape, quasi-potential, A-type integral and beyond". In: *The Journal of Chemical Physics* 114.
- Zhu, X.-M., L. Yin, L. Hood und P. Ao (2004). „Robustness, stability and efficiency of phage  $\lambda$  genetic switch: dynamical structure analysis". In: *Journal of Bioinformatics and Computational Biology* 02.04, S. 785–817.