



Forschungszentrum Karlsruhe
in der Helmholtz-Gemeinschaft

Wissenschaftliche Berichte
FZKA 7271

**Die Signaltransduktionswirkung
von Insulin in der adulten
*Drosophila melanogaster***

S. Buch

Institut für Toxikologie und Genetik

Dezember 2006

Forschungszentrum Karlsruhe

in der Helmholtz Gemeinschaft

Wissenschaftliche Berichte

FZKA 7271

Die Signaltransduktionswirkung von Insulin in der
adulten *Drosophila melanogaster*

Susanne Buch

Institut für Toxikologie und Genetik

von der Fakultät für Chemie und Biowissenschaften der Universität
Karlsruhe genehmigte Dissertation

Forschungszentrum Karlsruhe GmbH, Karlsruhe

2006

Für diesen Bericht behalten wir uns alle Rechte vor

Forschungszentrum Karlsruhe GmbH
Postfach 3640, 76021 Karlsruhe

Mitglied der Hermann von Helmholtz-Gemeinschaft
Deutscher Forschungszentren (HGF)

ISSN 0947-8620

urn:nbn:de:0005-072713

Die Signaltransduktionswirkung von Insulin in der adulten *Drosophila melanogaster*

Zur Erlangung des akademischen Grades eines

Doktors der Naturwissenschaften

(Dr. rer. nat.)

von der Fakultät für Chemie und Biowissenschaften der

Universität Karlsruhe (TH)

genehmigte

Dissertation

von

Dipl.-Biol. Susanne Buch

aus Kaiserslautern

Dekan: Prof. Dr. H. Puchta
Referent: PD Dr. M.J. Pankratz
Korreferent: Prof. Dr. R. Paulsen
Tag der mündlichen Prüfung: 16.02.2006

Zusammenfassung

Die Rolle des Insulin-Signaltransduktionsweges in der Kontrolle der Entwicklung, der Physiologie und der Lebensdauer eines Organismus wurde in den vergangenen Jahren eingehend untersucht. Aufgrund seiner evolutionären Konservierung konnte durch Modellorganismen wie *C. elegans*, *Drosophila* und *Mus musculus* ein schneller Fortschritt bei der Entschlüsselung von Komponenten dieses Signalweges gemacht werden. In *Drosophila* wurden sieben verschiedene Homologe des Säuger-Insulins identifiziert. Drei der „*Drosophila* insulin-like peptides“ (*dilps*) werden in den medianen neuroendokrinen Zellen des Gehirns exprimiert. Diese Insulin-produzierenden Zellen (IPCs) senden neuronale Projektionen in Zellen der Corpora cardiaca. In diesen Zellen wird das Glucagonhomolog AKH (Adipokinetisches Hormon) produziert, zudem sind sie in der Lage Insulin zu speichern. Die beiden Zelltypen können als funktionelles Homolog der A- und B-Zellen des Säuger-Pankreas angesehen werden.

Bisher wurden die Studien in *Drosophila* an Mutanten des Insulin-Signaltransduktionsweges und an teilweise IPC-defizienten Fliegen durchgeführt. In beiden Fällen konnte der beobachtete Phänotyp von entwicklungsbedingten Defekten und der verminderten Insulin-Signalwirkung selbst ausgelöst worden sein. In dieser Arbeit wurden mit Hilfe des spät in der Entwicklung aktiven *dilp3*-Promotors und der Apoptose-induzierenden Faktoren RPR (reaper) und HID (Head involution defective) die IPCs zerstört. Ein larvaler Phänotyp wie bei den Mutanten des Insulin-Signaltransduktionsweges war nicht zu beobachten. So war es nun möglich, den Effekt einer verminderten Insulin-Signalwirkung in Adulten getrennt von entwicklungsabhängigen Effekten zu betrachten. Es zeigte sich, dass IPC-defiziente Weibchen Probleme haben, sich unterschiedlichen Nahrungsbedingungen anzupassen. Sie konnten Glycogen und Körperfett nicht so leicht abbauen. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass bei Fütterung mit proteinreicher und kohlenhydratarmer Nahrung ihre Lebenserwartung gegenüber den Kontrollen erhöht war. Die Analyse dieser Fliegen mit Hilfe von cDNS-Microarrays führte zur Identifizierung des „target of brain insulin“ (*tobi*), einer α -Glucosidase, die im Darm und im Fettkörper von Adulten exprimiert wurde. TOBI ist evolutionär konserviert und es existiert ebenfalls ein menschliches Homolog. Das Transkript der α -Glucosidase wurde bei verminderter Insulin-Signalwirkung reprimiert, zudem wurde es abhängig von der Proteinkonzentration in der Nahrung reguliert. Durch die Zerstörung der AKH-produzierenden Zellen konnte *tobi* ebenfalls reprimiert werden. Dies zeigte, dass zusätzlich zu den IPCs auch die AKH-Zellen nötig waren, um das *tobi*-induzierende Signal weiterzuleiten. Diese Ergebnisse machen TOBI zu einem interessanten Zielgen des Insulinsignaltransduktionsweges, besonders seine mögliche Rolle im Alterungsprozess bedarf einer weiteren Untersuchung.

Abstract

Effects of insulin signaling in adult *Drosophila melanogaster*

In recent years, the role of insulin signaling (IIS) pathway in controlling organismal development, physiology and longevity has been investigated in detail. On the basis of its evolutionary conservation fast progress could be made in the identification of components of IIS-signaling by the use of model organisms like *C. elegans*, *Drosophila* and *Mus musculus*. In *Drosophila*, seven different homologues of mammalian insulin have been identified. Three of the the so-called „*Drosophila* insulin-like peptides“ (*dilps*) are expressed in median neurosecretory cells in the brain. Those insulin-producing cell (IPCs) send neuronal projections in cells of the corpora cardiaca where the the homologue of glucagon, AKH (adipokinetic hormone) is produced. In addition, the AKH-cells are able to store insulin. Those two cell-types are considered as a functional homologue of A- and B-cells of mammalian pancreas.

So far, studies in *Drosophila* have been performed on mutants of IIS-signaling and on partially IPC-deficient flies. In both cases, the phenotype observed could be triggered by developmental defects and by insulin-deficiency itself. In this thesis, IPCs have been destroyed using *dilp3*-promoter, which becomes active late during larval development, and the apoptosis-inducing factors RPR (reaper) and HID (head involution defective). Unlike in IIS-signaling mutants, no larval phenotype could be observed. Due to this, it was now possible to study the effect of reduced IIS-signaling in adults independent of developmental defects. It was apparent, that IPC-deficient female flies have problems in adapting to different nutrient conditions. They could not break down glycogen and body fat as easily. Additionally, when fed with a protein-rich and carbohydrate-poor diet, they lived longer than the controls. cDNA-microarray analysis of those flies led to the identification of a gene named „target of brain insulin“ (*tobi*), which is a α -glucosidase, that is expressed in gut and fat body of adult flies. TOBI is evolutionarily highly conserved and additionally a human homologue exists. *tobi*-transcript is repressed under reduced IIS-signaling; furthermore, its regulation is dependent on protein concentration of the diet. By destroying AKH-producing cells, *tobi* was repressed as well. This showed that AKH-cells, in addition to the IPCs, are required to process the *tobi*-inducing signal. These results make *tobi* a interesting target gene of IIS-signaling and especially its putative role in aging process deserves a closer investigation.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Insulin im Organismus	1
1.2	Der Insulin-Signaltransduktionsweg	2
1.3	Diabetes mellitus	4
1.4	Insuline in <i>C. elegans</i>	5
1.5	Insuline in <i>Drosophila</i>	6
1.6	Adipokinetisches Hormon als Glucagonhomolog	9
1.7	Insulin und Lebensdauer	9
1.8	Ziel der Arbeit	11
2	Material	13
2.1	Bezugsquellen für Verbrauchsmaterialien und Chemikalien	13
2.2	Bezugsquellen für Enzyme	16
2.3	Bezugsquellen für Kits	17
2.4	Bezugsquellen für Geräte	17
2.5	Lösungen und Medien	19
2.6	Fliegenlinien	20
2.7	Vektoren und Plasmide	20
2.8	Hybridisierungs-Sonden	20
2.9	Bakterienstämme	21
2.10	RT-PCR Primer	21
2.11	Realtime RT-PCR Primer	21
3	Methoden	23
3.1	Fliegenhaltung	23
3.2	Fütterungsexperimente	23
3.3	Phänotypische Untersuchungen an Adulten	24
3.4	Genetik	27
3.5	Molekularbiologische und biochemische Methoden	30
3.6	cDNS-Microarrays	37
3.7	Immunhistochemische- und Fluoreszenz-Färbungen	40

4	Ergebnisse	45
4.1	Charakterisierung der Insulin-Homologe in <i>Drosophila</i>	45
4.2	Neuronale Projektion der IPCs.....	48
4.3	Phänotypische Betrachtung der IPC-defizienten Fliegen.....	52
4.4	Genomweite Analyse IPC-defizienter Fliegen.....	56
4.5	Charakterisierung des target of brain insulin (<i>tobi</i>)	59
5	Diskussion	71
5.1	Die Expression der <i>dilps</i> in neuroendokrinen Zellen des Gehirns verdeutlicht ihre Funktion als hormonellen Mediator	72
5.2	Die Verwendung des <i>dilp3</i> -Promoters ermöglicht die Zerstörung der IPCs spät in der larvalen Entwicklung	72
5.3	Die Körperphysiologie ist abhängig von Insulin und der Nahrungsbedingung	73
5.4	Die Verminderung der Insulin-Signalwirkung beeinflusst die Lebensdauer nur bei bestimmten Nahrungsbedingungen	75
5.5	Charakterisierung des target of brain insulin	76
5.6	<i>tobi</i> wird abhängig von der Proteinkonzentration reguliert	78
5.7	<i>tobi</i> als negativer Effektor der Langlebigkeit?	79
5.8	Ausblick	80
6	Anhang	83
6.1	Literaturverzeichnis.....	83
6.2	Abkürzungsverzeichnis	89
6.3	Abbildungsverzeichnis	91

1 Einleitung

Ein Organismus benötigt Energie und Nährstoffe, um Funktionen wie Wachstum, Entwicklung und Fortpflanzung aufrecht zu erhalten. Mit der Entwicklung vielzelliger Organismen reichte es nicht mehr aus, Nährstoffe direkt von der Umgebung über die Körperwand aufzunehmen. So entwickelten sich spezialisierte Organe zur Verdauung und Resorption der Nährstoffe sowie sensorische Organe zur Rezeption derselben. Regulationsmechanismen entstanden, die ein kontrolliertes Zusammenspiel zwischen Nahrungsbedarf und Nahrungsaufnahme ermöglichten. Dazu wurde es notwendig, dass die verschiedenen Organe und Zellen in der Lage waren, miteinander zu kommunizieren. Dies wurde durch die Verwendung extrazellulärer Liganden erreicht, welche an spezifische Rezeptoren anderer Zellen binden und somit ein Signal von einer Zelle zur anderen auch ohne direkten Zell-Zell-Kontakt übermitteln konnten. Eines der wichtigsten Systeme, das sich im Verlauf der Evolution entwickelt hat und in vielen höheren Organismen, einschließlich dem Menschen zu finden ist, ist der Insulin-Signaltransduktionsweg.

1.1 Insulin im Organismus

Das Peptidhormon Insulin wird in den β -Zellen des Säuger-Pankreas hergestellt. Es ist ein aus zwei Ketten bestehendes Polypeptid. Die A-Kette (21 Aminosäuren) und die B-Kette (30 Aminosäuren) sind durch Disulfidbrücken miteinander verbunden. Die Proform des Insulin besteht aus einem einzigen Molekül, nach Faltung und Verknüpfung wird das für die biologische Funktion nicht notwendige Verbindungsstück C-Peptid (connective peptide) abgespalten (Schmidt et al. 1980). Das biologisch wirksame Insulin wird in sekretorischen Granula in den β -Zellen des Pankreas gespeichert. Die Insulin-Sekretion wird unter anderem durch den Glucosespiegel im Blut beeinflusst. Es hat eine blutzuckersenkende Wirkung indem es die Aufnahme von Glucose in die Körperzellen stimuliert.

Die Insulin-Signalkwirkung beeinflusst viele Vorgänge im Körper. Es wird zwischen zellautonomen und nichtautonomen Effekten unterschieden (Abbildung 1.1). Zu den zellautonomen Funktionen gehören der direkte Effekt auf Zellwachstum und Proliferation, die Speicherung von Nährstoffen (Glycogen, Lipide) und die Synthese von Proteinen. Die nichtautonome Funktion beinhaltet die Modulation neuroendokriner Signalwege, welche wiederum Metabolismus, Reproduktion und Lebensdauer des Organismus an die vorhandenen Nahrungsbedingungen anpassen können.

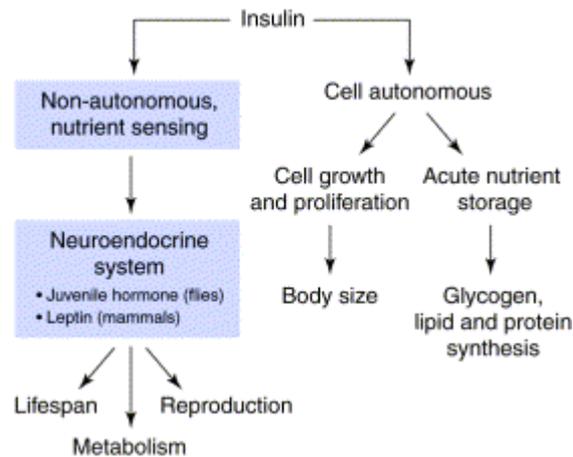


Abbildung 1.1: Zellautonome und nichtautonome Funktionen von Insulin (Garofalo 2002). Erläuterung siehe Kapitel 1.1.

1.2 Der Insulin-Signaltransduktionsweg

Der Insulin-Signaltransduktionsweg in Säugern ist eingehend untersucht worden (Abbildung 1.2). Obwohl viele Komponenten entdeckt wurden, bleibt noch offen, an welchen Schnittstellen andere Regulationsmechanismen eingreifen können. In Säugern finden sich in der Insulin-Peptidhormon-Familie neben Insulin auch die Wachstumsfaktoren IGF-I und IGF-II (insulin-like growth factor). Diese regulieren hormonabhängig das Wachstum des Organismus (Butler et al. 2001). Der Insulin-Rezeptor gehört zur Familie der Rezeptor-Tyrosin-Kinasen, welche auch den IGF-I-Rezeptor und den IRR-Rezeptor (insulin receptor-related receptor) beinhalten (Patti et al. 1998). Der Insulin-Rezeptor ist ein tetrameres Protein, welches aus zwei α - und zwei β -Untereinheiten besteht. Diese wirken als allosterische Enzyme, wobei die α -Untereinheit die Tyrosin-Kinase-Aktivität der β -Untereinheit blockiert. Durch Binden des Liganden wird diese Inhibition aufgehoben, der Rezeptor dimerisiert und die Kinaseaktivität wird erhöht. Als Substrate der Tyrosin-Kinase dienen IRS1-4 (insulin receptor substrates) (White et al. 1998); diese werden phosphoryliert und interagieren mit Signalmolekülen in der Zelle. Weitere Substrate des Rezeptors sind Gab-1, p60dok, Cbl, APS und Isoformen von SHC (Pessin et al. 2000). Die phosphorylierten Tyrosine dieser Substrate können als Bindestellen für Proteine dienen, die eine SH2-Domäne (Src-Homology 2) enthalten. Viele dieser SH2-Proteine agieren als Adaptermoleküle, wie zum Beispiel Grb2 (growth factor receptor bound protein 2) welches den MAPK-Signaltransduktionsweg (mitogen-activated protein kinase) aktiviert, welcher die Proliferation der Zelle steuert (Skolnik et al. 1993). Die regulatorische Untereinheit der PI3K (Phosphatidylinositol 3-Kinase) kann mit ihrer SH2-Domäne ebenfalls an die phosphorylierten Tyrosine der

Substrate binden. Es existieren mindestens acht Isoformen dieser Untereinheit, doch ist ihre genaue Rolle in der Vermittlung des Insulin-Signals unklar. Es zeigten sich Unterschiede bezüglich der Aktivierung von Enzymen, der Verteilung im Gewebe und der Insulin-Sensitivität (Antonetti et al. 1996; Fruman et al. 1996; Kerouz et al. 1997). Die Klasse 1A der PI3-Kinasen phosphoryliert das in der Lipidmembran vorkommende PIP₂ (Phosphatidylinositol-4,5-P₂) und es entsteht PIP₃ (Phosphatidylinositol-3,4,5-P₃) (Britton et al. 2002). Dieser Vorgang wird durch die Lipid-Phosphatase PTEN beeinträchtigt (Maehama et al. 1999). Erhöhte PIP₃-Level rekrutieren die cytoplasmatische Serin/Threonin Kinase Akt/PKB an die Plasmamembran und ermöglichen deren weitere Aktivierung durch die Serin-Kinase PDK-1 (phosphoinositide dependent kinase 1) (Mora et al. 2004). Beide Enzyme, PDK-1 und AKT/PKB enthalten Phosphoinositid-interagierende Domänen, die so genannten PH-Domänen (pleckstrin homology domains).

Unter den Substraten, welche von AKT/PKB phosphoryliert werden, sind metabolische Enzyme wie GSK-3 (glycogen synthase kinase 3) und 6-Phosphofructo-2-Kinase, BAD, ein Protein das in das Überleben der Zelle involviert ist, Transkriptionsfaktoren der FOXO-Familie und das Tumorsuppressorprotein TSC2 (tuberous sclerosis complex 2) (Brazil et al. 2004). Die Phosphorylierung und Inaktivierung von GSK-3 führt zur Dephosphorylierung der Glycogen-Synthase wodurch Glycogen synthetisiert wird (Cross et al. 1995). AKT/PKB phosphoryliert FOXO und verhindert dadurch dessen Signalwirkung als Transkriptionsfaktor, da es durch Binden cytoplasmatischer Proteine im Cytoplasma zurückgehalten wird. FOXO ist in die Kontrolle des Zellzyklus, Zelltod, Apoptose und oxidativem Stress involviert (Nakae et al. 1999). TSC2 bildet einen Komplex mit TSC1 und agiert als Tumorsuppressor bei Säugern (Krymskaya 2003). Ein weiterer Effekt der Insulin-Signalwirkung ist die Aktivierung der S6-Kinase, was die Effizienz der Translation von mRNS, die 5'-terminale Oligopyrimidin-Bereiche enthält, erhöht (Raught et al. 2001). Einige dieser mRNS codieren für ribosomale Proteine und Translationsfaktoren, was auf eine generelle Stimulation der Proteinbiosynthese hinweist. Die S6-Kinase wird zusätzlich durch TOR (target of rapamycin) aktiviert (Thomas et al. 1997). Der TOR-Signaltransduktionsweg ist in der Evolution hoch konserviert, er koordiniert das Gleichgewicht zwischen Protein-Biosynthese und Protein-Degradation als Antwort auf unterschiedliche Nahrungsbedingungen (Raught et al. 2001). Ein weiterer Effekt von Insulin auf den Organismus ist die Steigerung des Glucosetransports in Fett- und Muskelzellen. Es stimuliert die Translokation des Glucose-Transporters GLUT4 an die Plasmamembran, wodurch es zu einer erhöhten Glucoseaufnahme in die Zelle kommt (Pessin et al. 1999).

Es wird deutlich, wie komplex Insulin auf den Organismus einwirken kann. An vielen Stellen des Signaltransduktionsweges können Informationen ein- und ausgehen und mit verschiedenen anderen Regelmechanismen interagieren.

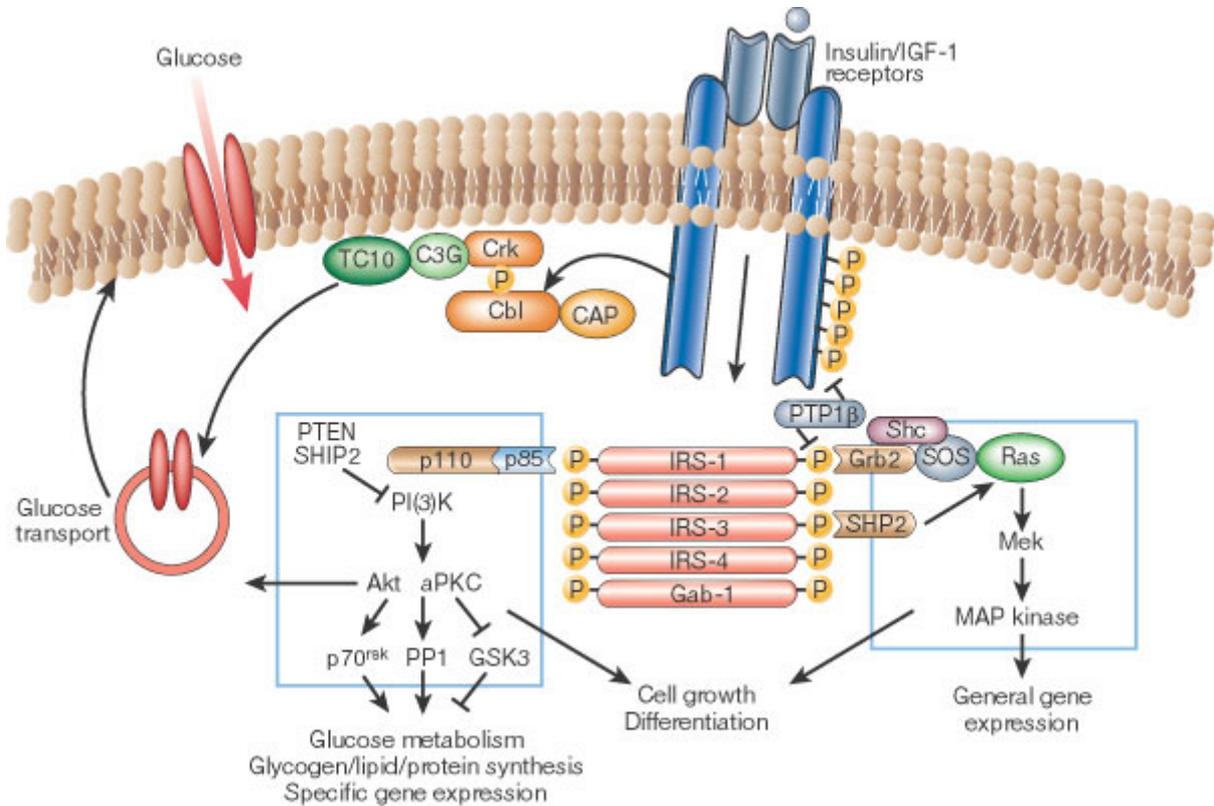


Abbildung 1.2: Schema des Insulin-Signaltransduktionsweges (Saltiel et al. 2001). Durch Aktivierung des Insulinrezeptors werden zelluläre Proteine phosphoryliert wie z.B. Mitglieder der Insulin-Rezeptor-Substrat-Familie (IRS1-4), SHC (Src homology 2 domain containing) und das Protoonkogen CBL (Casitas B-lineage lymphoma). Diese wiederum interagieren mit den SH2-Domänen von Signalmolekülen was zur Aktivierung verschiedener Signalwege führt. Über den PI3K-Signaltransduktionsweg werden Gene reguliert, die unter anderem den Glucose-Metabolismus und die Synthese von Glycogen, Lipiden und Proteinen steuern. Weiterhin steuert er zusammen mit dem MAPK-Signaltransduktionsweg Zellproliferation und Differenzierung. Die Aktivierung eines weiteren Signalweges über CBL führt zur Insulin-stimulierten Glucoseaufnahme in die Zelle.

1.3 Diabetes mellitus

Störungen innerhalb des Insulin-Signaltransduktionsweges haben mitunter dramatische Konsequenzen für den Organismus. Diabetes mellitus ist eine weltweit verbreitete Erkrankung, die den Zuckerstoffwechsel betrifft. Im Fall der Autoimmun-Erkrankung des TypI Diabetes kann der Patient kein eigenes Insulin mehr produzieren und es muss ihm zur Stabilisierung des Blutzuckerspiegels künstlich zugeführt werden. Im Gegensatz dazu ist bei Patienten mit TypII Diabetes der Insulin-Signaltransduktionsweg beeinträchtigt. Eine

Behandlung mit Insulin ist hier nicht in allen Fällen nötig. Eine bewusste, kohlenhydratarme Ernährung kann in leichteren Fällen schon zu einer Linderung der Symptome führen. Zusätzlich werden noch andere Diabetes Mellitus-Formen unterschieden, die je nach zeitlichem Auftreten, Insulinmangel, Insulinresistenz und Schwere der Erkrankung unterschieden werden (Pschyrembel et al. 1994). Allen gemein ist die Tatsache, dass Insulin nicht seine volle Funktion ausüben kann und es daraufhin zu einer Erhöhung des Blutzuckerspiegels mit seinen Folgeerkrankungen kommt. Die moderne Gesellschaft, in der Nahrung im Überfluss vorhanden ist, trifft immer mehr auf die Problematik der Folgen einer fehlerhaften Ernährung. In Deutschland liegt die Diabeteshäufigkeit bei 5-8% (Quelle: diabetes-world.net). Prognosen sagen eine weitere Steigerung der TypII Diabetes Erkrankungen voraus. Daher ist es unabdingbar, einen tieferen Einblick in die Natur der Erkrankung zu erlangen und weitere Therapieformen zu entwickeln.

1.4 Insuline in *C. elegans*

Studien im Fadenwurm *Caenorhabditis elegans* und der Fruchtfliege *Drosophila melanogaster* haben gezeigt, dass die Komponenten des Insulin-Signaltransduktionsweges evolutionär hoch konserviert sind. Das macht diese beiden schnell reproduzierenden und genetisch gut untersuchten Tierarten zu idealen Modellorganismen, um den Effekt der Insulin-Signalwirkung auf den Körper zu studieren. Abbildung 1.3 zeigt eine vereinfachte Darstellung des Insulin-Signaltransduktionsweges in linearer Abfolge. Die meisten Komponenten konnten auch in den beiden Modellorganismen nachgewiesen werden.

In *C. elegans* konnte bisher kein Insulin-Rezeptor-Substrat-Homolog identifiziert werden, jedoch wurde ein Homolog der Insulin-Rezeptor-Familie (DAF-2) gefunden (Kimura et al. 1997; Ruvkun et al. 1998). Bei Sequenzvergleichen mit dem menschlichen Insulin wurden bis zu 37 verschiedene Insulin-Homologe entdeckt (Pierce et al. 2001). Die meisten unter ihnen wurden in Neuronen exprimiert. Für einige wurde auch eine Expression in Darm, Muskel, Epidermis und Gonaden entdeckt (Finch et al. 2001; Pierce et al. 2001). Ob diese Gene auch alle für einen Liganden des Insulin-Rezeptors codieren, wurde noch nicht geklärt. Für einige Insulin-Homologe und ebenfalls für das menschliche Insulin konnte eine antagonistische Wirkung auf das durch DAF-2 vermittelte Rezeptorsignal gezeigt werden (Pierce et al. 2001). In *C. elegans* vermittelt die Insulin-Signalwirkung eine Unterbrechung in der Entwicklung, die sich als langlebige Dauer-Larve auszeichnet. Dieses Dauer-Stadium wird normalerweise durch einen Mangel an Nährstoffen induziert, so kann der Organismus in Zeiten eines geringen Nahrungsangebotes überleben.

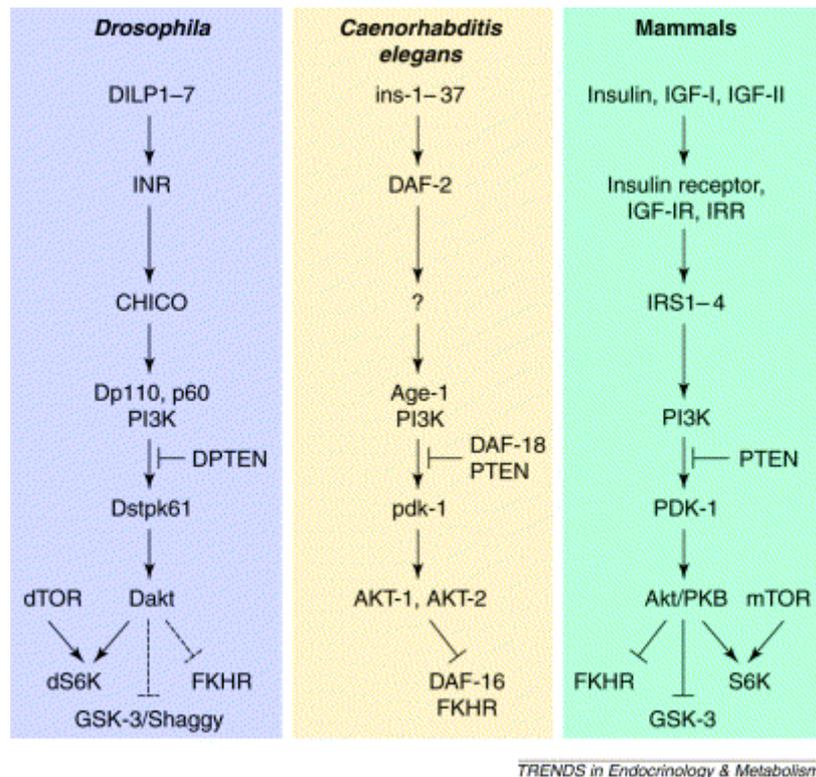


Abbildung 1.3: Evolutionäre Konservierung des Insulin-Signaltransduktionsweges (Garofalo 2002). Gezeigt ist die Homologie des Signalweges anhand der Modellorganismen *Drosophila* und *C. elegans* im Vergleich mit Säugetieren.

1.5 Insuline in *Drosophila*

In der Fruchtfliege *Drosophila* konnten bis heute zahlreiche Homologe des Insulin-Signaltransduktionsweges identifiziert werden (Abbildung 1.3, Abbildung 1.4). So ist zum Beispiel die Liganden-Bindedomäne des *Drosophila*-Insulin-Rezeptors (dINR) mit dem menschlichen Insulin-Rezeptor (hINR) zu ca. 40% identisch. Ebenfalls kann dINR durch menschliches Insulin aktiviert werden (Fernandez et al. 1995; Chen et al. 1996). Bisher konnten jedoch keine Homologe des IGF-I-Rezeptors und des IRR-Rezeptors in *Drosophila* charakterisiert werden. Im Gegensatz zum menschlichen Insulin-Rezeptor enthält die β -Untereinheit des dINR eine Verlängerung von 368 Aminosäuren, welche zusätzliche Tyrosin-Phosphorylierungsstellen enthält, die in der Lage sind, IRS-1 zu binden. Es konnten zwei Isoformen des Rezeptors nachgewiesen werden, die ein unterschiedliches Signalpotential besitzen (Fernandez et al. 1995; Marin-Hincapie et al. 1999). Anders als bei *C. elegans* konnte bei der Fruchtfliege ein Substrat für den Insulin-Rezeptor gefunden werden (Böhni et al. 1999). Es ist das einzige Homolog der Insulin-Rezeptor-Substrate1-4 und wurde aufgrund der kleinen Körpergröße der Mutanten CHICO genannt. Weiterhin wurden die übrigen

Komponenten des Signalweges wie PI3K (Leevers et al. 1996; Weinkove et al. 1999), dAKT/PKB (Verdu et al. 1999), dPTEN (Gao et al. 2000), PDK (Cho et al. 2001), dTOR (Oldham et al. 2000; Zhang et al. 2000) dS6-Kinase (Montagne et al. 1999) und dFOXO (Jünger et al. 2003) identifiziert und untersucht.

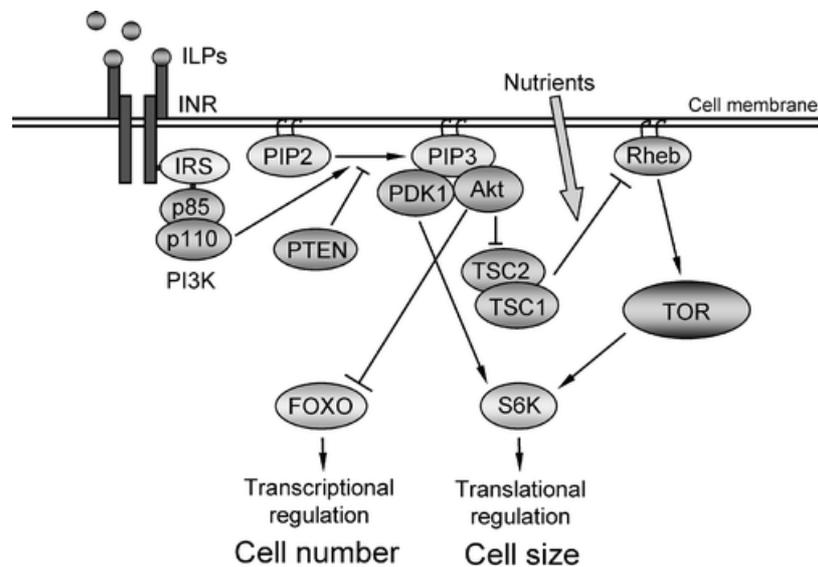


Abbildung 1.4: Konservierter Insulin-Signaltransduktionsweg in *Drosophila*. Die gezeigten Komponenten wurden genetisch und biochemisch charakterisiert (Wu et al. 2006).

Nicht alle Mutanten des Insulin-Signaltransduktionsweges sind lebensfähig. Zum Beispiel sind homozygote Mutanten von dINR letal, heteroallele Kombinationen dagegen lebensfähig und von geringer Körpergröße. Dieser Effekt auf die Körpergröße wurde auch bei Mutanten des Rezeptorsubstrates CHICO beobachtet, welcher durch kleinere und einer geringeren Anzahl von Zellen verursacht wird. Dieser Phänotyp ähnelt dem von Fliegen, die während ihrer Entwicklung gehungert wurden (Britton et al. 1998). Zusätzlich zeigen beide Mutanten eine Verlängerung der Entwicklungszeit und verminderte Fruchtbarkeit bei Weibchen. Bei Mutationen negativer Regulatoren des Insulin-Signaltransduktionsweges wie dPTEN (Huang et al. 1999) und TSC1/2 (Gao et al. 2001) kommt es im Gegenzug zu größeren Zellen. Diese Erkenntnisse deuten auf die bedeutende Rolle dieses Signalweges bei der Anpassung von Wachstum an die vorhandenen Nahrungsbedingungen hin (Britton et al. 2002).

Die Suche nach Liganden des dINR führte zu der Entdeckung von sieben *Drosophila* insulin-like peptides (DILPs, ILPs) (Brogiolo et al. 2001). Die A-Kette des menschlichen Insulins enthält vier Cysteine, deren Abstand innerhalb der Insulin-Peptide konserviert ist (Blundell et al. 1980). Dieses Kriterium diente bei einer Homologiesuche innerhalb des *Drosophila*-Genoms. Von den sieben entdeckten Insulinen liegen *dilp1-dilp5* in einem Cluster auf dem

dritten Chromosom. *Dilp6* und *dilp7* liegen auf dem X-Chromosom, jedoch an unterschiedlichen Loci. Die *dilps* codieren für Vorläuferproteine des Insulins mit einer Länge zwischen 107 und 156 Aminosäuren. Sie enthalten ein Signalpeptid, die B-Kette, das C-Peptid und die A-Kette. Strukturell ähneln sie damit Preproinsulin. Die größte Homologie zum menschlichen Insulin konnte für DILP2 mit einer 35%igen Übereinstimmung nachgewiesen werden (Brogiolo et al. 2001). Überexpression der einzelnen *dilps* in *Drosophila* bewirkte bei allen eine Zunahme der Körpergröße, was auf eine agonistische Wirkung auf den Rezeptor schließen lässt (Ikeya et al. 2002). Der stärkste Effekt war bei der Überexpression von *dilp2* zu beobachten. Eine vermehrte Überexpression hatte nur bei *dilp2* einen letalen Effekt.

Dilp2, *dilp3* und *dilp5* sind in gepaarten Zellclustern im medianen Teil des Gehirns der Larve exprimiert, den mNSCs (median neurosecretory cells). Es konnte bereits in anderen Invertebraten wie z.B. *Bombyx mori*, *Locusta migratoria* und *Lymnaea stagnalis* nachgewiesen werden, dass Insulin-artige Gene in neurosekretorischen Zellen exprimiert werden (Smit et al. 1988; Kawakami et al. 1989; Hetru et al. 1991). Für *dilp2* konnte zudem eine Expression in den Imaginalscheiben gezeigt werden. Die im Gehirn exprimierten *dilps* besitzen jeweils einen eigenen, spezifischen Enhancer, der ihre Expression im Gehirn steuert (Ikeya et al. 2002). Die mNSCs, auch Insulin-produzierende Zellen (IPCs) genannt, projizieren in der Larve Axone in laterale Bereiche der Gehirnhemisphären, zum subösophagealen Ganglion und in die Ringdrüse (Ikeya et al. 2002; Rulifson et al. 2002).

In verschiedenen Studien wurden die Insulin-produzierenden Zellen mithilfe des Zelltod-fördernden Faktors RPR unter der Kontrolle des Promoterelementes von *dilp2* zerstört und der resultierende Phänotyp eingehend untersucht. Darin zeigte es sich, dass Fliegen deren IPCs während der larvalen Entwicklung zerstört wurden, eine Entwicklungsverzögerung und eine geringere Körpergröße aufwiesen (Ikeya et al. 2002; Rulifson et al. 2002). Zudem war die Fruchtbarkeit der Weibchen beeinträchtigt und die Konzentration des Zuckers in der Hämolymphe war erhöht. Die beobachteten Effekte auf den Organismus resultierten allein aus der Insulin-Defizienz der Tiere, da der beobachtete Phänotyp durch die Überexpression von DILP2 gerettet werden konnte. Eine weitere Studie beschäftigte sich mit dem Effekt der Insulin-Defizienz in adulten Fliegen (Broughton et al. 2005). Dazu wurde ein *dilp2*-Promoterelement zur RPR-Expression verwendet, das erst spät in der Entwicklung aktiv wurde. Die resultierenden Fliegen zeigten im Vergleich mit der Kontrolle eine 30-40%ige Expression der Transkripte von *dilp2*, *dilp3* und *dilp5*, da nicht in allen Fällen sämtliche IPCs zerstört wurden. Die betroffenen Tiere zeigten eine geringe Reduktion der Körpergröße und

die Entwicklungszeit war nicht beeinträchtigt. Hingegen war eine Abnahme der Fertilität der Weibchen zu beobachten.

Die erhaltenen Ergebnisse bezüglich der *dilps* bestätigten ihre postulierte Funktion als Homologe des Insulins in *Drosophila* und machten sie zu einem interessanten Ansatzpunkt zur Untersuchung der Effekte von Insulin auf den Organismus.

1.6 Adipokinetisches Hormon als Glucagonhomolog

In Säugern wird die Aufrechterhaltung des Blutzuckerspiegels hauptsächlich von Insulin und dem in den α -Zellen des Pankreas produzierten Glucagon gesteuert. Während Insulin eine blutzuckersenkende Wirkung hat, erhöht Glucagon den Blutzuckerspiegel indem es z.B. den Abbau von Glycogen in der Leber fördert. Homologe des Säuger-Glucagons konnten auch in Insekten gefunden werden. Eine wichtige Rolle in *Drosophila* spielt das adipokinetische Hormon (AKH). Es trägt seinen Namen, da es nicht nur einen Effekt auf den Kohlenhydrat-, sondern auch auf den Lipid-Metabolismus zeigt. *Akh* wird in den Corpora cardiaca-Zellen der Ringdrüse exprimiert. Diese stehen in engem Kontakt mit den Insulin-produzierenden Zellen und sind in der Lage, die DILP-Proteine zu speichern (Rulifson et al. 2002). In der Larve senden die AKH-Zellen Projektionsneuronen zur Prothoraxdrüse und zur Aorta. In Adulten senden sie Projektionen zum Kropf und in das Gehirn (Lee et al. 2004). Werden diese Zellen durch Expression des Apoptosefaktors RPR zerstört, resultiert das in einer Absenkung des Zuckerspiegels in der Hämolymphe (Kim et al. 2004; Lee et al. 2004). So hat AKH verglichen mit den Gehirn-produzierten DILPs einen gegenteiligen Effekt auf den Zuckermetabolismus. Dies zusammen mit der Tatsache, dass die IPCs und die AKH-produzierenden Zellen in engem neuronalen Kontakt zueinander stehen, spricht für ein funktionelles Homolog zu den α - und β - Zellen des Säuger-Pankreas, das der Fruchtfliege eine Steuerung des Energiemetabolismus und die Aufrechterhaltung eines stabilen Hämolymphe-Zuckerspiegels ermöglicht.

1.7 Insulin und Lebensdauer

Auf der Suche nach Genen, die in den Alterungsprozess involviert sind zeigte sich, dass einige Komponenten des Insulin-Signaltransduktionsweges einen großen Einfluss auf die Lebensdauer haben. Verschiedene genetische Modellorganismen wie *C. elegans*, *Drosophila* und *Mus musculus* stellten sich hier als sehr nützliche Studienobjekte heraus.

C. elegans ist der kurzlebigste der untersuchten multizellulären Organismen, so zeigte sich hier auch der schnellste Fortschritt bei der Identifikation von Genen, die bei der Determination der Lebensdauer eine Rolle spielen. So alterten Tiere, die eine leichte Mutation im Insulin-Rezeptorhomolog Daf-2 trugen, langsamer und lebten doppelt so lang wie die Kontrollen (Kenyon et al. 1993; Kimura et al. 1997). Ähnliche Effekte wurden bei schwachen Mutationen von PDK1 und AGE-1, dem PI3K-Homolog, beobachtet (Morris et al. 1996; Paradis et al. 1999). Bei stärkeren Mutationen der oben genannten Komponenten fielen junge Larven in das stressresistente Dauerstadium. Die Mutation des negativen Regulators Daf-18, ein PTEN-Homolog, war in der Lage, die lebensverlängernde Wirkung von Mutationen in Daf-2 und AGE-1 zu unterdrücken (Dorman et al. 1995).

In *Drosophila* konnten ebenfalls Gene identifiziert werden, die einen Einfluss auf die Lebensdauer haben. So zeigen Mutanten des Insulin-Rezeptors und des Insulin-Rezeptor-Substrats CHICO eine deutliche Verlängerung der Lebensdauer (Clancy et al. 2001; Tatar et al. 2001). Ebenso konnte ein positiver Effekt auf die Lebenserwartung bei verminderter Expression der Gehirn-produzierten DILPs gezeigt werden (Broughton et al. 2005). Ein lebensverlängernder Effekt konnte ebenfalls erreicht werden, indem die Funktion der Jun-N-terminalen Kinase (JNK) leicht aktiviert wurde (Wang et al. 2005). Es wurde gezeigt, dass JNK diesen Effekt durch den Transkriptionsfaktor FOXO vermittelt. FOXO verlängert die Lebensspanne bei verminderter Insulin-Signaltransduktion (Giannakou et al. 2004; Hwangbo et al. 2004). Zudem verringert FOXO die Expression von *dilp2* in den IPCs und hemmt die endogene Insulin-Signalwirkung im peripheren Fettkörper. Diese Erkenntnisse verdeutlichen die Rolle von Insulin in der Anpassung der Lebenserwartung an die vorhandenen Nahrungsbedingungen. Lässt man Fruchtfliegen hungern, entstehen kleinere Fliegen die eine verminderte Fruchtbarkeit aufweisen. Dieser Phänotyp ähnelt sehr stark den beobachteten Effekten bei Mutationen des Insulin-Signaltransduktionsweges. Es konnte bereits gezeigt werden, dass unter Bedingungen der kalorischen, bzw. diätischen Restriktion, welche eine Reduktion der applizierten Nährstoffe darstellt, ein positiver Effekt auf die Lebenserwartung von *Drosophila* entsteht (Partridge et al. 2005).

In *Mus musculus* konnte ebenfalls eine lebensverlängernde Wirkung durch verminderte Insulin/IGF-Signaltransduktion nachgewiesen werden. So zeigten verschiedene Mutanten mit reduziertem IGF-1 eine bedeutende Verlängerung der Lebensspanne (Bartke et al. 2004). Ähnliche Effekte konnten in diesem Modellorganismus ebenfalls durch kalorische Restriktion beobachtet werden (Weindruch et al. 1986).

Diese Erkenntnisse verdeutlichen die zentrale Rolle der Insulin-Signaltransduktion in der Regulation der Lebensdauer eines Organismus.

1.8 Ziel der Arbeit

Bisherige Studien bezogen sich auf die Verminderung der Insulin-Signaltransduktion durch Mutation der Komponenten des Signalweges und Zerstörung der Insulin-produzierenden Zellen in der larvalen Entwicklung. So konnte der beobachtete Phänotyp im adulten Tier einerseits dem Effekt einer fehlerhaften Entwicklung zugeschrieben werden und andererseits durch Fehlregulation des Stoffwechsels induziert werden. Um den Einfluss des Insulinmangels auf die Entwicklung von dem Effekt im erwachsenen Tier zu entkoppeln, sollte in dieser Arbeit die IPC-Defizienz erst spät in der Entwicklung induziert werden. Die Effekte auf die Speicherung von Nährstoffen, die Fertilität und die Lebensdauer durch Abwesenheit der Gehirn-produzierten *Drosophila* insulin-like peptides sollten einer eingehenden Betrachtung unterzogen werden. Ein weiterer Ansatz dieser Arbeit war die Suche nach Zielgenen der Insulin-Signaltransduktion. Dies sollte durch genomweite-Expressionsanalyse mittels cDNA-Microarrays erreicht werden. Die Untersuchung dieser Gene soll ermöglichen, ein besseres Verständnis der Wirkung von Insulin auf den differenzierten Organismus zu erhalten.

2 Material

2.1 Bezugsquellen für Verbrauchsmaterialien und Chemikalien

Name	Abkürzung	Bezugsquelle
β-Mercaptoethanol		Roth, Karlsruhe
3-(N-Morpholino)-propansulfonsäure	MOPS	Roth, Karlsruhe
5-Bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-galactopyranosid	X-Gal	Roth, Karlsruhe
5-Bromo-4-chloro-3-indolyl-Phosphat	X-Phos	Roth, Karlsruhe
Aceton		Roth, Karlsruhe
Agar Agar		Otto Nordwald GmbH, Hamburg
Agarose		PeqLab, Erlangen
Alexa488		Molecular Probes, Invitrogen, Karlsruhe
Ampicillin	Amp	Roth, Karlsruhe
Anti Biotin		Roche Diagnostics, Mannheim
Anti Biotin-AP Fab Fragments		Roche Diagnostics, Mannheim
Anti Biotin-POD Fab Fragments		Roche Diagnostics, Mannheim
Anti Digoxigenin		Roche Diagnostics, Mannheim
Anti Digoxigenin-AP Fab Fragments		Roche Diagnostics, Mannheim
Anti Digoxigenin-POD Fab Fragments		Roche Diagnostics, Mannheim
Anti Fluorescein		Roche Diagnostics, Mannheim
Anti Fluorescein-AP Fab Fragments		Roche Diagnostics, Mannheim
Anti Fluorescein-POD Fab Fragments		Roche Diagnostics, Mannheim
Anthron		Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Apfelsaft		verschiedene Hersteller
Bakterienplatten		Greiner Bio-One, Frickenhausen
Benzamidin		Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Bierhefe		Probio GmbH, Eggenstein
Blaukappengefäße (15 ml und 50 ml)		Greiner Bio-One, Frickenhausen
Bromphenolblau		Serva, Heidelberg
Centricon 30 Säulchen, Amicon		Millipore, Schwalbach
Chloroform	CHCl ₃	Merck, Darmstadt
Cyanin	Cy2	Jackson Immuno Research, USA

Material

Cy3-dUTP		Amersham Biosciences Europe GmbH, Freiburg
Cy5-dUTP		Amersham Biosciences Europe GmbH, Freiburg
Desoxyadenosintriphosphat	dATP	Promega, Mannheim
Desoxycytosintriphosphat	dCTP	Promega, Mannheim
Desoxyguanosintriphosphat	dGTP	Promega, Mannheim
Desoxythymidintriphosphat	dTTP	Promega, Mannheim
Diethylpyrocarbonat	DEPC	Merck, Darmstadt
DigEasy-Hyb		Roche Diagnostics Applied Science, Mannheim
Dithiotreitol; Threo-1,4-dimercapto-2,3-butandiol; Cleland's Reagenz	DTT	Gibco, Invitrogen, Karlsruhe
DNA-Längenmarker, 1 kb-Leiter		Gibco, Invitrogen, Karlsruhe
DNA-Längenmarker, 100 bp-Leiter		PeqLab, Erlangen
EDTA		Roth, Karlsruhe
EGTA		Roth, Karlsruhe
Ethanol, p.A.		Roth, Karlsruhe
Ethanol, technisch		Roth, Karlsruhe
Ethidiumbromid		Roth, Karlsruhe
Fadenagar		Probio GmbH, Eggenstein
Faltenfilter		Macherey-Nagel, Düren
Formaldehyd 37 %		Merck, Darmstadt
Formamid		Roth, Karlsruhe
Frischhefe		verschiedene Hersteller
Glutaraldehyd 25%		Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Glucose		Roth, Karlsruhe
Glycogen from bovine liver		Biochemica, Fluka, Buchs
Halocarbonöl		Voltalef, Hamburg
Hefe-Extrakt		Gibco, Invitrogen, Karlsruhe
Heparin		Gibco, Invitrogen, Karlsruhe
HEPES		Roth, Karlsruhe
Hering-Sperma Einzelstrang-DNS	ssDNS	Biochemica, Fluka, Buchs
Indocarbocyanin	Cy3	Jackson Immuno Research, USA
Indodicarbocyanin	Cy5	Jackson Immuno Research, USA

Injektionsnadeln Femtotips		Eppendorf, Hamburg
Isopropanol, 2-Propanol		Merck, Darmstadt
Kanada Balsam		Roth, Karlsruhe
Klebeband, doppelseitig		Scotch 3M, USA
Klorix (Hypochloridlösung)		Colgate-Palmolive, Heidelberg
Levamisol		Sigma-Aldrich, Taufkirchen
lineares Acrylamid		Ambion, Huntingdon, Grossbritannien
Maismehl		Friedrichstal Mühle, Stutensee
Methanol		Roth, Karlsruhe
Mowiol 40-88 (Polyvinylalkohol)		Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Natriumchlorid	NaCl	Roth, Karlsruhe
Natriumfluorid	NaF	Merck, Darmstadt
Natriumhydroxid, Plätzchen, p.A	NaOH	Roth, Karlsruhe
(tetra-)Natrium-Pyrophosphat-Decahydrat	Na ₄ P ₂ O ₇ * 10H ₂ O	Sigma-Aldrich, Taufkirchen,
Natriumsulfat	Na ₂ SO ₄	Merck, Darmstadt
Nipagin		Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Nitro Blau Tetrazoliumchlorid	NBT	Roche Diagnostics, Mannheim
Nonidet P-40		Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Nylonmembran (<i>Hybond</i>)		Amersham Biosciences Europe GmbH, Freiburg
Oligo-d(T) ₁₂₋₁₈		Amersham Biosciences Europe GmbH, Freiburg
Oligonukleotide für PCR		MWG Biotech, Ebersberg Invitrogen, Karlsruhe
ortho-Phosphorsäure 85%		Merck, Darmstadt
Phenol		Roth, Karlsruhe
Phosphat gepufferte Salzlösung	PBS	Gibco, Invitrogen, Karlsruhe
Pipettenspitzen		Corning, Schiphol-Rijk, Niederlande
Pipettenspitzen mit Filter		Corning, Schiphol-Rijk, Niederlande
Pipettenspitzen mit Filter 0,1-1 µl		Starlab GmbH, Ahrensburg
PS-Röhrchen mit Ceaprenstopfen		Greiner Bio-One, Frickenhausen
Reaktionsgefäße (1,5; 2,0 ml)		Eppendorf, Hamburg
Reaktionsgefäße (0,2 ml)		Corning, Schiphol-Rijk, Niederlande
Rinderserum-Albumin	BSA	NEB, Frankfurt

Material

RNA-Ladepuffer		Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Saccharose		Roth, Karlsruhe
Salzsäure, 37%, p.A.	HCl	Merck, Darmstadt
Schwefelsäure	H ₂ SO ₄	Merck, Darmstadt
Sojabohnenöl		Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Trehalose		Roth, Karlsruhe
Triton X-100		Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Tris(hydroxymethyl)aminomethan	Tris	Roth, Karlsruhe
TRIZOL® Reagent		Invitrogen, Karlsruhe
tRNA		Roche Diagnostics, Mannheim
Trypton, Pepton		Roth, Karlsruhe
Tween20		Roth, Karlsruhe
Vanillin		Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Zuckerrübensirup		Grafschafter Krautfabrik, Meckenheim

2.2 Bezugsquellen für Enzyme

Die meisten Enzyme wurden mit Reaktionspuffern und anderen für die Enzymaktivität benötigten Komponenten geliefert.

Name	Abkürzung	Bezugsquelle
Calf Intestine Phosphatase	CIP	NEB, Frankfurt
Desoxyribonuklease	DNaseI	Invitrogen, Karlsruhe
<i>Go-Taq</i> -Polymerase	Taq	Promega, Mannheim
Infinity™ Glucose Hexokinase Liquid stable reagent		Thermo Electron Corporation, Dreieich
Lysozym		Roche Diagnostics, Mannheim
M-MLV-Reverse Transcriptase	RT	Promega, Mannheim
Proteinase K		Roche Diagnostics, Mannheim
Restriktionsendonucleasen		Gibco, Invitrogen, Karlsruhe oder NEB, Frankfurt oder Promega, Mannheim
Ribonuklease	RNase	Promega, Mannheim
Ribonuklease Inhibitor	RNasin	Promega, Mannheim

T4 DNS-Ligase		Gibco, Invitrogen, Karlsruhe
Trehalase from porcine Kidney		Sigma – Aldrich, Taufkirchen

2.3 Bezugsquellen für Kits

Name	Bezugsquelle
Biotin RNA Labeling Kit	Roche Diagnostics, Mannheim
Centricon 30 Säulchen Amicon	Millipore, Schwalbach
CyScribe™ First-Strand cDNA Labeling Kit	Amersham Biosciences Europe GmbH, Freiburg
Digoxigenin RNA Labeling Kit	Roche Diagnostics, Mannheim
Digoxigenin Detection Kit	Roche Diagnostics, Mannheim
Fluorescein RNA Labeling Kit	Roche Diagnostics, Mannheim
MicroPoly(A)Purist™ Kit	Ambion, Huntingdon, Großbritannien
NucleoSpin® RNA II Kit	Macherey-Nagel, Düren
NucleoSpin® Extract II	Macherey-Nagel, Düren
Qiagen Plasmid Maxi Kit	Qiagen, Hilden
RC DC Protein Assay Kit	Bio-Rad, München
TOPO TA Cloning® Kit	Invitrogen, Karlsruhe
Tyramide® Amplification Kit	Perkin Elmer, Boston, USA

2.4 Bezugsquellen für Geräte

Gerät	Typ	Hersteller
Brutschrank	Perfect	Memmert, Schwabach
Brutschränke mit Schüttler	HT	Infors, Bottmingen, Schweiz
Dehrad	neoLab-Rotator	NeoLab, Heidelberg
Feinwaage	AE163	Mettler Toledo, Giessen
Gel Dokumentations System	E.A.S.Y Win32	Herolab, Wiesloch
Heizblock	QBT digital block heater	Gant, Chelmsford, Großbritannien

Material

Heizblock mit Schüttler	ThermoMixer 5436	Eppendorf, Hamburg
Homogenisator	Ultra Turrax	Ika-Werke, Staufen
Hybridisierungs-ofen	Hyboven	Amersham Biosciences Europe GmbH, Freiburg
Kühl-Brutschrank	Kühl-Brutschrank 3101	Rumed-Rubarth Apparate GmbH, Laatzen
Netzgerät für Elektrophorese	200/2.0	BioRad, Hercules, Kalifornien, USA
pH-Meter	766 Calimatic	Knick, Berlin
Photometer	BioPhotometer	Eppendorf, Hamburg
Pipetten	Pipetman	Gilson, Bad Camberg
Realtime-Cycler	ABI Prism 7000 Sequence Detection System	Applied Biosystems, Darmstadt
Robocycler	Robocycler Gradient	Stratagene, La Jolla, CA, USA
Scanner	Axon 4000 B	Axon Instruments, USA
Spektrometer	UV/VIS Spekol	Zeiss, Jena
Spektrophotometer	NanoDrop ND-1000	NanoDrop Technologies, Wilmington, Delaware, USA
Schüttler	Multi Reax	Heidolph, Nürnberg
Schüttler (groß)		Heidolph, Nürnberg
Thermocycler	PTC-200 Peltier Thermal Cycler, MJ-Research	Biozym Scientific, Oldendorf
Tischzentrifuge	Biofuge Pico	Heraeus, Hanau
Tischzentrifuge	Centrifuge 5417R	Eppendorf, Hamburg
UV-Leuchttisch		Bachofer, Reutlingen
Vortexer	Vortex Genie 2	Scientific Industries, Bohemia, New York, USA
Wasserbad		Köttermann, Hänigsen
Wasserbad	HAAKE E2	Haake, Karlsruhe
Zentrifuge	Avanti J-20	Beckman, Fullerton, Kalifornien, USA
Zentrifuge	Centricon H401	Kontron Hermle, München
Zentrifuge	Centrifuge 5810R	Eppendorf, Hamburg
Zentrifuge	Megafuge 1.0	Heraeus, Hanau

2.5 Lösungen und Medien

Name	Zusammensetzung
Anthron-Reagenz	150 ml ddH ₂ O, 380 ml H ₂ SO ₄ konz., 750 mg Anthron
AP-Puffer (alkalische Phosphatase Puffer)	100 mM NaCl, 50 mM MgCl ₂ , 100 mM Tris 9.5, 0,1 % (v/v) Tween20, 1 mM Levamisol
Apfelsaftagar	2,1 % (w/v) Agar, 25 % (v/v) Apfelsaft, 2,5 % (w/v) Sucrose, 10 mM Nipagin, 1 % (v/v) Ethanol
Blocking Reagent	5% Goat Serum in PBT
DNA-Ladepuffer (10 x)	25 % (w/v) Ficoll 400, 0,15 % (w/v) Bromphenolblau, 0,15 % (w/v) Xylen Cyanol FF alternativ: 0,25% OrangeG, 30% Glycerol
Fliegenfutter (1,5 l)	1,33 l H ₂ O, 16,5 g Bierhefe, 81,5 g Maismehl, 8 g Fadenagar, 100 ml Zuckerrübensirup, 20 ml 10% Nipagin (in 100 % Ethanol gelöst)
Hybe	50 % (v/v) Formamid, 5 x SSC, 200 µg/ml ssDNA, 100 µg/ml tRNA, 25 µg/ml Heparin, pH 5,0
Hybe-B	50 % (v/v) Formamid, 5 x SSC
Injektionspuffer	0,1 M Phosphatpuffer pH 6.8, 5 mM KCl
LB-Agar	1,5 % (w/v) Agar in LB-Medium
LB-Medium (Luria Bertani Medium)	171 mM NaCl, 1 % (w/v) Pepton 140, 0,5 % (w/v) Hefeextrakt
MOPS-Puffer (20 x)	400 mM MOPS, 100 mM NaAc, 10 mM EDTA, pH 7,0
Mowiol Einbettmedium	24 ml Glycerol, 9,6 g Mowiol, 24 ml H ₂ O, 48 ml 0,2M TrisHCl pH 8,5
PBT	0,1 % (v/v) Tween20 in PBS oder 0,1 % (v/v) TritonX in PBS
Protein Extraction Buffer	120 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl pH 7.0, 20 mM NaF, 1 mM Benzamidin, 1 mM EDTA, 1mM EGTA, 15 mM Na ₄ P ₂ O ₇ * 10H ₂ O, 1% Nonidet P-40
SSC (20 x)	3 M NaCl, 300 mM Na ₃ Citrat pH 7,0
TE-Puffer	10 mM Tris, pH 8,0, 1 mM EDTA
TBE (5 x)	445 mM Tris-Base, 520 mM H ₃ BO ₃ , 10 mM EDTA, pH 8,2
TELT-Puffer	50 mM Tris, pH 8,0, 62,5 mM EDTA, 2,5 M LiCl, 0,4 % (v/v) Triton X-100
Vanillin-Reagenz	0,6 g Vanillin, 100 ml ddH ₂ O, 400 ml Phosphorsäure
X-Gal Stammlösung	40 mg/ml in Dimethylformamid

2.6 Fliegenlinien

Linienbezeichnung	Genotyp (Chromosom)	Liniennummer / Bezugsquelle
akh-Gal4	yw;; pPTGAL-akh	Jae H. Park, Knoxville, USA
<i>D/TM3</i>	w/y;; D/TM3, Sb, Ser	eigene Linie
hugS3-Gal4	w;; pCaSpeR-hugS3	eigene Linie
InsP3-Gal4	w;; pCaSpeR-InsP3	eigene Linie
<i>sal/CyO</i>	w; sal/CyO (X; 2)	eigene Linie
TDC2-Gal4	w, pCaSpeR-TDC2, Lokalisation unbekannt	Jay Hirsh, Virginia, USA
UAS-LacZ	w; P(UAS)-lacZ.NZ	BL-3955/Bloomington
UAS- τ LacZ	yw; P (UAS-tau-lacZ.B)2	BL-5829/Bloomington
UAS-hid	Yw;; UAS-hid	Ernst Hafen, Zürich, CH
UAS- <i>rpr</i>	w; P(UAS)-rpr.C	BL-5824/Bloomington
UAS- <i>rpr/hid</i>	Yw,UAS-rpr;; UAS-hid	Ernst Hafen, Zürich, CH
Wildtyp	Oregon R-S	BL-4269/Bloomington
w^{1118}	w^{1118} (X)	BL-3605/Bloomington

2.7 Vektoren und Plasmide

Name	Klonierungsmethode oder Bezugsquelle
pCR II	pCR [®] II-TOPO-Vektor aus dem TOPO [™] TA Cloning [®] Kit
PCaSpeR-AUG-Gal4	P-Element-Vektor; L.B. Voshall, unveröffentlichte Daten, Cell 2000, Vol. 102, S.147-159
$\Delta 2,3$	Helferplasmid für P-Element-Vektor
Sym-pUAST-w	P-Element-Vektor; E. Giordano, Genetics 2002, Vol. 169. S. 637-648

2.8 Hybridisierungs-Sonden

Name	Ursprung und Anwendung
<i>CG11909</i>	pCR [®] II-TOPO linearisiert mit <i>XhoI</i> für <i>in situ</i> Hybridisierung
<i>dilp2</i>	pCR [®] II-TOPO linearisiert mit <i>BamHI</i> für <i>in situ</i> Hybridisierung
<i>dilp3</i>	pCR [®] II-TOPO linearisiert mit <i>XhoI</i> für <i>in situ</i> Hybridisierung
<i>dilp5</i>	pCR [®] II-TOPO linearisiert mit <i>BamHI</i> für <i>in situ</i> Hybridisierung

2.9 Bakterienstämme

Stamm	Genotyp oder Herstellerangabe
<i>E.coli</i> TOP10	Genotyp siehe TOPO TA Cloning Kit

2.10 RT-PCR Primer

Probe	Primer-paar	Produktgröße (bp)	Sequenzen	Zyklen	Schmelzpunkt (°C)
CG8167 <i>dilp2</i>	CG8167+ CG8167-	491	CAC ATG GTT GGT TTG GAA C CAA GCC TTT GTC CTT CAT C	35	56
CG14167 <i>dilp3</i>	CG14167+ CG14167-	355	GCA TCG AGA TGA GGT GTC GTT CTC GGC TTG GCA GC	35	56
CG33273 <i>dilp5</i>	dilp5+ dilp5-	319	GTT CCG CTC CGT GAT CC GGA GTC GCA GTA TGC CC	35	56
CG11909 für <i>in situ</i>	11909-is-F 11909-is-R	1000	GGC CAG TGG AGC GAC AGA G TGT GAG CAG GCC GTT GTT C	35	60
CG11909 <i>tobi</i>	11909-F5 11909-R5	450	CGA AAA GCC ACC AAC CAA GG CCC ACG CGC AAA AAG TAG G	20	60

2.11 Realtime RT-PCR Primer

Probe	Primer-paar	Produktgröße (bp)	Sequenzen	Zyklen	Schmelzpunkt (°C)
<i>akh</i>	aktF aktR	103	AATTGACCTTCTCGCCGGAT CATTTCTGTTGGAGGTCTTGCA	40	60
<i>dilp2</i>	dilp2+ dilp2-	150	TGC AGT TTG TCC AGG AGT TCG CTC CAC GAT TCC TTG CCG T	40	60
<i>dilp3</i>	dilp3+ dilp3-	150	CCA GGC CAC CAT GAA GTT GT TTT CCA GCA GGG AAC GGT C	40	60
<i>dilp5</i>	dilp5+ dilp5-	150	GCA CCT TGG GCC TAT TCG AT TCA ACG TGG AAA AGG AAC ACG	40	60
<i>dilp3-3</i>	dilp3-3F dilp3-3R	150	CAC CGC CGA TCA TAA GGA TTA GGC AAA CAG TTG AGG CCG T	40	60
<i>dilp3-5</i>	dilp3-5F dilp3-5R	150	TTG CCT GAA GTC GTG CAC C CGC AGT TGT CGT CAT TGG G	40	60
<i>actin</i>	actin+ actin-	150	CCC TCG TTC TTG GGA ATG G CGG TGT TGG CAT ACA GAT CCT	40	60

3 Methoden

3.1 Fliegenhaltung

Die Fliegen wurden bei 25 °C bzw. 18 °C in PS-Röhrchen auf Standardfliegenfutter gehalten. Dabei wurden sie alle drei bis vier Wochen auf frisches Fliegenfutter umgesetzt. Die gewünschte Entwicklungsgeschwindigkeit wurde durch die Wahl der Umgebungstemperatur erreicht.

Zur Sammlung von Embryonen oder Larven wurden die adulten Fliegen in Populationskäfige umgesetzt und auf Apfelsaftagar mit einem Klecks Frischhefesuspension gezogen. Um genügend Eier in einem kurzen Legezeitraum zu erhalten sollte darauf geachtet werden, junge und zahlreiche Fliegen zu verwenden. Die in einem bestimmten Zeitraum gesammelten Fliegenlarven wurden für *in situ* Hybridisierungen, für Versuche auf verschiedenen Nahrungsquellen oder für RNS-Isolierung verwendet.

3.2 Fütterungsexperimente

Für Experimente mit Larven auf verschiedenen Nahrungsbedingungen wurden Eier in einem Lege-Zeitraum von 30 min bis 2 Stunden gesammelt. Die Sammlung und die Larvalentwicklung fanden bei 25° C statt. Vor dem Ansetzen des Experiments wurden die Larven in einem Zellkulturnetz mit dH₂O von der Hefe frei gewaschen und dann mit einem Spatel auf die entsprechend behandelten Faltenfilter gesetzt. Die Faltenfilter wurden vorher mit PBS befeuchtet und mit einem Klecks der entsprechenden Nahrung versehen. Das war in den meisten Fällen mit PBS verdünnte Frischhefe, aber auch Standardfliegenfutter oder verschiedene andere protein- oder zuckerhaltige Nahrungsquellen. Im Falle eines Hungerexperimentes wurden die Tiere nur auf den befeuchteten Filter gesetzt. Bei Experimenten mit verdünnten Nahrungsmitteln (Sacharose, Hefeextrakt) wurden diese direkt mit PBS verdünnt und auf den Filter aufgetragen. Nach entsprechender Versuchszeit bei 25 °C wurden nur solche Larven für eine RNS-Isolierung benutzt, die zu diesem Zeitpunkt auf dem Filter der entsprechenden Nahrungsbedingung ausgesetzt waren bzw. in der Kontrollsituation sich in der Hefe befanden. Während Versuchen, die mehrere Stunden dauerten, wurden die Larven regelmäßig belüftet, um Sauerstoffmangel zu vermeiden. Im Unterschied zu den Larven, die in einer Petrischale gehalten werden können, wurden die

adulten Fliegen in Populationskäfigen auf die Petrischalen aufgesetzt. Bei mehrtägiger Versuchsdauer wurde der Faltenfilter hin und wieder mit ddH₂O angefeuchtet.

3.3 Phänotypische Untersuchungen an Adulten

3.3.1 Langlebigkeit

Frisch geschlüpfte adulte Gal4-UAS-Fliegen wurden in einem Zeitraum von drei bis vier Tagen gesammelt und in gleich große Gruppen aufgeteilt. Jeweils 25-35 Männchen und Weibchen wurden zusammen in Populationskäfigen auf Petrischalen mit PBS-Agar und Hefesuspension als Nahrungsquelle gesetzt. Im günstigsten Fall waren das vier Käfige pro Fliegenlinie, um statistisch relevante Daten zu erhalten. Die Platten wurden während der gesamten Dauer des Experimentes dreimal wöchentlich gewechselt. Zusätzlich musste in den ersten drei bis vier Wochen aufgrund der erhöhten Eierproduktion ein zusätzlicher Plattenwechsel am Wochenende durchgeführt werden. Dies geschah, um einen Hungerphänotyp zu vermeiden, da sonst die geschlüpften Larven die bereitgestellte Hefesuspension völlig auffraßen und die erwachsenen Tiere keine Nahrung mehr finden konnten. Die gestorbenen Männchen und Weibchen wurden dreimal wöchentlich erfasst und die Mortalität graphisch dargestellt.

3.3.2 Fruchtbarkeit

Bezüglich der Fruchtbarkeit eines Tieres wird zwischen zwei Begriffen unterschieden.

- Fekundität, die; - [lat. fecunditas] (Biol.): Fruchtbarkeit.
Die Fähigkeit, eines Organismus, sich zu reproduzieren. Eine hohe Fekundität bedeutet, Nachwuchs schnell und in hoher Zahl zu produzieren.
- Fertilität, die; - [lat. fertilitas] (Biol., Med.): Fruchtbarkeit.
Die Rate, mit der ein Organismus lebensfähigen Nachwuchs produziert. Im Gegensatz zur Fekundität wird bei der Fertilität auch die Überlebensrate des Nachwuchses berücksichtigt.

Zur Feststellung der Fekundität von adulten Fruchtfliegen wurden jeweils 5 Weibchen mit 5 Männchen verpaart und zusammen in einen Populationskäfig auf PBS-Agarplatten mit Hefesuspension gesetzt. Die Platten wurden täglich ausgetauscht und die Zahl der gelegten Eier ermittelt. Die Daten wurden auf eine einzelne Fliege berechnet und als Summendiagramm dargestellt.

Zur Feststellung der Fertilität wurde eine definierte Menge Eier gesammelt und auf eine PBS-Agarplatte mit Hefesuspension aufgebracht. Während der gesamten Entwicklungszeit wurden die prozentualen Anteile von geschlüpften Larven, Puppen und Adulten ermittelt und ebenfalls grafisch dargestellt.

3.3.3 Bestimmung des Lipid- und Glycogengehalts adulter Fruchtfliegen

Die Fruchtfliegen wurden direkt aus den Populationskäfigen in flüssigen Stickstoff gegeben. Danach wurden nur intakte Tiere ausgewählt und mit der Feinwaage gewogen. Je zwei Tiere wurden zusammen mit 500 µl 2 % Na₂SO₄-Lösung in ein 2 ml Reaktionsgefäß gegeben und mit dem elektrischen Homogenisator für 1 min zerkleinert. In einem Reagenzglas wurden 2,8 ml Chloroform/Methanol (1:1) vorgelegt und 250 µl des Homogenisats zugegeben. Danach wurde es gevortext und sofort für 10 min bei 2000 rpm in der Tischzentrifuge pelletiert. Das entstandene Pellet war Glycogen und wurde in der Anthron-Reaktion weiterverwendet. Der Überstand wurde in ein neues Reagenzglas umgegossen, mit 2 ml ddH₂O gemischt und die Phasen für 10 min bei 2000 rpm separiert. Die obere, wässrige Phase wurde abgenommen und verworfen. Sie enthält Oligosaccharide, die bei dieser Messung nicht berücksichtigt werden. Die organische Phase wurde bei 90°C im Heizblock evaporiert und danach zur Vanillin-Reaktion eingesetzt.

Vanillin-Reaktion:

Als Standard wurde eine Verdünnungsreihe einer Lipid-Stammlösung (0.1 % Sojabohnenöl in Chloroform) verwendet. Aus den Standards wurde ebenfalls das Chloroform bei 90°C evaporiert. Zur Lipid-Bestimmung wurde zu den Standards und den Proben jeweils 200 µl H₂SO₄ konz. zugegeben und für 10 min bei 90°C gekocht. Je nach Lipid-Gehalt war eine Gelbfärbung der Schwefelsäure zu bemerken. Daraufhin wurden die Reagenzgläser zum Abkühlen direkt aus dem Heizblock in ein Eis/Wasser-Gemisch gegeben. Nach erfolgter Kühlung wurden die Proben wieder auf RT gebracht und 5 ml Vanillin-Reagenz zugegeben. Hier war zu beachten, dass die Proben sehr gut gemischt wurden, damit die Farbreaktion gleichmäßig ausfiel. Nach 40 min Reaktionszeit wurde noch einmal gut gemischt und die Extinktion bei 490 nm im Spektrometer gemessen. Als Blindprobe wurde Vanillin-Reagenz verwendet.

Anthron – Reaktion:

Als Standard wurde eine Verdünnungsreihe einer Zucker-Stammlösung (0,1% Glucose in 25 % Ethanol) verwendet. Zu den Glycogen-Pellets und den Standards wurden jeweils 5 ml Anthron-Reagenz gegeben, gut gemischt und 20 min bei 90°C im

Heizblock gekocht. Zwischendurch wurde regelmäßig gemischt. Danach wurden die Proben für 10 min in Eis/Wasser-Gemisch abgekühlt und für weitere 20 min bei RT stehen gelassen. Die Messung der Extinktion erfolgte bei 620 nm im Spektrometer. Als Blindprobe wurde Anthron-Reagenz verwendet.

3.3.4 Bestimmung des Proteingehaltes adulter Fruchtfliegen

Wieder wurden die Fliegen direkt in flüssigen Stickstoff gegeben und gewogen (siehe 3.3.3). Je drei Fliegen wurden zusammen mit 300 µl Protein Extraction Buffer in ein 2 ml Reaktionsgefäß gegeben und mit dem elektrischen Homogenisator für 1-2 min zerkleinert. Das Homogenisat wurde kurz abzentrifugiert und 100 µl zur Bestimmung der Proteinkonzentration entnommen. Die Konzentration wurde mit Hilfe des RC/DC Protein Assay Kits nach Herstellerangaben bestimmt (Standard Assay Protocol). Als Standard wurde im Kit enthaltenes Rinderserum-Albumin verwendet.

3.3.5 Hämolymp-Kohlenhydrat-Bestimmung

Die Fliegen wurden kurz mit CO₂ betäubt und auf Eis gestellt. Auf einem vorgekühlten, mit Parafilm beschichteten Objektträger wurden 20-25 Fliegen aufgereiht. Dann wurde mit einer feinen Nadel der Thorax der Fliegen durchstoßen. Danach wurden sie in mit Watte gestopfte, gelochte 0,2 µl Reaktionsgefäße gegeben und diese wurden wiederum in 0,5 µl Reaktionsgefäße gesteckt. Die Hämolymp-Extraktion erfolgte bei 1500 g für 6 min bei 4°C in der Kühlzentrifuge. 0,5 µl der Hämolymphe wurden 1:20 mit ddH₂O verdünnt, um eine Koagulation zu vermeiden.

Die Messung erfolgte mit Hilfe des Glucose Assay Reagents (Sigma). Das Reagenz enthält das Enzym Glucose-Hexokinase (HK) welches die Reaktion **Glucose + ATP → Glucose-6-Phosphat + ADP** katalysiert. Ein weiteres, im Reagenz enthaltenes Enzym, Glucose-6-Phosphat Dehydrogenase (G6PDH) katalysiert die Reaktion von **Glucose-6-Phosphat + NAD → 6-Phosphogluconat + NADH**. Die NADH-Fluoreszenz kann Fluoreszenzspektrometrisch bei 360/460 nm gemessen werden.

Da der Hämolymp-Zucker von Insekten auch Trehalose (ein Disaccharid bestehend aus zwei Glucoseeinheiten) enthält, musste diese vor der Messung mit Hilfe des Enzyms Trehalase in zwei Glucosemoleküle gespalten werden.

Es wurden parallel zwei Ansätze gefahren. In dem einen wurde nur die Glucose bestimmt, in dem anderen Ansatz durch Zugabe von Trehalase (1:500) zum Reagenz der gesamte Zuckeranteil (Trehalose + Glucose). In einer 96-well Flachboden-Zellkulturplatte wurden für

die Messung pro Ansatz 100 μ l Glucose-Reagenz vorgelegt. Je 2 μ l der verdünnten Hämolymp-*Proben* wurden in das Reagenz gegeben. Nach gründlichem Mischen wurde die Reaktion über Nacht bei 37°C stehen gelassen. Am nächsten Tag erfolgte die Auswertung am Fluoreszenz-Spektrometer. Als Standards wurden Verdünnungsreihen aus 4,5 mg/ml Stammlösungen (Glucose und Trehalose) verwendet.

3.4 Genetik

3.4.1 Fliegenkreuzungen

In dieser Arbeit wurde vor allem das Gal4-UAS-System verwendet. In der Treiberlinie wurde das von der Hefe abstammende Gen *Gal4* unter der Kontrolle eines vorgeschalteten Promoterelementes eines bestimmten Gens exprimiert. Das kann zum Beispiel ein gewebespezifischer Promotor sein. Die Effektorlinie trägt das Gen von Interesse unter der Kontrolle mehrerer hintereinander geschalteter, ebenfalls von der Hefe abstammender upstream activating sequences (UAS). Aus einer Kreuzung dieser Linien gingen nun Fliegen hervor, welche beide Konstrukte trugen. Gal4 konnte nun an die UAS-Sequenz binden und die Transkription des nachgeschalteten Gens einleiten.

Um immer genügend Gal4-UAS-Fliegen für Experimente bereit zu halten, mussten ständig neue Verpaarungen angesetzt werden, da die Fertilität der Fliegenkreuzungen nach 2-3 Wochen bereits stark nachließ. Dazu wurden mehrmals täglich frisch geschlüpfte Weibchen aus den Zuchtgefäßen abgesammelt und bis zur Verpaarung 2-3 Tage später von den Männchen getrennt aufbewahrt. Wenn nach zwei bis drei Tagen keine Larven in den Fliegengefäßen zu erkennen waren, war sichergestellt, dass die gesammelten Weibchen nicht schon vorher befruchtet worden sind.

3.4.2 Erzeugung transgener Fliegen

Die in dieser Arbeit verwendete Gal4-Linie *InsP3* und die *dilp3*-RNAi-Linien wurden in der Arbeitsgruppe von PD M.J. Pankratz hergestellt. Dazu wurden die entsprechenden Sequenzen von *dilp3* in den jeweiligen P-Element Vektor eingebracht. Die verwendeten Vektoren tragen neben einem Ampicillin-Resistenzgen auch eine Kopie des *mini-white*⁺ Gens.

Die Injektion erfolgte unter Zuhilfenahme eines Helferplasmids, Δ 2-3, welches die für die Insertion des P-Elementes nötige Transposase codiert. Eingesetzt wurden 6 μ g der Konstrukt-DNS und 2 μ g des Helferplasmids. Die DNS wurde vor der Injektion mit 1/10 Vol. 3M NaAc pH6 und 1,5-fachem Volumen Ethanol 100% gefällt, zentrifugiert und mit 70%igem Ethanol

gewaschen. Das Pellet wurde getrocknet und in 20 μ l Injektionspuffer gelöst. Injiziert wurde in das posteriore Ende des Embryonen. Dort werden im Laufe der Entwicklung die Polzellen geformt, aus denen die späteren Gameten hervorgehen. So wurde die DNS in die Keimbahn der Fliege eingebracht, deren Nachkommen bei erfolgreicher Insertion transgen sind. Wichtig für die Injektion war, dass der Embryo noch im syncytialen Stadium war (bis zu 80-90 min nach Eiablage bei 25 °C), da sonst die injizierte DNS nicht mehr in die Zellen aufgenommen wurde.

Für Injektionen wurden w^{118} -Fliegen verwendet, um die erfolgreiche Insertion des P-Elementes durch w^+ -Phänotyp zu erkennen. Es wurden ca. 100 Eier bei Raumtemperatur für 30 min gesammelt. Danach wurden die Experimente in einen Raum mit 18°C durchgeführt, um die Entwicklungsgeschwindigkeit der Embryonen möglichst langsam zu gestalten. Die Eier wurden mit einem Pinsel von der Agarplatte abgesammelt, gewaschen, mit Hypochloridlösung für 3 min dechorioniert und nach weiteren Waschschritten auf einem Agarstreifen in einer Reihe nebeneinander ausgerichtet, so dass die Mikropyle auf einer Seite zu liegen kommt. Danach wurden die Eier mittels eines auf einem Deckglas aufgeklebten, doppelseitigen Klebebands abgenommen. Die Eier wurden knapp hinter dem Rand des Glases aufgeklebt, so dass die posterioren Enden der Embryonen zum Rand hin zeigen. Um den hydrostatischen Druck zu vermindern wurden sie für 5 min in eine Trockenkammer mit Kieselgel gegeben. So wurde die Wahrscheinlichkeit, dass die Embryonen beim Einführen der Injektionsnadel platzen, herabgesetzt. Um ein weiteres Austrocknen zu vermeiden, wurde mit Halocarbonöl überschichtet. So war auch der Gasaustausch weiterhin möglich. Das Deckglas wurde mit einem Tropfen Öl so auf dem Objektträger befestigt, dass das Deckglas ein wenig überstand.

Für die Injektion wurden das Eppendorf Microinjector-System und Femtotip-Injektionsnadeln verwendet. Die Nadeln wurden mit Hilfe von Microloader Tipps mit 1,5 μ l DNS beladen. Die DNS wurde vorher noch einmal kurz abzentrifugiert, um zu vermeiden, dass Staub- und Schwebeteilchen in die Injektionsnadel gelangen. Die Nadel wurde in die Halterung des Injektionsapparates eingespannt und in den Focus justiert. Die Injektionsnadel wurde vorsichtig in das Halocarbonöl abgesenkt und auf Durchlässigkeit geprüft. Die Injektionsmenge konnte durch Regulation der Druckluft bestimmt werden. Die Injektion erfolgte durch das Zubewegen der Embryonen zur Nadel.

Nach der Injektion wurden die Embryonen bis zum Schlüpfen bei 18 °C in Halocarbonöl in einer Feuchtekammer belassen und die dann geschlüpften Larven (nach zwei bis drei Tagen) auf Standardfliegenfutter gebracht. Die daraus hervorgehenden Adulten wurden einzeln mit

w^{1118} rückgekreuzt. Die F1 dieser Kreuzungen wurden nach w^+ -Fliegen durchsucht. Gingen aus einer Kreuzung transgene Tiere hervor, wurden die ersten vier Transgenen aus diesem Gefäß einzeln isoliert und mit w^{1118} rückgekreuzt, um letztendlich nach weiteren zwei Kreuzungen homozygote transgene Linien zu etablieren. Dabei konnte in den meisten Fällen aus der Intensität der Augenfärbung auf Homozygotie geschlossen werden.

3.4.3 Chromosomenlokalisierung

Nachdem ein Transgen erfolgreich in eine Fliegenlinie eingebracht und diese homozygot gekreuzt wurde, war es für nachfolgende Experimente wichtig, das Chromosom zu kennen, auf dem die Insertion stattgefunden hat. Dazu wurden Fliegenlinien verwendet, die es durch bestimmte Markergene möglich machten, eine Aussage über die Chromosomenlokalisierung des Transgens zu treffen. Diese Fliegen tragen genau definierte Balancerchromosomen.

Balancer sind künstliche Chromosomen, denen verschiedene Eigenschaften gegeben worden sind:

- durch verhinderte Rekombination werden der Balancer und sein Schwesterchromosom im Genom stabilisiert.
- Markergene; durch diese kann man das Chromosom erkennen und verfolgen
- Letale Komponente; durch diese sterben Fliegen, welche den Marker homozygot tragen, bereits während der Embryonalentwicklung

Der Balancer wird zumeist bei Genen verwendet, welche eine letale Mutation tragen. So wird der letale, homozygote Zustand verhindert, die Fliegen und alle ihre Nachkommen sind heterozygot für die Mutation. Er kann aber auch für die Lokalisation eines Transgens verwendet werden.

Die verwendeten Fliegenlinien waren entweder auf dem zweiten oder dritten Chromosom markiert:

- Chromosom 2: $w ; sal/CyO$
Wichtig war hier der Flügelmarker CyO , die Flügel sind nach oben gebogen
- Chromosom 3: $w ; ; D/TM3,Sb$
Der Sb -Marker (*stubble*) war an der Verkürzung der Thoraxborsten zu erkennen

Zusätzlich tragen diese Linien einen w^- -Marker.

In der F1-Generation war noch nicht feststellbar auf welchem Chromosom das P-Element liegt. Erst durch eine weitere Verpaarung der Fliegen untereinander, welche phänotypisch rotäugig sind und CyO^+ bzw. Sb^+ tragen konnte eine Aussage getroffen werden. In der F2-Generation kam es zu einer Verteilung von P^+/CyO^- bzw. P^+/Sb^- zu P^+/CyO^+ bzw. P^+/Sb^+ von

1:2, wenn das P-Element auf dem jeweiligen Chromosom lag. Wenn dies nicht der Fall war, kam es zu allerlei Kombinationen von Augenfarbe und Marker bzw. Wildtyp.

Insertionen auf dem X-Chromosom wurden über eine Verpaarung von transgenen Männchen mit w⁻-Weibchen nachgewiesen. Erhielt man in der F1-Generation nur weibliche transgene Nachkommen, hatte die Insertion tatsächlich auf dem X-Chromosom stattgefunden.

Das erste Chromosom ist bei *Drosophila melanogaster* im Vergleich sehr klein und die Wahrscheinlichkeit für eine Insertion sehr gering. Daher wurden nur die anderen drei Chromosomen untersucht.

3.5 Molekularbiologische und biochemische Methoden

3.5.1 Isolierung von Plasmid-DNS aus Bakterien

Plasmid-DNS wurde je nach Anforderung durch Mini-Präparation (TELT-Methode) oder Maxi-Präparation (*Qiagen Plasmid Maxi Kit*) aus Bakterien isoliert. Für die erste Überprüfung von Bakterienklonen nach Ligationen wurde eine Mini-Präparation (Minipröp) durchgeführt. Die gewünschten Bakterienkolonien wurden in 3 ml LB-Medium mit dem entsprechenden Selektions-Antibiotikum (Ampicillin 100 µg/ml) über Nacht bei 37 °C geschüttelt. 1,6 ml der Über-Nacht-Kultur wurden in ein Mikrozentrifugenröhrchen überführt und 30 sek. bei 10000 g pelletiert. Das Bakterien-Pellet wurde mit 200 µl TELT-Puffer und 20 µl Lysozymbilösung (10 mg/ml in TE) versetzt und so lange gevortext, bis es resuspendiert war. Dann wurde die Lösung 3 min bei 96 °C gekocht und 5 min auf Eis inkubiert. Die Reste aus Proteinen, Zellwand und genomischer DNS wurden (8 min, 10000 g) pelletiert. Der Überstand wurde anschließend mit 100 µl Isopropanol versetzt, gevortext und dadurch die Plasmid-DNS ausgefällt. Nach 5 min Zentrifugation (10000 g) konnte das DNS-Pellet mit 70 % Ethanol gewaschen, erneut abzentrifugiert und getrocknet werden. Die Plasmid-DNS wurde dann in 50 µl dH₂O gelöst. 5 bis 10 µl dieser Minipröp-DNS konnten dann für Restriktionsverdau verwendet werden. Positive Klone wurden erneut selektiv ausplattiert (aus der 3 ml Über-Nacht-Kultur) und bei 37°C über Nacht inkubiert.

Wurden für spezielle Applikationen größere Mengen oder höhere Reinheit (z.B. Sequenzierung) der Plasmid-DNS benötigt, wurden Maxi-Präparationen mit dem *Qiagen Plasmid Maxi Kit* durchgeführt. Aus 200 ml Bakterienkulturen, die in selektivem LB-Medium mit dem gewünschten Klon angeimpft und über Nacht bei 37 °C geschüttelt wurden, erfolgte die Plasmid-DNS-Isolierung nach Herstellerangaben (*QIAGEN Plasmid Purification Handbook: Qiagen Maxi Protocol*).

3.5.2 Isolierung von genomischer DNS

Für die Untersuchung von genomischen Bereichen die außerhalb der Exons liegen, wurde eine PCR an genomischer DNS durchgeführt. Diese kann direkt aus Gewebe isoliert werden. Zunächst wurden Larven, Puppen und Embryonen gesammelt, mit dH₂O gewaschen und in 200 µl Lösung A überführt. Die Homogenisierung erfolgte mit einem elektrischen mechanischen Homogenisator. Das Homogenat wurde bei 70°C für 20-30 min inkubiert. Nach Zugabe von 14 µl 8M KOAc-Lösung wurde für 30 min auf Eis inkubiert. Danach wurden gefällte Proteine und Gewebsreste für 15 min bei RT abzentrifugiert. Aus dem Überstand wurde die DNS mit dem 1,5-fachen Volumen an Isopropanol ausgefällt und 5 min bei 13000 rpm pelletiert. Nach zweimaligem Waschen mit 70% Ethanol wurde das Pellet getrocknet und in 50 µl ddH₂O gelöst. Die resuspendierte DNS wurde auf Reinheit und Konzentration spektralphotometrisch untersucht.

3.5.3 Isolierung von RNS aus *Drosophila*-Larven

Gesamt-RNS aus Larven wurde mit dem *NucleoSpin*[®] *RNA II Kit* (bis zu 70 mg Gewebe) von Macherey-Nagel nach Herstellerangaben (*Standard protocol for isolation of total RNA*) isoliert. Die entsprechende Menge Embryonen oder Larven wurden vor der Homogenisierung in Zellkulturnetzen gewaschen, in Lysis-Puffer (im Kit enthalten) überführt und elektrisch mechanisch homogenisiert. Die Menge an isolierter Gesamt-RNS wird spektralphotometrisch ermittelt (Nanodrop). Die so gewonnene Gesamt-RNS wurde für die Reverse-Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR) verwendet. Der Einsatz in RT-PCRs war durch eine im *NucleoSpin*[®]-Isolierungs-Protokoll enthaltene DNaseI-Behandlung möglich.

Zusätzlich konnte ein weiterer DNaseI-Verdau (*Deoxyribonuclease I Amplification Grade, Invitrogen*) mit anschließender Phenol-Chloroform-Extraktion (3.5.4) durchgeführt werden. 4 µg RNS wurden mit 2 µl DNaseI in 10 µl DNaseI-Puffer in einem Endvolumen von 100 µl für 10 min bei 25°C verdaut. Darauf folgte für 5 min ein Inaktivierungsschritt bei 75 °C.

Für die Realtime RT-PCR von Larven-Samples wurde Poly-A⁺-RNS verwendet. Die Isolierung von Poly-A⁺-RNS aus Gesamt-RNS wurde mit dem *Qiagen Oligotex mRNA Kit* nach Herstellerangaben (*Oligotex Handbook: Oligotex mRNA Spin-Column Protocol*) durchgeführt. Da mit sehr geringen Mengen gearbeitet wurde und nicht genug Material für Messung und Versuch vorhanden war, konnte die Menge der erhaltenen RNS aufgrund der eingesetzten Menge Gesamt-RNS abgeschätzt werden. (1-2% Ausbeute)

Die Extraktion von RNS aus adulten Fliegen wurde nach der Trizol-Methode (3.5.5) durchgeführt, da die Ausbeute mit oben genannter Methode zu gering ausfiel.

3.5.4 Phenol-Chloroform-Extraktion von RNS

Der aufzureinigende Reaktionsmix aus dem DNase-Verdau wurde mit 200 µl ddH₂O, je 100 µl Chloroform und Phenol gemischt, 5 min bei 13000 rpm zentrifugiert und die wässrige, obere Phase abgenommen. Danach wurde noch zweimal mit 100 µl Chloroform gewaschen, gevortext und zentrifugiert. Zum Fällern wurde die einfache Menge Isopropanol, 1/10 Volumen Natriumacetat pH 6 und 1 µl lineares Acrylamid (*Ambion*) als Fällungshilfe verwendet. Es wurde über Nacht bei -20°C gefällt, um eine möglichst hohe Ausbeute zu erreichen. Am darauffolgenden Tag wurde für 30 min bei 14000 rpm bei 4°C zentrifugiert. Das Pellet wurde zweimal mit 70%igen Ethanol gewaschen und dann kurz getrocknet. Das Pellet wurde in 15 µl ddH₂O gelöst. Die RNS kann nun direkt für die RT-PCR verwendet werden.

3.5.5 Trizol-Extraktion von Gesamt-RNS aus adulten Fruchtfliegen

Bei adulten Fliegen wurde die Trizol-Extraktion zur RNS-Gewinnung angewendet, da sie eine höhere Ausbeute ermöglicht. Die Fliegen wurden direkt in flüssigem Stickstoff abgetötet. Nachdem der Stickstoff abgedampft war, konnten die Fliegen entweder bei -80°C aufbewahrt oder direkt weiterverarbeitet werden.

In 2 ml Reaktionsgefäßen wurden 400 µl Trizol Reagenz (Invitrogen) vorgelegt und die „kalten“ Fliegen dazugegeben. Die Homogenisierung erfolgte mit einem elektrischen Homogenisator für ca. 3 min. Die Suspension wurde mit weiteren 600 µl Trizol verdünnt und für 5 min bei RT stengelassen. Danach wurde zu den Proben 200 µl Chloroform zugegeben und für 15 sek in der Hand geschüttelt. Nach weiteren 3 min bei RT wurden die Phasen bei 12000 g für 20 min bei 4°C getrennt. Die obere, wässrige Phase wurde in ein frisches 1,5 ml Reaktionsgefäß transferiert, 500 µl Isopropanol zugegeben, gemischt und 10 min bei RT stengelassen. Die Fällung erfolgte bei 4°C und 12000 g für 10 min in der Kühlzentrifuge. Danach wurde der Überstand abgenommen, das Pellet mit 70% Ethanol gewaschen und erneut abzentrifugiert. Das Pellet wurde getrocknet und je nach RNS-Menge mit bis zu 250 µl ddH₂O gelöst. Das Pellet wurde über Nacht im Kühlschrank quellen gelassen, danach gevortext und der RNS-Gehalt der Lösung spektralphotometrisch bestimmt. Die so gewonnene Gesamt-RNS konnte nun für die cDNA-Synthese oder für die mRNS-Extraktion eingesetzt werden.

3.5.6 mRNS-Extraktion aus Gesamt-RNS für den Einsatz bei Microarrays

mRNS (Boten-RNS) wurde mittels des MicroPoly(A)-Purist™-Kits aus Gesamt-RNS isoliert. Pro Ansatz wurden bis zu 250 µg Gesamt-RNS verwendet. Die Durchführung erfolgte nach Herstellerangaben. Die Konzentration und Qualität der Gesamt-RNS und mRNS wurden spektralphotometrisch bestimmt. Zusätzlich wurde die RNS auch durch Agarosegel-Elektrophorese auf Degradation hin untersucht. Hierbei mussten die Proben vorher denaturiert werden. Dazu wurden sie in 10 µl Ansätzen mit 1 µl RNS, 3 µl RNS-Ladepuffer (2-5-fach) für 10 min bei 70°C denaturiert, auf Eis schockgekühlt und auf das Gel aufgetragen. Als Marker wurde die Test-RNS aus dem cDNA-Labeling Kit von Amersham verwendet.

3.5.7 Restriktionsverdau von DNS

Für den Verdau von 1 µg DNS wurden abhängig vom jeweiligen Enzym fünf bis 20 Enzymeinheiten (Units, eine Unit entspricht der Enzymmenge, die in einer Stunde 1 µg DNS des Phagen Lambda bei optimaler Temperatur-und Pufferbedingung vollständig verdaut) verwendet. Das Reaktionsvolumen betrug dabei mindestens das Zwanzigfache des Volumens der zugesetzten Enzym/Glycerin-Lösung und die Inkubationszeit ein bis zwei Stunden bei optimaler Reaktionstemperatur (37°C) und idealen Pufferbedingungen (eingestellt mit dem Puffersystem des jeweiligen Anbieters). Bei Plasmid-DNS aus Minipräps wurde nach der Fraktionierung durch die Verdaureaktion 1 µg/µl RNaseA zugesetzt, wenn das Insert kleiner als 700 bp war. Dadurch wurde die Bande auf dem Gel klarer, da sie nicht durch RNS maskiert war. Nach Zugabe von DNS-Ladepuffer (1x) wurde die Verdaulösung zur Größenbestimmung und Reinigung der Fragmente in einem DNS-Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt.

3.5.8 Agarosegel-Elektrophorese

Je nach Größe der aufzutrennenden DNS-Fragmente wurden 0,8-2 % Agarose in 0,5 x TBE gelöst und 0,4 µg/ml Ethidiumbromid zugesetzt. Die DNS-Proben wurden in DNS-Ladepuffer geladen. Die Auftrennung erfolgte je nach Gelgröße bei 30-150 V. Danach konnten die DNS-Fragmente in einem Gel-Dokumentations-System (E.A.S.Y Win32) mittels UV-Fluoreszenz sichtbar gemacht und dokumentiert werden.

Im Fall von RNS-Proben wird statt TBE-Puffer MOPS-Puffer verwendet.

3.5.9 Isolierung von DNS-Fragmenten aus Agarosegelen

Nach Identifizierung der interessierenden DNS-Bande unter UV-Licht wurde diese mit einem Skalpell ausgeschnitten. Die Extraktion der DNS aus dem Gel erfolgte mit dem NucleoSpin[®] Extract II Kit. Die Extraktion erfolgte nach Herstellerangaben (*Protocol for gel extraction*). Die Extraktions-Effizienz und Konzentration der Eluate wurden danach auf einem DNS-Agarosegel überprüft.

Wahlweise konnten die Fragmente auch aus dem Gel ausgeschleudert werden, z.B. für TOPO Cloning. Dazu wurde das Gelstück ausgeschnitten, in ein mit Watte gestopft und gelochtes Reaktionsgefäß (0,5 µl) gegeben. Dieses wurde in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß gebracht. Dann wurde für 1-2 min bei 14000 rpm zentrifugiert. Das Eluat konnte nach der Konzentrationsbestimmung direkt zur Klonierung verwendet werden.

3.5.10 Klonierung und Transformation von DNS

Dem Verdau eines Vektors folgte eine 5'-Dephosphorylierung durch *Calf intestinal Alkaline Phosphatase* (CIP), um die Religation des Vektors zu verhindern. Die Dephosphorylierungsreaktion wurde mit 1 U Phosphatase pro µg Vektor bei idealen Pufferbedingungen (Herstellerangaben) angesetzt und für 1 h bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde das Enzym bei 70 °C für 20 min inaktiviert und danach die Vektor-DNS gefällt. Dafür wurde die Lösung mit 1/10 Volumen NaAc (0.3 M NaAc, pH 6,0) und mit dem 1,5-fachen Volumen an 100% Ethanol versetzt, gemischt und zentrifugiert (10000 g). Das DNS-Pellet wurde getrocknet und in ddH₂O gelöst. Insertfragmente wurden nach dem Verdau in einem Agarosegel gereinigt und dann extrahiert.

Vor der Ligation wurde die Konzentration der gefällten Vektor-DNS und der Insert-DNS auf einem Agarosegel verglichen. Für die Ligation wurde ein drei- bis fünffacher molarer Überschuss des zu inserierenden DNS-Fragments zum entsprechend vorbereiteten Vektor gegeben. Mit 400 U T4 DNA-Ligase wurde in einem Endvolumen von 20 µl 1 x T4 DNA-Ligase-Puffer entweder über Nacht bei 18 °C oder 4 h bei Raumtemperatur inkubiert.

Für eine Transformation wurde pro Volumen Plasmid-DNS (5-10 ng/µl) das 20- bis 40-fache Volumen an kompetenten Bakterien verwendet. Plasmid und Bakterien wurden 20 min auf Eis inkubiert, 2 min einem 42 °C Hitzeschock unterzogen und erneut auf Eis gestellt. Um je nach Bedarf eine Resistenz gegen Antibiotika zu entwickeln, wurden die transformierten Bakterien in 2- bis 4-fachem Volumen LB-Medium 30 bis 60 min bei 37 °C leicht schüttelnd inkubiert, bevor sie auf LB-Agar ausgestrichen wurden. Die LB-Agar-Platten wurden mit

Ampicillin (100 µg/ml) versetzt und mit 4 % X-Gal-DMSO-Lösung (für Blau-Weiß Selektion) bestrichen. Nach dem Trocknen der Bakteriensuspension wurden die Platten mit der Oberseite nach unten bei 37 °C 12 bis 24 h inkubiert.

Die Klonierung von PCR-Produkten (mit *Taq* Polymerase) erfolgte mit dem *TOPO TA Cloning*[®] Kit nach Herstellerangaben (*TOPO TA Cloning*[®] Version N: *TOPO*[®] Cloning Reaction and Transformation).

3.5.11 Chemisch kompetente Bakterien

Um chemisch kompetente Bakterien herzustellen, wurden 2 ml einer Über-Nacht-Kultur des gewünschten *E.coli*-Stammes zu 200 ml LB-Medium gegeben und bis OD₆₀₀ = 0,5 wachsen gelassen (Schüttler, 37 °C). Dann wurden je 100 ml Bakterien 10 min bei 800 g und 4 °C zentrifugiert und das Bakterienpellet auf Eis vorsichtig in je 25 ml steril filtrierter auf 4 °C vorgekühlter 0,1 M CaCl₂-Lösung (frisch angesetzt) resuspendiert und 1 h auf Eis gestellt. Anschließend wurde erneut zentrifugiert (10 min, 4 °C, 800 g), das Bakteriensediment auf Eis mit je 6 ml 0,1 M CaCl₂-Lösung (vorbehandelt wie oben) resuspendiert und mit je 1,5 ml Glycerin versehen und vorsichtig gemischt. Diese Bakterien wurden entweder direkt zur Transformation eingesetzt oder in vorgekühlte Gefäße aliquotiert, mit flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C aufbewahrt.

3.5.12 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Abschnitte von genomischer *Drosophila*-DNS oder *Drosophila*-cDNS wurden mit Hilfe der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) isoliert und amplifiziert. Pro Ansatz wurden in 25 µl Volumen 200 µM dNTP-Mix, 1 x PCR-Puffer, 1 U *Taq*-Polymerase, 10-100 ng Template-DNS und je 1 µM Vorwärts-Primer (Primer+) und Rückwärts-Primer (Primer-) eingesetzt. Für jedes Primerpaar wurde auch eine Reaktion ohne Template-DNS angesetzt, um zu testen, ob Reagenzien mit Fremd-DNS kontaminiert waren (H₂O-Kontrolle). Die PCR-Temperaturprofile wurden je nach Primerpaarung und PCR-Produktgröße festgelegt. Gestartet wurde mit einem Denaturierungsschritt (3 min 94 °C), gefolgt von 30 bis 35 Zyklen erstens 30 sek 94 °C (DNS-Denaturierung), zweitens 30 sek Annealingtemperatur (4 °C unter dem Schmelzpunkt der Primer) und drittens pro 1 kb PCR-Produktgröße 1 min 72 °C (optimale Temperatur für die *Taq*-Polymerase-Aktivität). Abschließend wurde die Reaktion erneut abhängig von der Produktgröße 5 bis 15 min bei 72 °C inkubiert und dann bis zur Weiterverarbeitung auf 4 oder 8 °C abgekühlt. Die Überprüfung der PCR erfolgte durch

Gelelektrophorese. Die PCR-Reaktionen wurden in einem *PTC-200 Peltier Thermal Cycler* durchgeführt.

3.5.13 Reverse-Transkriptase-PCR (RT-PCR)

Die reverse Transkription (Erststrang-Synthese) von mRNA zu cDNA erfolgte mit der *SuperScriptTM II RNase H Reverse Transcriptase* (RT) bzw. der *M-MLV-Reverse Transcriptase*. Pro Reaktion wurde 1 µg Gesamt-RNS eingesetzt. Für jede neu isolierte RNS wurde außerdem eine Reaktion ohne RT (-RT-Kontrolle) angesetzt, um zu testen, ob die Gesamt-RNS trotz DnaseI-Behandlung mit genomischer DNA kontaminiert war. Zur Gesamt-RNS wurde pro Ansatz 1 µl 500 ng/µl Oligo(dT)₁₂₋₁₈ in 11,5 µl Volumen nukleasefreiem H₂O (12,5 µl Volumen in RT-Kontrollen) gegeben und 10 min bei 72 °C und 5 min bei 4 °C inkubiert. Dann wurden pro Ansatz 4 µl 5 x *First-Strand Buffer* (mitgeliefert zur RT), 2 µl 0,1 M DTT, 1 µl 10 mM dNTP-Mix, 0,5 µl RNasin (40 U/µl) und 1 µl RT (200 U/µl) zugegeben. Die Reaktion erfolgte 50 min bei 42 °C mit anschließender RT-Inaktivierung (15 min, 75 °C). Die gewonnene cDNA wurde in einem Endvolumen von 100 µl aufgenommen. Von dieser cDNA-Lösung konnten jeweils 5 µl als Template-DNA in PCRs verwendet werden. Diese PCRs wurden in 25 µl Reaktionsvolumen durchgeführt. Je nach verwendetem Primerpaar variierte die Anzahl an Zyklen und die Annealingtemperatur. Nach einer PCR konnte die DNA in einer Gelelektrophorese semiquantitativ analysiert werden.

Im Fall einer reversen Transkription von mRNA wurden 100 ng als Template angesetzt und von der resultierenden cDNA Lösung wurde 1 µl als Template-DNA in der PCR-Reaktion verwendet.

3.5.14 Realtime-RT-PCR

Um die Unterschiede von mRNA-Levels detaillierter zu untersuchen, konnte eine Realtime-RT-PCR durchgeführt werden. Es wurden Primer benötigt, die ein 100 –200 bp großes Stück aus den zu untersuchenden Genen amplifizieren und eine Schmelztemperatur von 60°C haben. Zum Finden dieser Primer wurde die *ABI-Prism Primer ExpressTM 1.5a*-Software verwendet. Als interne Kontrolle wurde Actin gewählt. In dem verwendeten Primer-Mix (*SYBR-Green PCR Master Mix, Applied Biosystems*) war ein Fluoreszenzfarbstoff (*SYBR-Green*) enthalten, der in die DNA interkaliert. So konnte die Menge an DNA von der Realtime-RT-PCR-Maschine (*ABI Prism 7000 Sequence Detection System, Applied Biosystems*) gemessen werden. Pro Ansatz wurden 2 µl Primermix (10 µM), 12,5 µl *SYBR-*

Green Master Mix und 5,5 µl nukleasefreies H₂O verwendet. Es wurden 40 Zyklen gefahren. Die Auswertung erfolgte mit der *ABI-Prism 7000*-Software und mit *Microsoft Excel*.

Es wurden Mehrfachbestimmungen durchgeführt; jeder Ansatz wurde dreimal für die Reaktion eingesetzt. Die Rohdaten (CT, Counts) repräsentierten die Anzahl der Zyklen, die bis zum Erreichen des Schwellenwertes benötigt wurden. Danach wurden alle Werte gemittelt, mit der Actinkontrolle normalisiert (dCT) wie im Handbuch des *ABI Prism 7000 Sequence Detection Systems* angegeben. Die erhaltenen Werte wurden mit der Normalkontrolle normalisiert. Die resultierenden Werte (ddCT) wurden in die Funktion 2^{-x} eingesetzt (2^{-ddCT}) um die x-fache Änderung der Expressionslevels bezüglich der gleich 1 gesetzten Kontrolle zu erhalten. Die Experimente wurden je dreimal wiederholt, um eine statistisch relevante Aussage treffen zu können.

3.5.15 Herstellung von Digoxigenin-markierten RNS-Sonden

Für *in situ* Hybridisierungen wurden Digoxigenin-markierte Gegensinn-RNS-Sonden verwendet. Dazu wurde das Plasmid, das die entsprechende DNS-Probe enthält, mit einem Restriktionsenzym linearisiert. Die Schnittstelle wurde dabei so gewählt, dass entweder mittels einer SP6-RNS-Polymerase oder einer T7-RNS-Polymerase eine markierte Gegensinn-RNS transkribiert werden konnte. Zur Aufreinigung des linearisierten Plasmids wurde das NucleoSpin[®] Extract II Kit verwendet. Die Durchführung erfolgte nach Herstellerprotokoll (*Support protocol for concentration, desalination, removal of enzymes*). 1 µg des gereinigten, linearisierten Plasmids wurde im *Dig RNA Labeling Kit* nach Herstellerangaben eingesetzt. Die Reinigung der Dig-RNS-Sonde erfolgte mit dem *NucleoSpin[®] RNA II Kit (Clean-up of RNA from reaction mixtures)*. Die Dig-RNS-Sonde wurde mit 160 µl Hybe-Puffer versehen und bei -20 °C gelagert.

Ebenso erfolgte die Herstellung von Fluorescein- und Biotin-markierten Sonden mit den jeweiligen Labeling Kits.

3.6 cDNS-Microarrays

Die in dieser Arbeit verwendeten cDNS-Microarrays wurden am Forschungszentrum Karlsruhe etabliert (Bauer 2004; Katzenberger 2004; Hamm 2005). Die Microarrays enthalten 13.829 Fragmente offener Leseraster des *Drosophila*-Genoms. Die Methode des Microarrays beruht darauf, dass die mRNS-Expressionslevels zweier verschiedener Zustände miteinander verglichen werden. Dazu wird die mRNS unter Zugabe fluoreszenz-markierter Basenanaloga

in cDNS umgeschrieben. Dabei wird Zustand A mit einem anderen Fluoreszenzfarbstoff markiert als Zustand B. Die cDNS der beiden Zustände werden in gleichen Anteilen gemischt, und auf einen cDNS-Microarray hybridisiert. Nun kann man anhand des Verhältnisses der beiden Fluoreszenzen zueinander ablesen, ob ein Gen von Zustand A im Vergleich zu Zustand B unterschiedlich exprimiert wird.

3.6.1 Herstellung Cy3/Cy5-markierter cDNS Sonden

Die Herstellung fluoreszenzmarkierter cDNA-Sonden erfolgte mit dem CyScribe™ First-Strand cDNA Labeling Kit. Im Grunde basiert es auf dem gleichen Prinzip wie die Herstellung Digoxigenin-markierter Sonden, nur dass in diesem Fall die Fluoreszenzfarbstoffe Cy3 und Cy5 an die verwendeten dUTP-Moleküle gekoppelt sind. Pro Reaktion wurde 1,0-1,5 µg mRNA eingesetzt. Die Labeling-Reaktion erfolgte nach Herstellerangaben mit Ausnahme der Probenaufreinigung.

Nach der Degradation der mRNA wurde die cDNS mit 1 x TE-Puffer pH 7,5 auf 500 µl aufgefüllt und zur Aufreinigung auf Centricon-30 Säulchen (Amicon, Millipore) gegeben. Um die Proben einzuengen, wurde bei 8000 g für 12 min zentrifugiert. Um die Probe zu eluieren, wurde die Säule umgekehrt auf ein neues Reaktionsgefäß gesteckt und für 4 min bei 8000 g zentrifugiert. Die Proben wurden in 200 µl TE-Puffer aufgenommen, die korrespondierenden Cy3- und Cy5-Proben (diejenigen, die auf dem Microarray miteinander verglichen werden sollen) miteinander vereinigt, und erneut auf einer Säule bis auf weniger als 16 µl eingengt. Erneut wurde die Säule umgedreht, zentrifugiert, und das Eluat mit TE-Puffer auf 16,5 µl gebracht. Zur spektralphotometrischen Messung wurden 1,5 µl eingesetzt.

3.6.2 Hybridisierung der Microarrays

Nachdem die Effizienz des Labelings mit Hilfe des Spektralphotometers festgestellt wurde, konnten die Proben zur Hybridisierung mit den Microarrays weiterverarbeitet werden.

Zunächst wurden die Proben für 2-5 min bei 95° C denaturiert, auf Eis für 2 min gekühlt, und dann für 5 min bei RT stehen gelassen. Nach der Zugabe von 15 µl 2x Hybridisierungspuffer (DigEasy Hyb, auf 42° C vorgewärmt) wurde durch Auf- und Abpipettieren gut gemischt und in mehreren Tröpfchen auf dem Microarray verteilt. Ein Deckglas (20 x 60 mm) wurde vorsichtig so auf den Microarray gebracht, dass keine Luftblasen entstanden, und der bedruckte Teil des Arrays vollständig mit Hybridisierungslösung bedeckt war. Je zwei Microarrays wurden für 16-18 h in einer gut verschlossenen Hybridisierungskammer in einem Hybridisierungsofen (Hyboven, Amersham) bei 42°C inkubiert. Das Filterpapier in der

Hybridisierungskammer wurde vorher mit 150 ml ddH₂O benetzt, um die Luft in der Kammer feucht zu halten und das Austrocknen der Hybridisierungslösung zu verhindern.

3.6.3 Waschen der Microarrays

Um die überschüssige, nicht gebundene Probe zu entfernen, wurden die Microarrays mehreren Waschschritten unterzogen.

Folgende Waschlösungen wurden benötigt:

Puffer 1: 2x SSC / 0,1% SDS

Puffer 2: 0,1 x SSC / 0,1 % SDS

Puffer 3: 0,1 x SSC

Puffer 4: 0.01 x SSC

Die Microarrays wurden aus der Hybridisierungskammer genommen und in einen Objektträgerhalter aus Glas eingesetzt in dem sie für die gesamte Waschprozedur blieben. Die verwendeten Waschlösungen wurden in Waschschalen vorgelegt und der Halter in die Lösung eingetaucht. Während des gesamten Waschvorgangs war es erforderlich, zügig zu arbeiten, um ein Trockenfallen der Arrays zu vermeiden, da dies zu Artefakten führen konnte. Im ersten Waschschrift wurde auf 42° C vorgewärmter Puffer 1 verwendet und die Deckgläschen durch Auf- und Abbewegen des Halters abgelöst. Danach wurde er noch einmal in ebenfalls vorgewärmten Puffer 1 gebracht und für 5 min bei 42° C im Hybridisierungssofen stehengelassen. Danach folgte ein zehnminütiger Waschschrift mit Puffer 2 bei RT auf einem Schüttler. Danach wurde noch viermal mit Puffer 3 für je 1 min gewaschen. Diese kürzeren Waschschriffe konnten ebenfalls auf einem Schüttler durchgeführt werden oder auch manuell durch Auf- Abbewegen des Halters in der Waschlösung. Zum Abschluss wurde der Halter noch einmal kurz in Puffer 4 gespült, und der gesamte Objektträgerhalter bei 800 rpm für 7 min in der Tischzentrifuge trocken geschleudert. Wahlweise konnten die Microarrays mittels Druckluft trocken gepustet werden.

3.6.4 Auswertung der Microarrays

Zur Auswertung der Arrays mussten sie zunächst mittels eines Scanners detektiert und danach digitalisiert werden. Der verwendete Laser-Scanner Axon 400 B (Axon Instruments) arbeitet mit zwei unterschiedlichen Wellenlängen, 532 nm und 635 nm. Das Absorptionsmaximum von Cy3 liegt bei 550 nm, das von Cy5 bei 649 nm. Beim Scanvorgang musste darauf geachtet werden, dass die Intensitäten der Signale gleich stark sind, dies wurde während dem Scannen manuell eingeregelt. Nach Detektion der Fluoreszenzsignale wurde

deren Abbild von der Software GENEPIX als Bild dargestellt. Signale, die von Cy3 stammen, wurden in grüner Farbe angezeigt und diejenigen von Cy5 in roter Farbe. Im Überlagerungsbild entstand nun an den Stellen, an denen Signale von beiden Cy-Farbstoffen detektiert wurden, ein gelbes Signal. So konnten auf einem Microarray sowohl unterschiedlich starke Rot- und Grüntöne wie auch verschiedene Gelbtöne beobachtet werden. Weiße Signale entstanden, wenn die gemessene Intensität direkt an oder über dem Maximalwert der Skala lag. Die Intensitäten der Spots wurden ausgewertet und als Zahlen dargestellt. Die mit GENEPIX ermittelten Daten wurden zur weiteren Auswertung mit dem Programm KAMAAN bearbeitet. KAMAAN wurde von Herrn Dr.-Ing. Jens Jäkel am Institut für angewandte Informatik (FZK) in Kooperation entworfen (Jäkel 2003). Dieses Programm wendete bestimmte Kriterien an, um die Qualität der Spots beurteilen zu können. Weiterhin wurden die Daten mit diesem Programm normalisiert und statistisch bewertet. Die erhaltenen Daten wurden mittels des Programms FILEMAKER Pro 5 (Filemaker GmbH) in Datenbanken eingeführt, die eine gezielte Betrachtung der Daten durch Sortieren und bestimmte Auswahlkriterien ermöglichten. Außerdem konnten die Daten von dort in andere Dateiformate wie z.B. Microsoft Excel exportiert werden.

3.7 Immunhistochemische- und Fluoreszenz-Färbungen

3.7.1 Dotblot

Um die Effizienz der Digoxigenin- bzw. Biotin oder Fluorescein-Inkorporation (siehe 3.5.15) zu testen, wurde ein Dotblot durchgeführt.

Auf eine Nylonmembran (*HybondN, Amersham*) wurde je 1 µl einer Verdünnungsreihe (1:1, 1:10, 1:50, 1:100, 1:500) der in Hybe gelösten Sonde aufgetragen und getrocknet. Die nachfolgenden Schritte wurden in einem 2 ml Reaktionsgefäß unter Rotation auf einem Drehrad durchgeführt. Danach wurde sie 30 min in Hybe geblockt, mit Hybe-B 5 min gewaschen und 10 min in Blocking Puffer (5% Goat Serum in PBT) auf die Antikörperbehandlung vorbereitet. Der Antikörper, je nach zu untersuchender Probe Anti-Digoxigenin-AP, Anti-Biotin-AP, Anti-Fluorescein-AP wurde in Blockingpuffer 1:2000 gelöst und die Probe damit 30 min inkubiert. Danach wurde dreimal mit PBT (0,1% Tween in PBS) gewaschen, in AP-Puffer überführt, 5 min gewaschen und mit 4,5 µl NBT und 3,5 µl X-Phos in 1 ml PBT 2-10 min gefärbt. Die Farbreaktion wurde durch Waschen mit PBT gestoppt, danach konnte die Membran an der Luft getrocknet und ausgewertet werden.

3.7.2 *in situ* Hybridisierung

Die räumliche und zeitliche Verteilung von Transkripten während der Larvalentwicklung von *Drosophila* wurde durch *in situ* Hybridisierungen an dissektierten Larven des zweiten und dritten Larvenstadiums untersucht.

Für Gehirnfärbungen konnten zwei Strategien angewendet werden. Entweder wurden die Gehirne vorher frei präpariert, wobei darauf geachtet wurde, dass die Mundhaken nicht entfernt wurden. Die Mundhaken bewirkten durch ihr Gewicht ein leichteres Absinken der Gehirne in der Lösung und verkürzten die Wartezeiten bei Medienwechseln. Zusätzlich verminderten sie das Risiko, die Gehirne während der Prozedur zu verlieren. Nach der Fixierung (1h 4% Formaldehyd in PBT) wurden sie ausgiebig mit PBT gewaschen, schrittweise in Methanol überführt und dort bei -20° C über Nacht belassen. Alternativ konnte auch die ganze Larve, welche vorher präparativ geöffnet wurde, fixiert werden. In diesem Fall entfiel der Methanolschritt.

Soweit nicht anders erwähnt, wurden alle folgenden Schritte unter Rotieren auf einem Drehrad bei RT durchgeführt. Die Larven wurden nach viermaligem Waschen mit PBT für 3 min mit Proteinase K (20 µg/ml in PBT) behandelt. Die Reaktion wurde sofort durch zweimaliges Waschen in PBT gestoppt. Danach erfolgte eine Refixierung in 4 % Formaldehyd (in PBT) für 20 min und erneutes viermaliges Waschen in PBT. Die Gehirne wurden nicht mit Proteinase verdaut, sondern ausführlich gewaschen, um das Methanol zu entfernen. Nun wurden die Präparate schrittweise über Hybe-B in Hybe überführt (1:1 PBT:Hybe-B, Hybe-B bei 65 °C, 1:1 HybeB:Hybe bei 65 °C, 1 h Hybe bei 65 °C). Nach Abnahme des Überstandes wurden die Gerhirne/Larven im verbleibenden Volumen über Nacht bei 65 °C mit 1 µl Dig-RNA-Sonde hybridisiert. Anschließend wurden die Präparate wieder schrittweise in PBT überführt (Hybe bei 65 °C, zweimal Hybe-B je 15 min bei 65 °C, 1:1 PBT:Hybe-B, PBT bei RT). Nach fünfmaligem Waschen in PBT erfolgte die Signaldetektion durch einstündige Inkubation mit anti-Digoxigenin-alkalische-Phosphatase-Konjugat (1:2000 in PBT, *Digoxigenin Detection Kit*) in 5% Goat Serum in PBS. Im Falle von Fluorescein bzw. Biotin wurden die entsprechenden AP-gekoppelten Antikörper benutzt. Erneut wurde fünfmal in PBT gewaschen und dann die Gehirne/Larven in AP-Puffer überführt (zweimal Waschen). Anschließend wurde die Färbung durch Zugabe von 4,5 µl NBT und 3,5 µl X-Phosphat gestartet. Wenn nach ca. 15 bis 60 min Inkubation im Dunkeln die gewünschte Färbung erreicht war, wurde die Enzymreaktion mit PBT gestoppt (dreimal Waschen). Die Dehydratisierung erfolgte schrittweise mit 70 % und 100 % Ethanol, bevor die Gehirne und Larven in Kanada-Balsam eingebettet wurden.

Für die Färbung adulter Tiere wurden diese betäubt, in Ringer-Lösung überführt und nur diejenigen Tiere zur Präparation verwendet, welche in der Lösung absanken. Bei der Präparation wurde das Chitin-Skelett vollständig entfernt, nur der Kopf wurde im ursprünglichen Zustand belassen. Es wurde darauf geachtet, dass der Magen-Darmtrakt inklusive Gentitalsystem erhalten blieb. Nach einstündiger Fixierung in 4% Formaldehyd-Lösung wurden die Präparate gewaschen und schrittweise in Methanol überführt und über Nacht bei -20° C aufbewahrt. Die weiteren Schritte entsprechen der oben beschriebenen Gehirn-*in situ* Hybridisierung.

3.7.3 X-Gal-Färbung

Bei der untersuchten Promoterfliegenlinie $InsP3 > \tau LacZ$ lag der Insulinpromotor für *dilp3* homozygot auf dem dritten, und das $\tau LacZ$ -Gen homozygot auf dem zweiten Chromosom vor. Die von dem $\tau LacZ$ -Gen codierte β -Galactosidase hydrolysiert das Substrat X-Gal, es entsteht ein blauer Farbstoff.

Die Larven, spätes drittes Larvenstadium, wurden auf Eis in *Drosophila* Ringer präpariert. Die frei präparierten Gehirne wurden in PBT gewaschen und mit 4 % Glutaraldehyd in PBT 10 min fixiert. Danach wurde wieder in PBT gewaschen und schrittweise in X-Gal *staining buffer* überführt. Für die Färbereaktion wurde 1 ml *staining solution* mit 20 μ l 10% X-Gal gemischt und auf 37°C vorgewärmt. Dann wurden die Gehirne hineingegeben. Gefärbt wurde ebenfalls bei 37°C für 30 min bis 1 h; bei RT dauerte die Reaktion etwas länger. Die Reaktion wurde durch Waschen in PBT gestoppt und die gefärbten Gehirne in 70% und 100% Ethanol dehydratisiert; eingebettet wurde in Kanada Balsam.

3.7.4 Fluoreszenz-*in situ* Hybridisierung

Um schwache Färbungen besser sichtbar zu machen, Mehrfachfärbungen anzuwenden oder um konfokale Bilder zu machen, wurden Fluoreszenzfarbstoffe benutzt.

Im Gegensatz zu den histochemischen *in situ* Hybridisierungen wurden Antikörper gegen Biotin, Digoxigenin und Fluorescein verwendet, die mit einer Peroxydase (POD) gekoppelt waren. Bei der Reaktion wird der Peroxydase ein Substrat (Tyramid®, gekoppelt mit Fluorochrom) angeboten, das zu einem kurzlebigen Produkt verstoffwechselt wird, welches unspezifisch an alle Proteine bindet. Aufgrund der Kurzlebigkeit des Produkts bindet es jedoch nur an den Stellen im Gewebe, an denen auch Peroxydase gebunden ist. Auf diesem Weg war eine akkurate und gezielte Färbung einzelner Zellen möglich.

Gefärbt wurden entweder Gehirne von Larven und Adulten oder Totalpräparate von adulten Tieren. Diese wurden bis zum Auftragen der *in situ* Sonden wie in Punkt 3.7.2 behandelt. Es konnten bis zu drei unterschiedlich markierte Sonden (Digoxigenin-, Fluorescein- oder Biotin-markiert) zusammen aufgetragen werden. Nach der Übernacht-Inkubation folgten verlängerte Waschschrte (zweimal Hybe bei 65 °C, 1:1 Hybe:Hybe-B bei 65 °C, Hybe-B bei 65 °C, 1:1 Hybe-B:PBT, PBT bei RT). Nach weiteren ausführlichen Waschschrten wurde zweimal für 15 min in Blocking reagent geblockt. Die Antikörperlösung gegen die erste Riboprobe (POD-gekoppelter Antikörper) wurde 1:500 in Blocking reagent angesetzt. Die Antikörperinkubation erfolgte über Nacht bei 4 °C.

Am nächsten Tag wurde wieder ausführlich in PBT gewaschen. Die Präparate wurden daraufhin mit 200 µl Tyra-Solution (Tyramide® Amplification Kit) präinkubiert. Alle nachfolgenden Schritte erfolgten im Dunkeln, um ein Ausbleichen der Fluoreszenz-Farbstoffe zu vermeiden. Die Peroxydase-Reaktion erfolgte durch Zugabe von 7,5 µl des Tyramid-gekoppelten Fluorochroms in 1 ml Tyra-Solution. Nach 10 minütiger Inkubation bei RT wird wieder sehr ausführlich gewaschen. Sollte eine zweite Riboprobe nachgewiesen werden, musste die Peroxydase an dieser Stelle inaktiviert werden. Dazu wurde für 10 min in Ringerlösung gewaschen und danach für 10 min in 10 mM HCl (in Ringerlösung) deaktiviert. Danach wurde wieder ausführlich in PBT gewaschen, geblockt, und der Antikörper gegen die zweite Riboprobe bei 4°C über Nacht inkubiert.

Am nächsten Tag wurde der Antikörper wieder gründlich ausgewaschen, und die Peroxydase-Reaktion mit einem zweiten Tyramid-gekoppelten Fluorochrom durchgeführt. Danach wurde wieder lange gewaschen. Die Präparate konnten nun in Mowiol eingebettet werden und mit dem Konfokalen Lasermikroskop betrachtet werden. Wichtig hierbei war, je länger mit der Betrachtung gewartet wurde, desto besser wurden die Färbungen, da das Einbettmedium tiefer in das Gewebe einziehen konnte.

Im Falle einer dreifach-*in situ* Hybridisierung wird für die dritte Riboprobe ein Antikörper verwendet, der nicht an Peroxydase gekoppelt ist. Die Fluoreszenzmarkierung erfolgt hier durch Zugabe eines zweiten, tierspezifischen und fluoreszenz-gekoppelten Antikörpers. Da in diesem Fall keine Enzymverstärkung des Signals erfolgt, fällt die Färbung im Vergleich mit der Tyramid-Amplifikation recht schwach aus.

3.7.5 Antikörper-Färbung

Antikörperfärbungen können entweder alleine oder zusammen mit *in situ* Hybridisierungen durchgeführt werden.

Präparieren und Fixieren erfolgten wie oben beschrieben (3.7.2). Nachdem die Präparate in PBS gründlich gewaschen wurden, erfolgte ein Blockierungsschritt mit Goat Serum. Der 1. Antikörper wurde über Nacht bei 4°C inkubiert. Am nächsten Tag wurde wieder ausführlich gewaschen, erneut blockiert, und der Fluoreszenz-gekoppelte 2. Antikörper für 2 h bei RT inkubiert. Auch hier musste wieder im Dunkeln gearbeitet werden. Nach gründlichem Waschen der Präparate konnten diese nun in Mowiol eingebettet werden.

Die Antikörperfärbung kann sehr leicht in das *in situ* Protokoll eingebunden werden, indem man den ersten Antikörper zusammen mit dem Antikörper gegen die erste Riboprobe zugibt, und den zweiten zusammen mit dem Antikörper gegen die zweite Riboprobe. Zusätzlich können auch andere Färbungen in das Protokoll integriert werden, wie z.B. Kernfärbung mit Draq5. Es muss aber bedacht werden, dass mit Hilfe des Lasermikroskops nur drei verschiedene Kanäle, also auch Fluoreszenzen zusammen detektiert werden können.

4 Ergebnisse

Diese Arbeit baut auf Erkenntnissen auf, die in der Diplomarbeit „Funktion und Regulation von Insulin-artigen Genen in *Drosophila melanogaster* (Meigen)“ (Buch 2002) erworben wurden. Während sich die Diplomarbeit näher mit der Expression und Funktion der *Drosophila* insulin-like peptides (*dilps*) in Larven beschäftigt hat, wird in dieser Arbeit der Fokus auf die adulte Fliege gelenkt und konzentriert sich auf die Funktion der im Gehirn gelegenen Insulin-produzierenden Zellen (IPCs). Dies wurde mit Hilfe einer transgenen Fliegenlinie untersucht, die die Steuerregion von *dilp3* enthielt. Die IPCs wurden mit Hilfe einer Apoptose-induzierenden Fliegenlinie zerstört und der Effekt auf adulte Fliegen untersucht. Die Betrachtung bezog sich sowohl auf die morphologische als auch auf die genetische Ebene. Die späte Zerstörung der Zellen durch die Aktivität des Insulin-Promotors zeigte keine Beeinflussung der Larvalentwicklung. So wurde es möglich, den Effekt der Insulin-Defizienz getrennt von entwicklungsabhängigen Defekten zu betrachten.

4.1 Charakterisierung der Insulin-Homologe in *Drosophila*

Oben benannte Diplomarbeit brachte die Bestätigung, dass drei der Insulin-Homologe, *dilp2*, *dilp3* und *dilp5* im Gehirn der Larve exprimiert werden. Zudem konnten Erkenntnisse über deren mRNS-Expression in verschiedenen Entwicklungsstadien sowie unter verschiedenen Nahrungsbedingungen gewonnen werden. Da einige dieser Erkenntnisse für das weitere Vorgehen essentiell waren, wurden sie zunächst einer weiterführenden, genauen Untersuchung unterzogen.

4.1.1 Expression der *Drosophila* insulin-like peptides in Larven

Die gewebespezifische Expression der *dilps* wurde in Larven des dritten Entwicklungsstadiums mittels Fluoreszenz-*in situ* Hybridisierung untersucht. Von den sieben bekannten Insulin-Homologen wurde für *dilp2*, *dilp3* und *dilp5* eine Expression im Gehirn der Larve nachgewiesen.

Es zeigte sich, dass die drei Insuline im medianen Bereich des Gehirns in zwei symmetrisch angeordneten Zellclustern exprimiert werden. Diese bestehen aus jeweils sieben Zellen und sind neurosekretorischer Natur (Brogiolo et al. 2001), aus diesem Grund werden sie auch *insulin producing cells* (IPCs) genannt. Bei einer vergleichenden Fluoreszenz-

in situ Hybridisierung (FISH) zeigte es sich, dass *dilp2*, *dilp3* und *dilp5* in exakt den gleichen Zellen exprimiert werden (Abbildung 4.1 B).

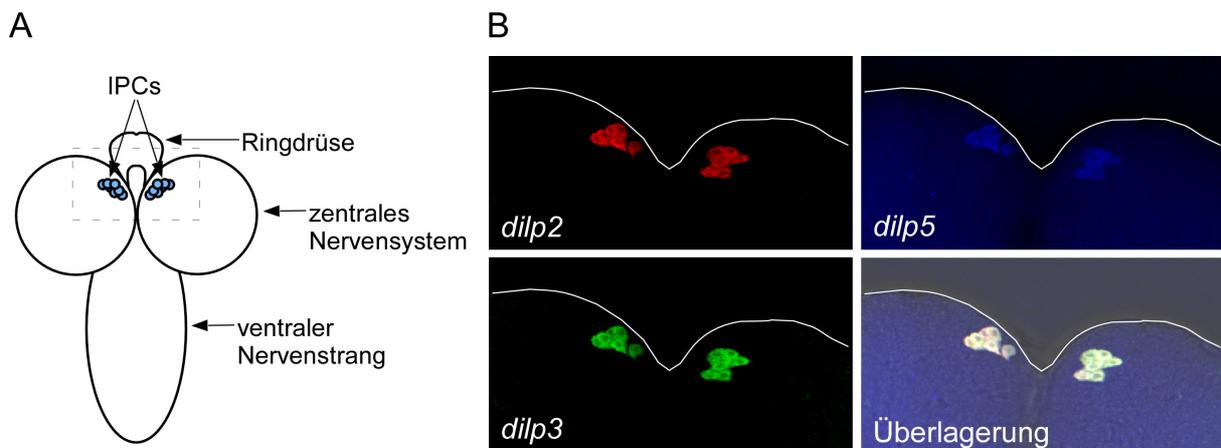


Abbildung 4.1: Expression der *dilps* in Larven. (A) Schema des Gehirns einer Larve des dritten Entwicklungsstadiums in dorsaler Ansicht. IPCs = *insulin producing cells*. Der gestrichelte Kasten gibt zur besseren Orientierung den in (B) gezeigten Ausschnitt an. (B) *In situ* Hybridisierung eines Larvenghirns im späten dritten Entwicklungsstadium. Die verwendeten Sonden gegen die Gehirn-Insuline waren unterschiedlich markiert: Biotin-*dilp2*, Digoxigenin-*dilp3*, Fluorescein-*dilp5*. *dilp2* und *dilp3* wurden mit dem Tyramid-System verstärkt, *dilp5* wurde durch herkömmliche Fluoreszenz-*in situ* Hybridisierung nachgewiesen. *dilp2* wurde in rot, *dilp3* in grün und *dilp5* in blau dargestellt. Bei dem Überlagerungsbild wurde den drei Fluoreszenzkanälen noch ein Durchlichtbild beigegefügt.

4.1.2 Entwicklungsabhängige Expression der *dilps*

Die Tatsache, dass drei verschiedene Insuline in den gleichen Zellen exprimiert werden, führte zu der Vermutung, dass sie eine unterschiedliche Funktion im Organismus bekleiden. Aus diesem Grund wurden Expressionsanalysen mittels quantitativer RT-PCR durchgeführt. Für die Analyse wurden Larven verwendet, die auf mit Hefesuspension versehenen Apfel-Agarplatten gezogen wurden. Die Larven wurden zu vier verschiedenen Zeitpunkten gesammelt, 39h, 64h, 88h und 111h nach Eiablage. Diese Zeiten repräsentierten die drei Larvenstadien, zusätzlich wurde mit 111h das dritte Larvenstadium kurz vor der Verpuppung berücksichtigt. Die aus der quantitativen PCR erhaltenen Daten wurden statistisch bewertet und grafisch dargestellt (Abbildung 4.2).

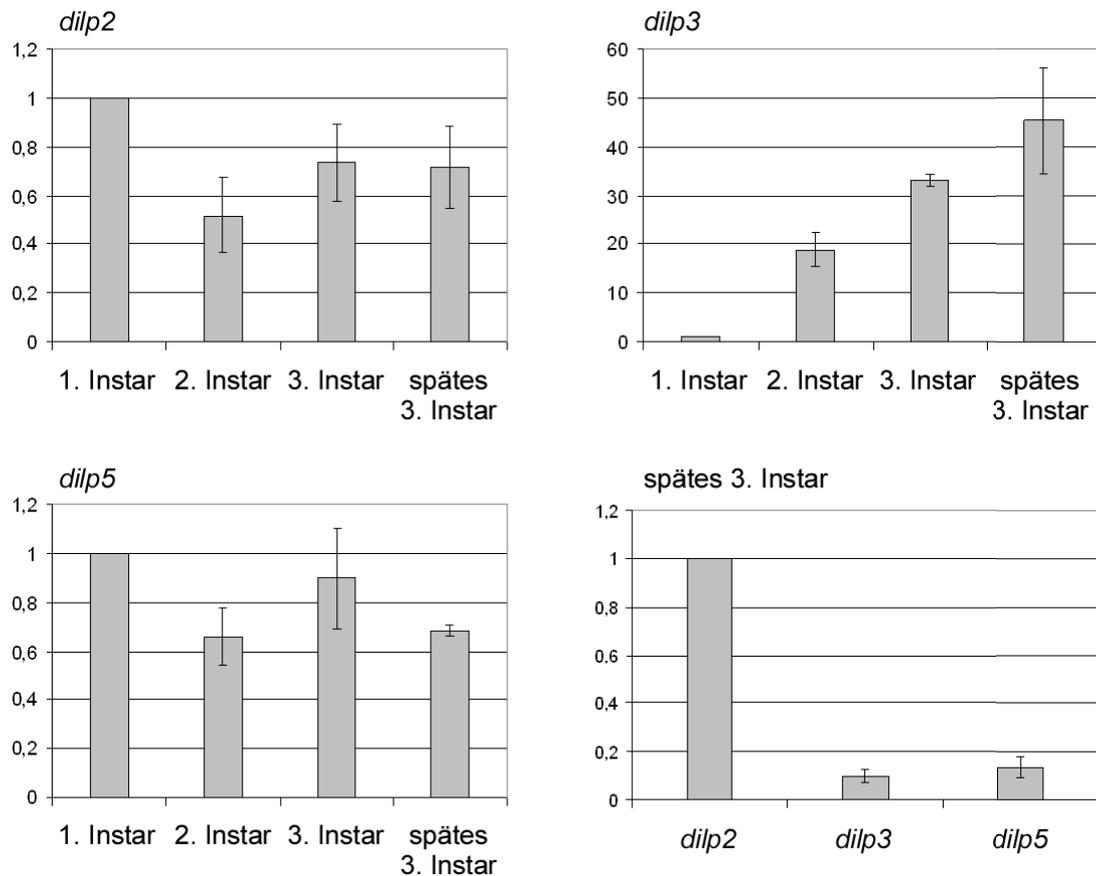


Abbildung 4.2: Entwicklungsabhängige Expression von *dilp2*, *dilp3* und *dilp5* während der Larvalentwicklung. Die verschiedenen Larvenstadien, Instars genannt, wurden miteinander verglichen, wobei das Expressionsmuster im ersten Instar immer gleich 1 gesetzt wurde. Gezeigt sind also nur die relativen Verhältnisse der Larvenstadien zueinander. Um einen besseren Eindruck über die tatsächlichen Expressionsunterschiede der *dilps* zu erhalten, wurde im letzten Diagramm der Unterschied im späten dritten Larvenstadium im Verhältnis zu *dilp2* dargestellt, welches hier gleich 1 gesetzt wurde.

Es zeigte sich, dass die mRNA-Expressionslevels von *dilp2* und *dilp5* während der Entwicklung verhältnismäßig geringen Schwankungen unterworfen sind. Im Gegensatz dazu nahm die nachgewiesene mRNA von *dilp3* mit jedem Larvenstadium drastisch zu. Bis zum späten dritten Larvenstadium war die Menge 45-fach erhöht. Da die Graphen jedoch einzeln zu betrachten sind, kann keine Aussage über das Verhältnis der *dilps* zueinander getroffen werden. Aus diesem Grund wurden die erhaltenen Rohdaten bezüglich des späten dritten Larvenstadiums zueinander ins Verhältnis gesetzt und ebenfalls graphisch dargestellt. Es zeigte sich, dass *dilp2* am stärksten exprimiert wird. Die Mengen an *dilp3*-mRNA und *dilp5*-mRNA waren deutlich reduziert. *dilp2* stellt somit die Hauptmenge an larval exprimierter Insulin-mRNA dar.

4.2 Neuronale Projektion der IPCs

In der Arbeitsgruppe von PD Dr. M.J. Pankratz wurde die transgene Fliegenlinie InsP3-Gal4 erzeugt, die ein 860 bp großes Fragment aus der Promoterregion von *dilp3* trägt. Mit ihrer Hilfe war es möglich, die Insulin-produzierenden Zellen genauer zu charakterisieren.

4.2.1 Neuronale Projektion in der Larve

Durch Kreuzen der Gal4-Linie mit der Linie UAS- τ LacZ wurde β -Galactosidase unter der Kontrolle des *dilp3*-Promotors exprimiert. Diese konnte wiederum entweder auf Protein-Ebene mittels Antikörperfärbung oder durch Umsetzen des Substrats X-Gal nachgewiesen werden (Abbildung 4.3). Das Expressionsmuster zeigte eine Lokalisation in den IPCs und deren weiterführenden Axonen. So konnte gezeigt werden, dass drei verschiedene Axonstränge von den IPCs wegführen (Buch 2002). Der erste Strang läuft lateral in Richtung der Gehirnhemisphären. Die zweite Gruppe projiziert in Richtung des subösophagealen Ganglions. Die am stärksten vertretene Gruppe projiziert in die larvale Ringdrüse, sie folgt zunächst dem Verlauf der zweiten Gruppe, führt dann in einem Bogen in die Gegenrichtung und bildet in der Ringdrüse einen gemeinsamen Strang mit den Neuronen des Schwesterclusters.

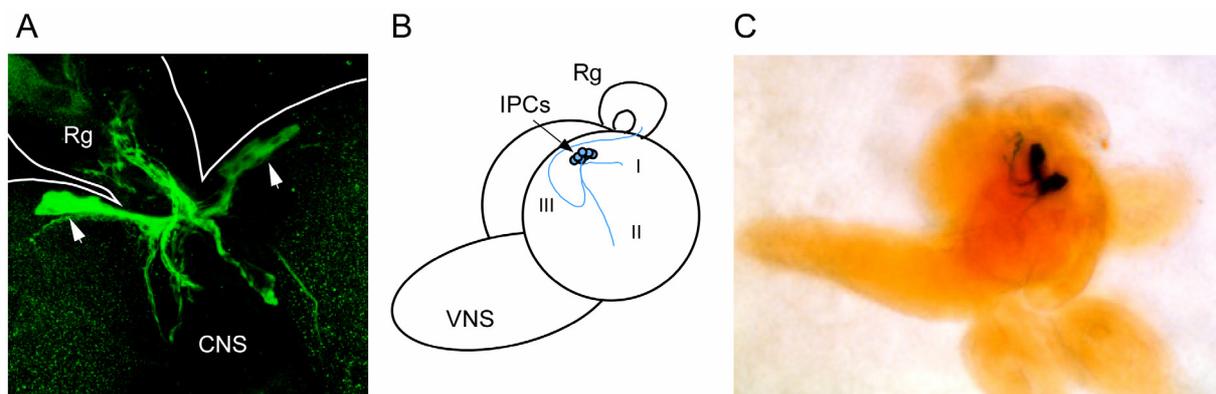


Abbildung 4.3: Axonale Projektion der Insulin-produzierenden Zellen. (A) Ausschnitt aus dem Gehirn einer Larve des dritten Entwicklungsstadiums. Gezeigt ist die berechnete Projektion eines konfokalen Z-Stapels der anti- β -Gal Färbung, dargestellt in grün. Die Pfeilspitzen deuten auf die IPCs. Die von den IPCs ausgehenden Axone sind deutlich zu erkennen. CNS = zentrales Nervensystem, Rg = Ringdrüse (B) Schema eines Larvengehirns im dritten Entwicklungsstadium in seitlicher Ansicht. Gezeigt ist die Lage der IPCs und der von ihnen wegführenden Neuronen (I-III) in blau. VNS = ventraler Nervenstrang (C) X-Gal-Färbung eines Larvengehirns in seitlicher Ansicht. Die beiden IPC-Cluster sind deutlich an der dunklen Färbung zu erkennen, ebenso die von ihnen projizierenden Neuronen (Buch 2002).

4.2.2 Neuronale Projektion in Adulten

Da in dieser Arbeit der Fokus auf die adulte Fliege gerichtet wurde, wurde die Expression von *dilp3* im Gehirn erwachsener Tiere untersucht. Ebenfalls wurde die Projektion der Neuronen der Linie *InsP3-Gal4;UAS-τLacZ* (kurz: *InsP3 > τLacZ*) untersucht und mit dem larvalen Projektionsmuster verglichen (Abbildung 4.4).

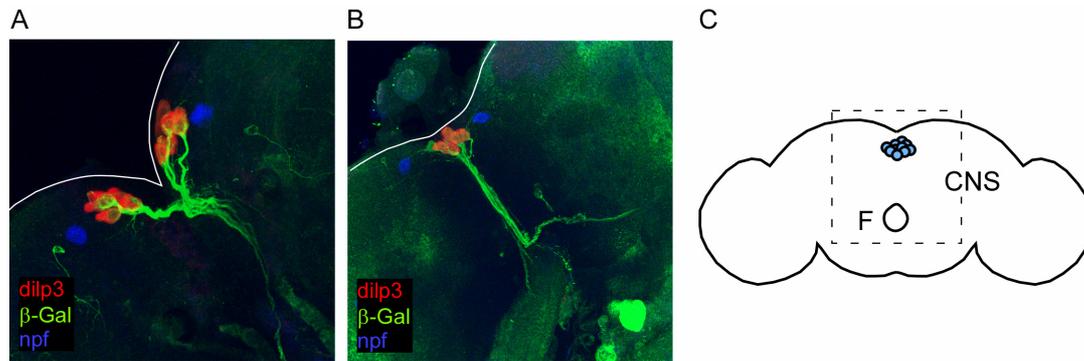


Abbildung 4.4: Vergleich der räumlichen Expression von *dilp3* und der Projektionsneuronen im larvalen und adulten Gehirn. (A) Ausschnitt aus dem Gehirn einer Larve des dritten Instars. *dilp3* ist in rot und β -Gal in grün dargestellt. NeuropeptideF (npf), blau dargestellt, wurde in diesem Fall als Marker zur genaueren Lokalisation verwendet. Die in die Ringdrüse führenden Projektionsneuronen sind in diesem konfokalen z-Stapel nicht erfasst. (B) Ausschnitt aus dem Gehirn einer adulten Fliege. Es wurde die gleiche Färbung durchgeführt wie in der Larve. (C) Schema des Gehirns einer adulten Fliege. Gezeigt werden das zentrale Nervensystem (CNS) und die Position der IPCs. Zur besseren Orientierung wurde hier der in (B) dargestellte Bereich markiert. F = Foramen (Färbung: Christoph Melcher, nicht veröffentlicht)

Zum einen zeigte sich, dass sich die Morphologie der IPCs des erwachsenen Tieres von der der Larve deutlich unterschied. So waren die Insulin-produzierenden Zellen im erwachsenen Tier nicht mehr in zwei symmetrischen Clustern angeordnet. Sie bildeten nun eine einzelne Zellpopulation, die auf der medianen Linie am anterioren Ende des Gehirns zu finden war. Es zeigte sich, dass die Projektionsneuronen im erwachsenen Tier alle in posteriorer Richtung verlaufen. Vor dem Foramen verzweigen sich die Neuronen und führen um das Foramen herum. Die weiterführende Projektion war in dieser Färbung nicht ersichtlich

Ein weiteres Charakteristikum in Adulten ist die Abwesenheit der Ringdrüse. Die Zellen der *Copora cardiaca* und der *Corpora allata* befinden sich nach der Metamorphose posterior des Gehirns und liegen am Ösophagus, die *Prothoraxdrüse* ist im erwachsenen Tier nicht mehr vorhanden. Ein weiterer Unterschied zur Larve besteht darin, dass das Gehirn in der Kopfkapsel liegt, während der ventrale Nervenstrang im Thorax liegt. In der Larve stehen die beiden in engem Kontakt zueinander.

Es ist bekannt, dass die Insulin-produzierenden Zellen im Larvengehirn mit den *akh*-produzierenden Zellen der Ringdrüse in Kontakt stehen. AKH ist das *Drosophila*-Homolog des menschlichen Glucagons, dem Gegenspieler von Insulin. Diese Konnektivität sollte nun in Adulten anhand einer weiteren Färbung gezeigt werden. Dazu wurde die *akh*-Promotorlinie mit einer *dilp3*-Promoterlinie, die homozygot τ LacZ exprimiert, gekreuzt. Dadurch wurde die β -Galactosidase unter der Kontrolle der Steuerregion beider Gene exprimiert.

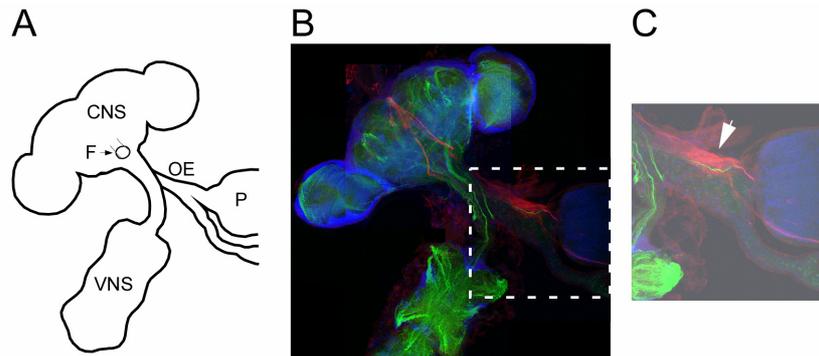


Abbildung 4.5: Konnektivität Insulin- und *akh*-produzierender Zellen in der adulten Fliege. (A) Schema des zentralen Nervensystems und Teile des Verdauungsapparates in Adulten. OE = Ösophagus, P = Proventriculus. (B) Konnektivität zwischen IPCs und *akh*-produzierenden Zellen, gezeigt durch eine anti- β -Gal-Färbung, dargestellt in rot. Die Kerne, blau dargestellt, wurden mit Draq5 gefärbt. Die grüne Färbung ist eine Antikörperfärbung gegen 22C10 und zeigt das Neuropil. (C) Vergrößerung des Bereichs der *akh*-produzierenden Zellen und deren Projektionsneuronen. Die Pfeilspitze deutet auf die Zellen der Corpora cardiaca. (Färbung: Christoph Melcher, nicht veröffentlicht)

Es zeigte sich, dass die IPCs in direktem Kontakt mit den *akh*-produzierenden Zellen stehen (Abbildung 4.5 B). Posterior vom Foramen folgten die IPC-Projektionsneuronen auf der ventralen Seite des Gehirns dem an dieser Stelle durch das Gehirn verlaufenden Ösophagus. Im Bereich der Corpora cardiaca Zellen traten die Neuronen in Kontakt mit den *akh*-Zellen. Diese sendeten wiederum selbst Projektionsneuronen aus, welche im Bereich des Proventriculus verliefen (Abbildung 4.5 C). Neuronen, die in Richtung des Gehirns verliefen, konnten in dieser Darstellung nicht von denen der IPCs unterschieden werden.

4.2.3 Zerstörung der IPCs durch Apoptose

Das Gal4-UAS System in *Drosophila* ermöglichte es, gezielt Zellen im lebenden Organismus auf genetischem Weg zu zerstören. Dazu wurde eine Fliegenlinie verwendet, die einen Apoptose-auslösenden Faktor wie z.B. RPR oder HID unter Kontrolle von UAS-Elementen exprimiert und diese wurde mit der gewünschten Gal4-Linie gekreuzt. Sobald der Wunsch-

promoter in den Nachkommen aktiviert wurde, kam es zur Einleitung der Apoptose und zur Zerstörung der betroffenen Zellen. Im Falle der Promotorlinie InsP3 sollte es zu einer Zerstörung der Insulin-produzierenden Zellen kommen.

Es wurden zwei verschiedene Apoptoselinien verwendet, UAS-*rpr* und UAS-*rpr/hid*. Letztere war eine Kombination aus zwei UAS-Linien, die zwei Apoptosefaktoren exprimierten und somit einen stärkeren Effekt auf die Zerstörung der Zellen ausüben konnten.

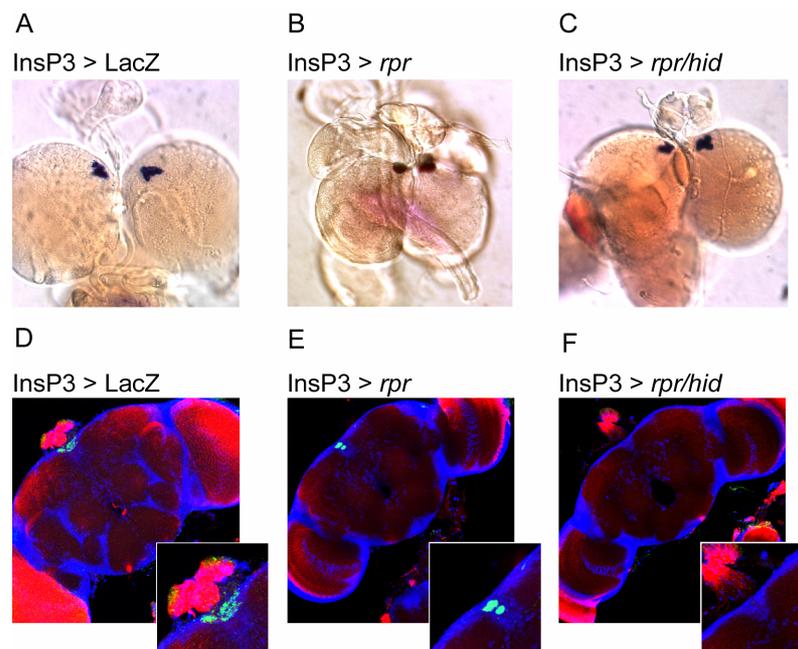


Abbildung 4.6: Zerstörung der IPCs durch Apoptose. (A-C) *dilp3* *in situ* Hybridisierung in Larvengehirnen des späten dritten Entwicklungsstadiums. (D-F) *dilp3* *in situ* Hybridisierung in Gehirnen adulter Weibchen, *dilp3* wurde in grün dargestellt. Die blaue Draq5-Färbung stellt die Zellkerne dar und die rote Antikörperfärbung gegen 22C10 unspezifisches Nervengewebe. Als Kontrolllinie diente InsP3 > LacZ (A, D). Apoptose sollte durch die schwächere Linie *rpr* (B, E) und durch die stärkere Linie *rpr/hid* (C, F) induziert werden. (Färbung D-F: Christoph Melcher, nicht veröffentlicht)

Nach Kreuzung der *dilp3*-Promotorlinie mit den Apoptoselinien wurden diese auf den Erfolg der Apoptose-Induktion untersucht (Abbildung 4.6). Als Kontrolle diente hierbei InsP3-Gal4;UAS-LacZ (kurz: InsP3 > LacZ). Bei Untersuchung der Larven war festzustellen, dass die IPCs weder bei der Kreuzung InsP3 > *rpr* noch bei InsP3 > *rpr/hid* zerstört wurden (Abbildung 4.6 A-C). Dieses Ergebnis stand im Gegensatz zu Erkenntnissen bezüglich der Zerstörung der IPCs unter Verwendung des *dilp2*-Promoterelementes (Ikeya et al. 2002; Rulifson et al. 2002). Bei Betrachtung der larvalen *dilp3*-mRNS-Expression (Abbildung 4.2) wurde deutlich, dass *dilp3* in der Larve im Vergleich zur Expression von *dilp2* nur schwach induziert war. So leuchtete es ein, dass der Effekt einer *dilp2*-Promoter-induzierten Apoptose wesentlich stärker und früher zur Geltung kommen muss als unter der Kontrolle von *dilp3*. In

den Adulten ließ sich ein Effekt der Apoptoselinien auf die IPCs feststellen (Abbildung 4.6 D-F). Dabei war der Effekt bei der Apoptoselinie *rpr* schwächer als bei *rpr/hid*. Während durch die Verwendung von *rpr/hid* unter der Kontrolle des *dilp3*-Promotors alle Insulinproduzierenden Zellen zerstört wurden, war unter der alleinigen Verwendung von *rpr* nur etwa die Hälfte aller Zellen betroffen.

4.3 Phänotypische Betrachtung der IPC-defizienten Fliegen

Um mehr über die Funktion der IPCs in der adulten Fliege zu erfahren, wurden die IPC-defizienten Fliegen einer phänotypischen Analyse unterzogen. Dabei wurden charakteristische Merkmale wie Fruchtbarkeit, Lebensdauer und die Zusammensetzung des Körpers untersucht. In diesen Studien wurden ausschließlich weibliche Fliegen untersucht. Die beiden Geschlechter haben unterschiedliche Bedürfnisse bezüglich Nahrung und deren Verwertung. Beispielsweise haben Weibchen aufgrund der Eiproduktion einen erhöhten Proteinbedarf. Außerdem wurde bei Mutanten des Insulin Signaltransduktionsweges ein positiver Effekt auf die Lebenserwartung der Weibchen beobachtet (Clancy et al. 2001; Tatar et al. 2001).

4.3.1 Analyse der Körperkomposition

Um den Effekt der Abwesenheit der IPCs auf den Metabolismus, beziehungsweise die Anpassung an unterschiedliche Nahrungsbedingungen zu untersuchen, wurden adulte weibliche Fliegen zwei verschiedenen Nahrungsbedingungen ausgesetzt. Als Kontrolle diente *InsP3 > LacZ* und wurde mit der Apoptoselinie *InsP3 > rpr/hid* verglichen. Die Fliegen wurden im Alter von acht Tagen für zwei Tage auf Fliegenfutter gesetzt. Alternativ wurde Hefesuspension verwendet. Danach wurden sie gewogen und der Lipid- und Glycogengehalt bestimmt (Abbildung 4.7). Bei den Kontrollen zeigte sich eine nahrungsabhängige Erhöhung des Gewichts, wenn die Fliegen Hefesuspension als Nahrung erhielten. Diese Gewichtszunahme konnte in den IPC-defizienten Fliegen nicht beobachtet werden (Abbildung 4.7 A). Die Menge an Körperlipiden war bei den mit der kohlenhydratreichen Nahrungsquelle Fliegenfutter gefütterten *InsP3 > LacZ*-Fliegen im Vergleich zu Hefe erhöht. Bei den *InsP3 > rpr/hid* Fliegen war dieser Unterschied nicht zu beobachten, die Menge an gemessenen Lipiden war nahezu gleich (Abbildung 4.7 B). Bezüglich des Glycogengehaltes konnte bei den Kontrollfliegen ebenfalls eine Nahrungsabhängigkeit beobachtet werden. Bei Fütterung der proteinreichen, aber kohlenhydratarmen Nahrungsquelle Hefe zeigte sich eine Reduktion des gespeicherten Glycogens. Dieser Effekt wurde ebenfalls bei den Apoptose-induzierten

Fliegen beobachtet, jedoch war die Verminderung der Glycogenspeicher nicht so stark wie bei $\text{InsP3} > \text{LacZ}$ (Abbildung 4.7 C). Die Menge an Protein wurde in einer unabhängigen Messung bestimmt. Es zeigte sich, dass die Menge an Körper-Proteinen bei der Gabe von Hefesuspension in beiden untersuchten Fliegenlinien deutlich erhöht war (Abbildung 4.7 D). Dies war konform mit der Tatsache, dass Weibchen, die proteinreiches Futter erhalten, mehr Eier produzieren (Terashima et al. 2004).

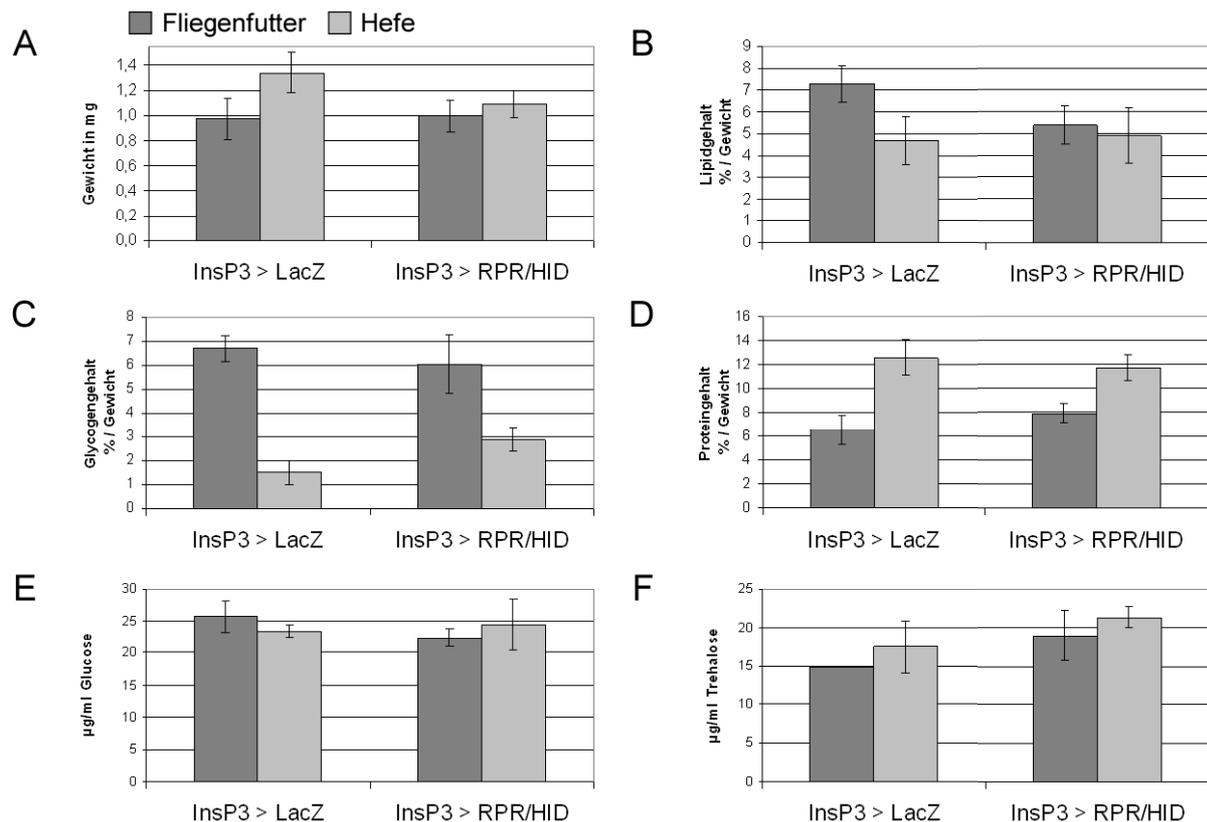


Abbildung 4.7: Analyse der Körperzusammensetzung. (A) Gewicht, (B) Lipidgehalt, (C) Glycogengehalt, (D) Proteingehalt. Die in (A-D) gezeigten Durchschnitts-Werte beziehen sich jeweils auf eine einzelne Fliege. (E) Glucosekonzentration der Hämolymphe, (F) Trehalosekonzentration der Hämolymphe. Die dunkelgrauen Säulen repräsentieren Fliegen, die mit Fliegenfutter gefüttert wurden, die hellgrauen Säulen stehen für Fliegen, die Hefesuspension als Nahrungsquelle erhielten.

Die Messung der Hämolymphe wurde an Fliegen durchgeführt, die im Alter von 12 Tagen für zwei Tage auf die beiden oben genannten Futterquellen gesetzt wurden. Hämolymphe wurde aus Gruppen von 20–25 Fliegen gewonnen. Aufgrund der statistischen Abweichungen ließ sich kein Unterschied bezüglich der Glucosekonzentration der Hämolymphe feststellen (Abbildung 4.7 E). Ebenso unterschied sich die gemessene Menge an Trehalose bei Gabe von Fliegenfutter nicht signifikant von der Menge bei Hefesuspension (Abbildung 4.7 F).

4.3.2 Fruchtbarkeit IPC-defizienter Fliegen

Es war bekannt, dass Fliegen, deren IPCs unter Kontrolle des *dilp2*-Promotors zerstört wurden, eine verminderte Fekundität aufwiesen (Ikeya et al. 2002; Broughton et al. 2005). Aus diesem Grund sollte herausgefunden werden, ob dies auch auf Fliegen zutrifft, deren IPCs erst spät in der Entwicklung mit Hilfe des *dilp3*-Promotors zerstört wurden. Es wurde zwischen der Fertilität und der Fekundität der Fliegen unterschieden (siehe auch 3.3.2).

Zunächst wurde die Fertilität der verschiedenen Entwicklungsstadien Larve, Puppe und Adulte untersucht. Es stellte sich heraus, dass die Fertilität der IPC-defizienten Fliegen $\text{InsP3} > \text{rpr/hid}$ im Vergleich zur Kontrolllinie $\text{InsP3} > \text{LacZ}$ geringer war. Dabei waren vor allem das Puppenstadium und die Adulten betroffen. Die Unterschiede bei den Larvenstadien waren nicht so groß, was durch die spät einsetzende Aktivität des *dilp3*-Promotors zu erklären ist (Abbildung 4.8 A). Bei der Untersuchung der Fekundität wurden nur die ersten 20 Tage im Leben der erwachsenen Weibchen berücksichtigt. Die Anzahl der gelegten Eier wurde aufsummiert. Aufgrund der statistischen Abweichung war kein signifikanter Unterschied in der Fekundität zwischen den beiden Fliegenlinien nachzuweisen, jedoch lagen die Mittelwerte der IPC-defizienten Fliegen immer etwas unterhalb der Kontrollen (Abbildung 4.8 B).

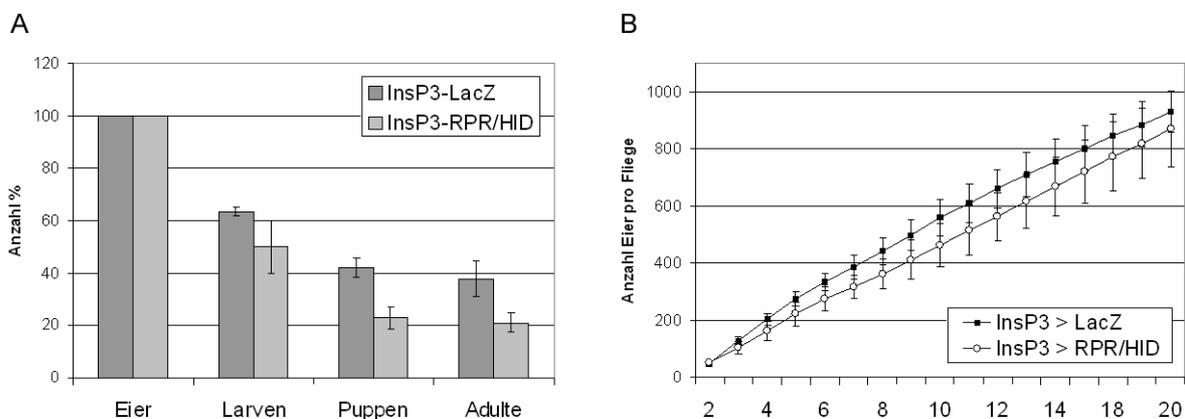


Abbildung 4.8: Fruchtbarkeit IPC-defizienter Fliegen. (A) Fertilität in den verschiedenen Entwicklungsstadien vom Ei zur Adulte. Die dunkelgrauen Balken zeigen die Werte der Kontrollen, die hellgrauen die der IPC-defizienten Fliegen. (B) Fekundität der Weibchen in den ersten 20 Tagen. Die Anzahl der gelegten Eier wurde täglich aufsummiert und pro Fliege angegeben. Die schwarzen Quadrate stehen für die Kontrollen, die weißen Kreise für die IPC-defizienten Fliegen.

4.3.3 Bestimmung der Langlebigkeit

Eine weitere Erkenntnis aus dem Studium von Mutanten des Insulin-Signalweges war die lebensverlängernde Wirkung auf weibliche Fliegen. Ob dies auch auf Fliegen zutrifft, deren Insulin-produzierende Zellen erst spät in der Entwicklung zerstört wurden, sollte unter Verwendung verschiedener Apotoselinien und unterschiedlicher Futterquellen untersucht werden.

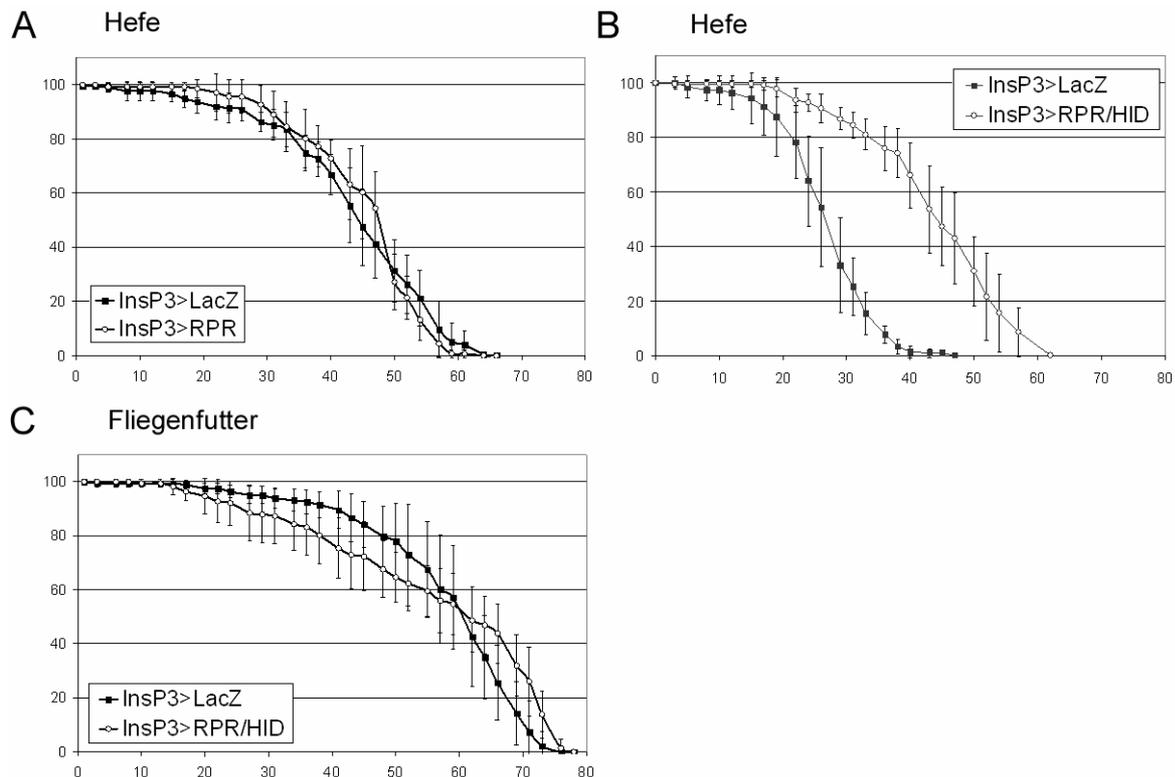


Abbildung 4.9: Langlebigkeit IPC-defizienter Weibchen. (A) Die *InsP3*-Promoterlinie wurde mit der schwächeren Apoptose-Linie *UAS-rpr* gekreuzt, und die Lebensdauer der Nachkommen im Vergleich zur Kontrolllinie *InsP3 > LacZ* untersucht. Als Futterquelle diente Hefesuspension. (B) In diesem Fall wurde die stärkere Apotoselinie *UAS-rpr/hid* zur Kreuzung verwendet, die Fliegen bekamen ebenfalls Hefe als Nahrung. (C) Wieder wurde die stärkere Apotoselinie unter der Kontrolle des *dilp3*-Promotors untersucht, die Fliegen erhielten jedoch Fliegenfutter als Futterquelle. Die schwarzen Quadrate stehen für die Kontrollen, die weißen Kreise für die Apoptose-induzierten Fliegenlinien. Die X-Achse zeigt die Tage, die Y-Achse den prozentualen Anteil an Fliegen an.

Zunächst wurde die schwächere Apotoselinie *UAS-rpr* verwendet. Es war bekannt, dass die Kreuzung mit der *dilp3*-Promotorlinie nur zu einer teilweisen Zerstörung der IPCs führte (siehe 4.2.3). Die Frage war nun, ob die Reduktion der Zellzahl einen Effekt auf die Langlebigkeit dieser Fliegen hat. Im Vergleich zur Kontrolllinie *InsP3 > LacZ* zeigten sich keine Unterschiede in der Langlebigkeit von *InsP3 > rpr* (Abbildung 4.9 A). Wurde

stattdessen die stärkere Apoptoselinie *InsP3 > rpr/hid* verwendet, stellte sich heraus, dass Fliegen ohne IPCs länger leben als die Kontrollen (Abbildung 4.9 B). Da schon bei der Messung der Körperkomposition Unterschiede bezüglich verschiedener Futterquellen zu beobachten war, wurde die Langlebigkeit alternativ auf Fliegenfutter untersucht. In diesem Fall wurde die stärkere Apoptoselinie *UAS-rpr/hid* unter Kontrolle des *dilp3*-Promotors verwendet. Es war festzustellen, dass der auf Hefesuspension beobachtete lebensverlängernde Effekt hier nicht vorhanden war (Abbildung 4.9 C). Im Gegensatz dazu war die Überlebensrate der IPC-defizienten Fliegen in den ersten beiden Dritteln ihres Lebens sogar leicht vermindert, im letzten Drittel leicht erhöht, wobei diese Unterschiede aufgrund der statistischen Abweichung zu vernachlässigen sind. Beim Vergleich der unterschiedlichen Nahrungsbedingungen zeigte sich außerdem, dass die Kontrollfliegen bei Gabe des proteinarmen und kohlenhydratreichen Fliegenfutters durchschnittlich 29 Tage länger überlebten, als durch Füttern mit Hefesuspension. Bei den IPC-defizienten Fliegen lag der Unterschied bei 16 Tagen.

4.4 Genomweite Analyse IPC-defizienter Fliegen

Die Zerstörung der Insulin-produzierenden Zellen spät in der Entwicklung ermöglichte es, Hinweise über deren Funktion in erwachsenen Tieren zu erhalten. Dies geschah durch Beobachten phänotypischer Merkmale wie Zusammensetzung des Körpers, Fertilität und Langlebigkeit. Die Frage, die sich nun stellte, war die nach der genetischen Konsequenz einer erzeugten IPC-Defizienz. Was sind die Zielgene des IPC-vermittelten Signales und welcher Regulation unterliegen sie? Diese Fragen sollten durch eine genomweite Analyse mittels cDNS-Microarrays geklärt werden. Die verwendeten Microarrays wurden in der Arbeitsgruppe von PD M.J. Pankratz hergestellt (Bauer 2004; Katzenberger 2004; Hamm 2005).

4.4.1 Microarray-Analyse der Apoptose-induzierten Fliegen

Da bereits in den vorangegangenen Experimenten die stärksten Effekte mit Hilfe der Kombination aus der *dilp3*-Promoterlinie *InsP3-Gal4* und der Apoptoselinie *UAS-rpr/hid* unter der Gabe einer proteinreichen Futterquelle beobachtet wurden, wurde diese zur genomweiten Expressionsanalyse herangezogen. Als Vergleichskontrolle diente wieder *InsP3 > LacZ*. Weibliche Fliegen wurden im Alter von 12 Tagen für zwei Tage auf Hefesuspension gesetzt, die mRNA extrahiert und in fluoreszenzmarkierte cDNS

umgeschrieben. Dabei wurde darauf geachtet, dass zusätzlich zu dem normalen Ansatz noch ein „Dye-Swap“ (Farb-Tausch) durchgeführt wurde (Abbildung 4.10 A). Dies geschah, um eventuelle Unterschiede in der Inkorporationsrate der mit verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffen markierten Nukleotide auszugleichen. Die erhaltene cDNS der IPC-defizienten Fliegen wurde mit cDNS der Kontrollfliegen zusammengeführt und auf die Microarrays aufgetragen (Abbildung 4.10 B) und über Nacht hybridisiert. Nach dem Scannen der Arrays konnten die Daten statistisch bewertet werden. Die erhaltenen Werte gaben die Regulation der Genexpression der IPC-defizienten Fliegen bezüglich der Kontrolle an.

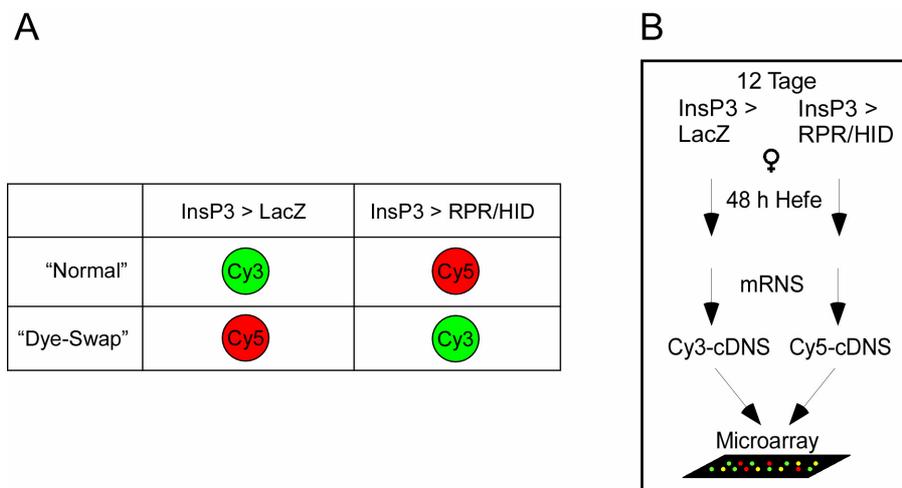


Abbildung 4.10: Microarray-Untersuchung IPC-defizienter adulter Weibchen. Verglichen wurden die Kontrollen InsP3 > LacZ mit den IPC-defizienten Fliegen InsP3 > *rpr/hid*. (A) Schema der bei der cDNS-Synthese verwendeten Fluoreszenzfarbstoffe im normalen und getauschten Zustand. (B) Schema eines Microarray-Experimentes. Zwölf Tage alte Fliegen wurden für 2 Tage auf Hefe gesetzt, die mRNA extrahiert und die fluoreszenzmarkierte cDNS hergestellt. Danach wurde die cDNS der zwei Zustände - normal und IPC-defizient - zusammengebracht und auf die Microarrays hybridisiert.

Nach Ausschluss aller Gene, die weniger als dreifach positiv oder negativ reguliert waren, blieben noch sechs Gene übrig (Tabelle 1). Das am stärksten regulierte Gen war in der FlyBase (<http://www.flybase.org/>) unter der Nummer CG11909 annotiert und wurde mittels Sequenzanalyse als α -Glucosidase identifiziert. Die Tatsache, dass dieses Gen als α -Glucosidase Kohlenhydrate spaltet, machte es zu einem interessanten Zielgen der IPC-Signaltransduktion. Die besonders starke Regulation der α -Glucosidase konnte auch mit den kommerziellen RNA-Microarrays der Firma Affymetrix nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt). Ein weiteres Gen, das dem Zuckermetabolismus zugeordnet werden konnte, ist das Gen CG9468. Durch Sequenzanalysen wurde es als α -Mannosidase identifiziert. Die übrigen Gene codieren keine Proteine oder Enzyme die Bestandteil des Zuckerstoffwechsels sind.

Tabelle 1: Microarray Daten des Vergleichs $\text{InsP3} > \text{LacZ}$ gegen $\text{InsP3} > \text{rpr/hid}$. Gezeigt sind alle erhaltenen Gene, die mehr als dreifach positiv oder negativ reguliert wurden. Dargestellt wurden das Symbol, die ermittelte Regulation, die Identifikationsnummer der FlyBase und die in der FlyBase annotierten Informationen bezüglich der möglichen Funktion, Bestandteil und Prozessen, an denen das jeweilige Gen beteiligt ist.

Symbol	Regulation	FlyBase ID	Funktion / Bestandteil / Prozess
CG11909	-17,15	FBgn0039330	α -Glucosidase, α -Glucosidase Komplex
PebII	-3,85	FBgn0011694	„protein ejaculatory bulb“
RfC38	-3,56	FBgn0028700	DNS Polymerase, DNS-Replikationsfaktor Komplex
CG15635	-3,10	FBgn0031617	Bindung von DNS, N-Methyltransferase Aktivität, DNS-Methylierung
CG14179	+4,24	FBgn0035994	unbekannt
CG9468	+4,52	FBgn0032069	α -Mannosidase, Lysosom, Hydrolase, hydrolysiert N-glycosydische Bestandteile

4.4.2 Microarray-Analyse verschiedener Fliegenlinien

Im Zuge der Microarray-Analyse IPC-defizienter Fliegen wurden auch andere Apoptose-induzierende Linien getestet. Zu einen war das die oben erwähnte, schwächere Linie UAS-rpr , zum anderen die Apoptoselinie UAS-hid unter der Kontrolle des Insulin-Promotors (Tabelle 2). Zusätzlich wurde eine weitere Fliegenlinie getestet, UAS-TetxLc (tetanus toxin light chain). Wird die leichte Kette des Tetanus-Toxin-Proteins in Nervenzellen exprimiert, wird der Vesikeltransport und damit die Ausschüttung von Neurotransmittern blockiert (Sweeney et al. 1995). Mit Hilfe der UAS-TetxLc Fliegenlinie konnte somit die Signalweiterleitung nach Kreuzung mit der InsP3-Gal4 Linie in den IPC-Neuronen unterbunden werden. In diesem Fall werden die IPCs nicht zerstört, können aber keine Information an die postsynaptischen Zellen weitergeben. Weiterhin wurde die Fliegenlinie UAS-d3RiC1 untersucht, welche dilp3-RNAi exprimiert (4.5.3).

Es zeigte sich, dass die α -Glucosidase in allen untersuchten Linien, bis auf $\text{InsP3} > \text{rpr}$, deutlich reprimiert wurde (Tabelle 2). Die Apoptoselinie UAS-hid zeigte einen ähnlich starken Effekt wie die Kombination UAS-rpr/hid . Bei der schwächeren Apoptoselinie UAS-rpr reichte die Zerstörung von 50% der Zellen nicht aus, um einen mit Microarrays messbaren Expressionunterschied zu detektieren. Interessanterweise ist es nicht nötig, die Zellen zu zerstören, um einen Effekt auf das Zielgen zu erreichen. Sowohl im Falle einer Signalblockade

mit Tetanus-Toxin als auch bei der Degradation der *dilp3*-mRNS mit Hilfe von *dilp3*-RNAi ist eine deutliche Hemmung der CG11909 mRNS-Transkription zu beobachten.

Aufgrund der Tatsache, dass CG11909 abhängig von den im Gehirn befindlichen Insulin-produzierenden Zellen reguliert wurde, wurde es *target of brain insulin (tobi)*, Zielgen der im Gehirn exprimierten Insuline) genannt.

Tabelle 2: Regulation des α -Glucosidase-Gens (CG11909) in verschiedenen Fliegenlinien. In jedem dieser Experimente diente InsP3 > LacZ als Vergleichskontrolle.

Untersuchte Fliegenlinie	Regulation des Gens CG11909
InsP3 > LacZ gegen InsP3 > <i>rpr</i>	keine Regulation
InsP3 > LacZ gegen InsP3 > <i>rpr/hid</i>	-17,2
InsP3 > LacZ gegen InsP3 > <i>hid</i>	-14,6
InsP3 > LacZ gegen InsP3 > TetxLc	-11,0
InsP3 > LacZ gegen InsP3 > d3RiC1	-13,3

4.5 Charakterisierung des *target of brain insulin (tobi)*

In der Betrachtung der Ergebnisse der genomweiten Analyse war *tobi* ein geeigneter Kandidat als Zielgen der IPC-Signaltransduktion. Es ist Bestandteil des Kohlenhydrat-Metabolismus welcher bei Wirbeltieren von Insulin beeinflusst wird. Zudem wurde es nicht nur im Fall einer Zerstörung der IPCs reprimiert, sondern konnte auch durch andere Maßnahmen beeinflusst werden, bei denen die IPCs intakt blieben. Es wurde einer genaueren Betrachtung unterzogen, um Hinweise auf seine Funktion im Organismus und seine Verbindung zu dem Insulin-Signalnetzwerk zu erhalten.

4.5.1 Funktion und Homologe von *tobi*

Um die aus der FlyBase erhaltenen Informationen bezüglich der möglichen Funktion des Zielgens CG11909 zu bestätigen, wurde eine Sequenzdatenbank-Suche mit Hilfe des NCBI Protein-Protein BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) durchgeführt (Abbildung 4.11). Dafür wurde die Proteinsequenz von TOBI verwendet.

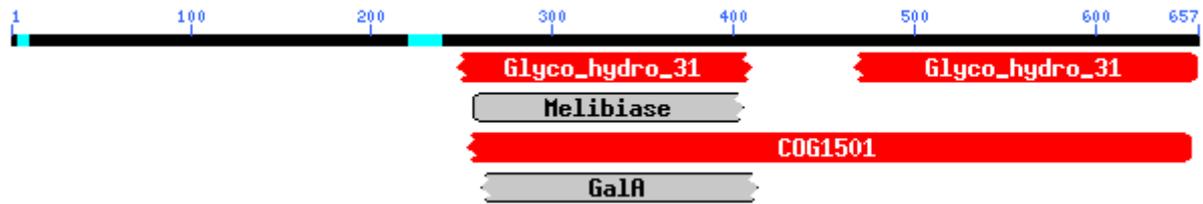


Abbildung 4.11: Konservierte Domänen von CG11909 (TOBI). Gezeigt ist die gesamte Länge des Proteins von 657 Aminosäuren. Die identifizierten Domänen sind rot bzw. grau unterlegt. Die Sequenzdatenbanksuche wurde mit NCBI BLAST durchgeführt.

Die gefundenen konservierten Domänen beinhalten zwei Glyco-hydro-31-Domänen ($4e^{-24}$, $3e^{-07}$)¹. Glycosyl Hydrolasen sind Schlüsselenzyme des Kohlenhydrat-Metabolismus. Die Familie 31 der Glycosyl Hydrolasen besteht aus Alpha-Galactosidasen und ähnlichen Enzymen. Eine weitere Domäne, COG1501 ($4e^{-57}$), steht für eine α -Glucosidase und ist involviert in Kohlenhydrat-Transport und -Metabolismus. Sie katalysiert die Hydrolyse terminaler 1,4-verknüpfter α -D-Glucose-Gruppen und setzt dabei α -D-Glucose frei. Weitere gefundene Domänen waren Melibiase (0,004) und GalA ($9e^{-06}$), beides α -Galactosidasen, welche die Hydrolyse von Melibiose in Galactose und Glucose katalysieren. Die größte Homologie wurde für die α -Glucosidase gezeigt.

Mit Hilfe der NCBI Datenbank wurde eine Suche nach Homologen von *tobi* in anderen Spezies durchgeführt. Bei sehr vielen Organismen wurden Proteine gefunden, die über einen weiten Bereich Homologien zu TOBI aufwiesen. Dies waren unter anderem *Drosophila pseudoobscura*, *Anopheles gambiae*, *Rattus norvegicus*, *Homo sapiens*, *Mus musculus* und *Danio rerio*. Tabelle 3 zeigt die E-Werte einiger der gefundenen Homologien.

Die Funktion der meisten oben genannten Proteine ist bisher noch nicht genauer charakterisiert. Zumeist wurde ihnen ebenso wie TOBI eine α -Glucosidase-Funktion mittels Sequenzanalyse zugeordnet.

¹ Die Angaben in Klammern stehen für die E- Werte der gefundenen Domänen. Der E-Wert (Expect-value) steht für die Wahrscheinlichkeit, mit der zufällige Treffer in der Datenbank erzielt wurden. Je kleiner dieser Wert, desto signifikanter war die gefundene Homologie.

Tabelle 3: Homologe Proteine von TOBI in anderen Spezies. Angegeben sind die jeweiligen Gene, Organismen und deren E-Werte beim Vergleich mit der TOBI-Proteinsequenz.

Gen, Spezies	E-Wert
GA11275-PA, <i>Drosophila pseudoobscura</i>	0.0
ENSANGP00000024978, <i>Anopheles gambiae</i>	6e ⁻⁹⁶
similar to KIAA1161 protein, <i>Rattus norvegicus</i>	4e ⁻⁹³
KIAA1161, <i>Homo sapiens</i>	5e ⁻⁹²
mKIAA1161, <i>Mus musculus</i>	9e ⁻⁹²
similar to KIAA1161, <i>Danio rerio</i>	4e ⁻⁸⁸

4.5.2 Expression von *tobi* in verschiedenen Fliegenlinien

Die durch genomweite Expressionsanalyse gewonnenen Daten bezüglich verschiedener Fliegenlinien sollten im Fall von *tobi* durch quantitative RT-PCR bestätigt werden. Diese Methode wurde gewählt, da sie eine höhere Sensitivität im Nachweis von Expressionsunterschieden besitzt als die Microarraytechnik.

Die drei Apoptoselinien *InsP3 > rpr*, *InsP3 > hid* und *InsP3 > rpr/hid*, die signalblockierende Linie *InsP3 > TetxLc* und die RNAi-Linie *InsP3 > d3RiA1* (siehe 4.5.3) wurden mittels Realtime-RT-PCR auf die Expression von *tobi*-RNS in Weibchen untersucht (Abbildung 4.12 A). Als Kontrolle diente *InsP3 > LacZ*. Im Fall der beiden stärkeren Apoptoselinien *InsP3 > hid* und *InsP3 > rpr/hid* lag die Menge an nachgewiesener *tobi*-mRNS bei Null. Ein ähnliches Ergebnis war im Fall von *InsP3 > d3RiA1* zu beobachten. Bei der Linie *InsP3 > TetxLc* betrug die exprimierte Menge an *tobi*-mRNS 4% der Kontrolllinie. Diese Ergebnisse bestätigten die bei den Microarrays erhaltenen Daten. Neu war die Tatsache, dass im Fall der schwächeren Apoptoselinie *InsP3 > rpr* eine Regulation gezeigt werden konnte. Das *tobi*-mRNS-Level lag bei 67% verglichen mit der Expression bei *InsP3 > LacZ*. Dieses Ergebnis stand im Gegensatz zu den Daten der Microarray-Analyse, war aber durch die erhöhte Sensitivität des Nachweisverfahrens zu erklären. Diese verminderte Expression passte zu der Beobachtung, dass der Effekt von *rpr* nur zu einer 50%igen Zerstörung der IPCs führte (Abbildung 4.6 E).

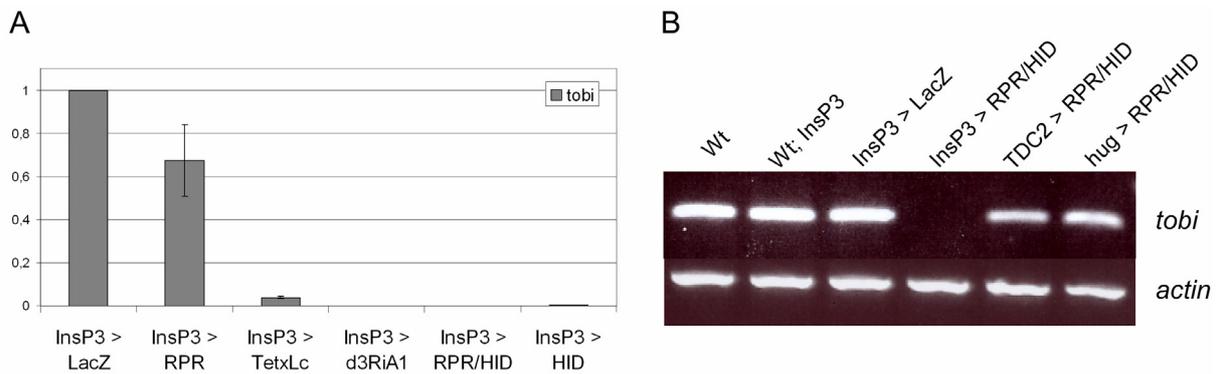


Abbildung 4.12: Expressionsunterschiede von *tobi* in verschiedenen Fliegenlinien. (A) Quantifizierung von *tobi* mittels Realtime RT-PCR. Als Kontrolle diente InsP3 > LacZ, welches gleich 1 gesetzt wurde. (B) Semi-quantitative RT-PCR von *tobi* in unterschiedlich kombinierten Fliegenlinien. *Actin* diente zur Normalisierung. In allen Fällen wurden weibliche Tiere untersucht.

Um auszuschließen, dass die beobachteten Effekte durch besondere Charakteristika der verwendeten Fliegenlinien entstanden sind, wurden diese Linien mit anderen Fliegenlinien gekreuzt und die *tobi*-Expression mittels semi-quantitativer RT-PCR nachgewiesen (Abbildung 4.12 B). Untersucht wurden der Wildtyp und eine Kreuzung der InsP3-Promoterlinie mit der Wildtyplinie. Beide zeigten eine gleich starke Expression wie bei der Kontrolllinie InsP3 > LacZ. Zur Untersuchung der Apoptoselinie wurden zwei Promotorlinien verwendet, bei denen Gal4 nicht in den IPC-Zellen exprimiert wurde. Weder die Kombination von UAS-*rpr/hid* mit TDC2-Gal4 noch mit *hug*-Gal4 führten zu einer Repression der *tobi*-Expression, wie sie bei der Verwendung des *dilp3*-Promotors beobachtet werden konnte.

4.5.3 Degradation der endogenen *dilp3*-mRNS mittels RNAi

Um ein genaues Bild über die Funktion von *dilp3* im Organismus zu erhalten wurde eine transgene Fliegenlinie erzeugt, welche in der Lage war, *dilp3*-RNAi zu exprimieren. So konnte *dilp3* aus dem System entfernt werden, ohne die IPCs zu zerstören, bzw. die Signaltransduktion an der Synapse zu blockieren. Es wurden mehrere unabhängige Linien erzeugt, die sich durch die Insertion des Transgens in das Genom unterschieden.

Zur Untersuchung der Fliegenlinie UAS-d3Ri (d3Ri = *dilp3* RNAi) wurde sie mit der *dilp3*-Promoterlinie InsP3-Gal4 gekreuzt, um die Transkription der doppelsträngigen mRNS direkt in den IPCs zu initialisieren. Um festzustellen, ob die *dilp3*-Degradation in den Insulin-produzierenden Zellen erfolgreich war, wurden Primer generiert, welche speziell die endogenen *dilp3*-Transkripte erkennen konnten. Es zeigte sich, dass die endogene *dilp3*-mRNS in den unabhängigen Linien unterschiedlich stark degradiert war (Abbildung 4.13 A). Der stärkste

Effekt war in der Linie *InsP3 > d3RiC1* zu beobachten, die Expression entsprach 20% der Kontrolle. Die Linien A1 und E1 zeigten den schwächsten Effekt auf die Degradation der *dilp3*-mRNS. Des Weiteren konnte festgestellt werden, inwieweit die Expression von *tobi* in den RNAi-Linien beeinflusst wurde (Abbildung 4.13 B). Dies wurde ebenfalls mittels quantitativer Methoden untersucht. Es zeigte sich, dass die *tobi*-Expression in allen untersuchten unabhängigen *dilp3*-RNAi-Linien nicht mehr nachweisbar war. Dies bestätigt die durch Microarray-Analyse erhaltenen Daten. Aufgrund der hohen Sequenzhomologie der *dilps* zueinander sollte festgestellt werden ob das *dilp3*-RNAi-Konstrukt die Expression der beiden anderen in den IPCs exprimierten *dilps* beeinflusste. Dies wurde an zwei unabhängigen RNAi-Linien mittels quantitativer RT-PCR untersucht. Tatsächlich war die Menge an *dilp2*-mRNS in beiden untersuchten Linien um mehr als 60% und die Menge an *dilp5*-mRNS um 50% reduziert (Abbildung 4.13 C, D).

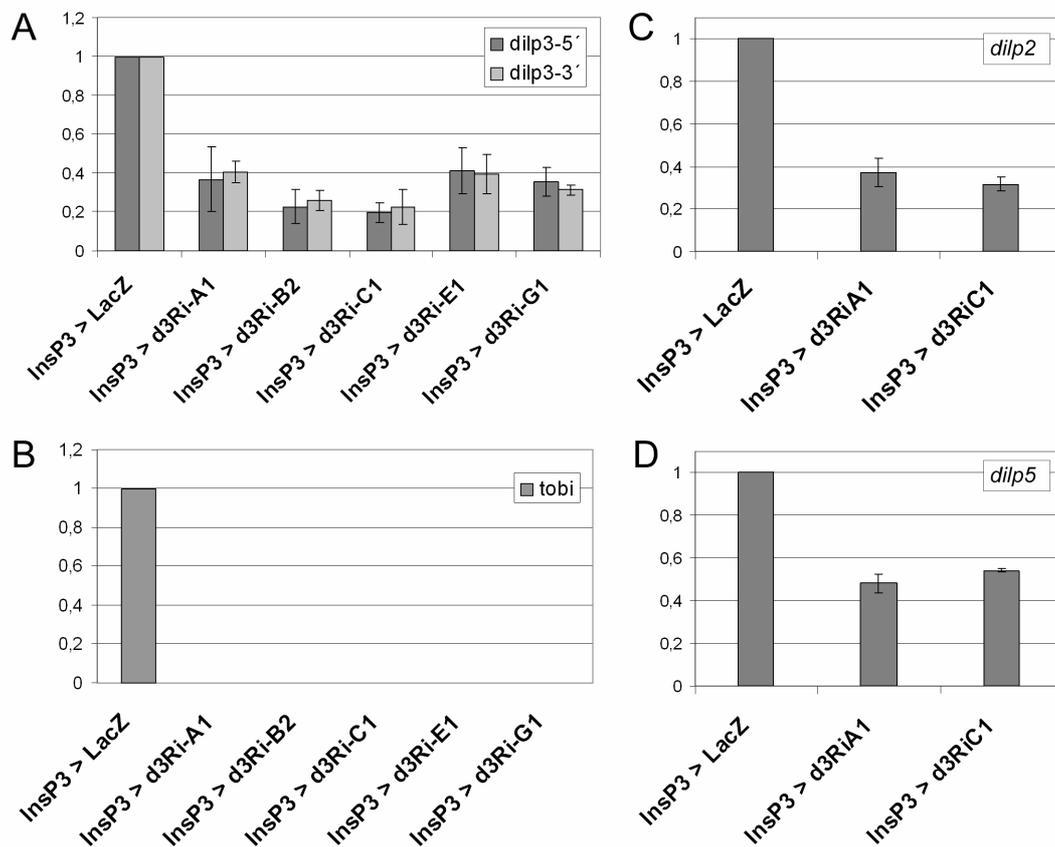


Abbildung 4.13: Expressionsunterschiede der *dilps* und von *tobi* in der transgenen Fliegenlinie d3Ri. (A) Die Expression von *dilp3* wurde in verschiedenen unabhängigen RNAi-Linien untersucht. Das Primerpaar *dilp3*-5' liegt am 5'-Ende, das Primerpaar *dilp3*-3' am 3'-Ende des *dilp3*-Gens. *InsP3 > LacZ* diente als Kontrolle. (B) Expression von *tobi* in den unabhängigen *dilp3*-RNAi-Linien. (C, D) Expression von *dilp2* und *dilp5* in den transgenen *dilp3*-RNAi-Linien d3RiA1 und d3RiC1.

4.5.4 Die Wahl der Nahrung beeinflusst die *tobi*-Expression

Die bisherigen Studien der *tobi*-Expression bezogen sich ausschließlich auf Tiere, die für 48 h vor der mRNA-Extraktion Hefesuspension als Nahrungsquelle erhielten. In der Untersuchung der Körperkomposition (4.3.1) hatte es sich gezeigt, dass die Wahl der Nahrung einen großen Einfluss auf die Fliegen haben kann. So sollte nun bestimmt werden, ob die *tobi*-Expression ebenfalls durch unterschiedliche Nahrungsquellen beeinflusst werden kann. Als Nahrung diente hierbei Standardfliegenfutter, welches eine relativ proteinarme und kohlenhydratreiche Futterquelle darstellt, und Hefesuspension, welche wiederum proteinreich und kohlenhydratarm ist. Die Tiere erhielten wie bei den Microarray-Experimenten im Alter von 12 Tagen für jeweils 48 h eine der beiden Futterquellen. Als Kontrolle diente wieder $\text{InsP3} > \text{LacZ}$, die ICP-defiziente Linie war $\text{InsP3} > \text{rpr/hid}$. Die Menge an exprimierter *tobi*-mRNA wurde mit quantitativer RT-PCR bestimmt.

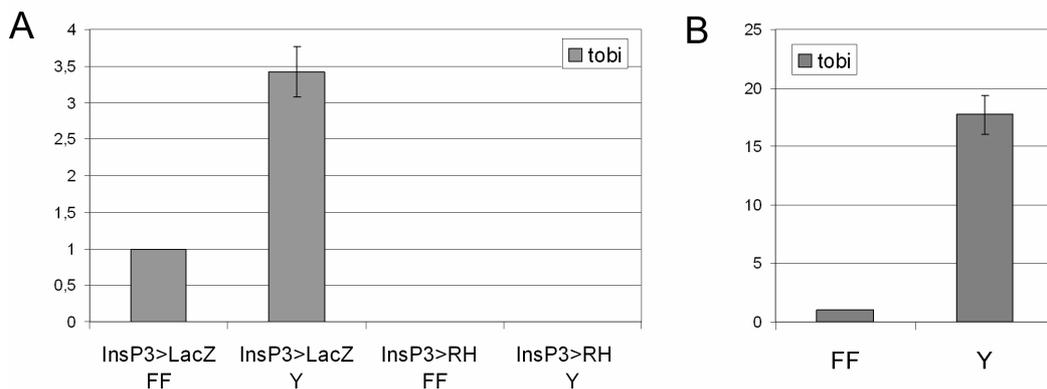


Abbildung 4.14: Expressionsunterschiede von *tobi* bei unterschiedlichen Nahrungsquellen. (A) Quantitativer Vergleich der *tobi*-Expression bei Gabe von Fliegenfutter (FF) und Hefe (Y). Als Kontrolle diente $\text{InsP3} > \text{LacZ}$, die verwendete Apoptoselinie war $\text{InsP3} > \text{rpr/hid}$. (B) Nahrungsabhängiger Expressionsunterschied von *tobi* in Wildtyp-Fliegen.

Im Fall der ICP-defizienten Fliegen lag die Menge an exprimierter *tobi*-mRNA in beiden Futterbedingungen bei Null (Abbildung 4.14 A). Im Gegensatz dazu konnte in der Kontrolle eine Expression für beide Bedingungen nachgewiesen werden. Allerdings war die *tobi*-Expression bei Gabe von Hefesuspension um das 3,4-fache induziert gegenüber der mRNA-Menge bei Fliegenfutter. Um zu zeigen, dass dieser nahrungsabhängige Effekt nicht ein besonderes Charakteristikum der Kreuzung aus InsP3 -Gal4 und UAS-LacZ war, wurden Wildtyp-Fliegen auf unterschiedliche *tobi*-Expression bezüglich der beiden Nahrungsquellen untersucht (Abbildung 4.14 B). Es zeigte sich, dass bei den Wildtypen der Effekt sogar um einiges verstärkt auftrat, es kam zu einer 17-fachen Steigerung der Menge an *tobi*-mRNA.

4.5.5 Räumliches Expressionsmuster von *tobi*

Bisher konnte gezeigt werden, dass die *tobi*-Expression abhängig von der Nahrungsbedingung und der Funktion der Insulin-produzierenden Zelle ist. Im nächsten Schritt sollte die räumliche Verteilung der *tobi*-Transkripte im erwachsenen Tier untersucht werden. Aus diesem Grund wurden Fluoreszenz-*in situ* Hybridisierungen in Wildtypfliegen durchgeführt, die für 48 h mit Hefesuspension gefüttert wurden. Diese Nahrungsbedingung wurde gewählt, da sie in den vorherigen Experimenten die stärkste *tobi*-Expression induzierte.

Die Färbungen zeigten, dass *tobi* in einem bestimmten Bereich des Mitteldarms exprimiert wurde (Abbildung 4.15, Abbildung 4.16 A). Eine weitere Expression konnte in verschiedenen Fettkörpern nachgewiesen werden. Einer war spiralförmig um den Darm gewickelt, andere waren zwischen den Ovarien angeheftet. In den adulten Tieren sind die Fettkörper nur sehr locker mit den Organen verbunden. Vermutlich wurde das meiste Fettkörpergewebe während der Färbeprozedur losgelöst. Nur diejenigen Teile, welche besonders fest an den Organen angeheftet waren, blieben zur Detektion erhalten. Daher kann keine Aussage über weitere, möglicherweise gefärbte Fettkörper getroffen werden.

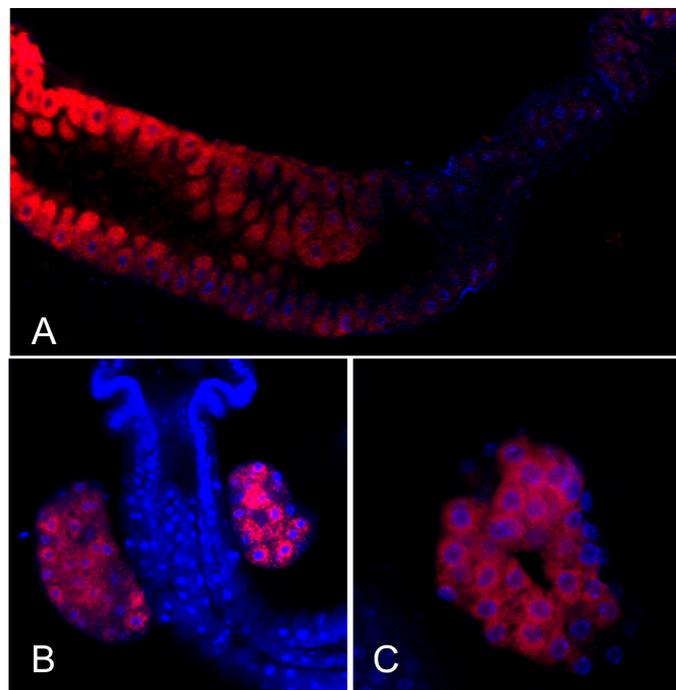


Abbildung 4.15: *tobi* Fluoreszenz-*in situ* Hybridisierung an Wildtyp-Fliegen. *tobi* wurde rot, die Zellkerne (draq5) blau dargestellt. (A) Ausschnitt aus dem Mitteldarm einer erwachsenen Fliege. (B) Am Darm befindlicher Fettkörper, posterior von (A). (C) Fettkörper, der zwischen den Ovarien angeheftet war.

Weiterhin wurde geprüft, ob sich Expressionsunterschiede von *tobi* durch verschiedene Nahrungsquellen mit Hilfe von *in situ* Hybridisierung nachweisen lassen. Hierbei wurde die histochemische Variante verwendet. Kontrollfliegen und IPC-defiziente Fliegen wurden für 48 h den Nahrungsbedingungen Hefesuspension oder Fliegenfutter ausgesetzt. Bei der Präparation blieb die Kopfkapsel intakt, das restliche Chitinskelett wurde komplett entfernt, um die Scherkräfte während den Waschschrritten zu verringern.

Wie erwartet, zeigte sich die stärkste Färbung in denjenigen Kontrollfliegen, die mit Hefesuspension gefüttert wurden (Abbildung 4.16 A). Deutlich zu sehen war die spezifische Färbung im Darm, außerdem der um den Darm gewundene Fettkörper. Im Fall der mit Fliegenfutter gefütterten Kontrolltiere war noch eine leichte Färbung im Darm zu beobachten (Abbildung 4.16 B). Bei den IPC-defizienten Fliegen war in keiner der beiden Nahrungsbedingungen eine spezifische Färbung zu sehen (Abbildung 4.16 C, D).

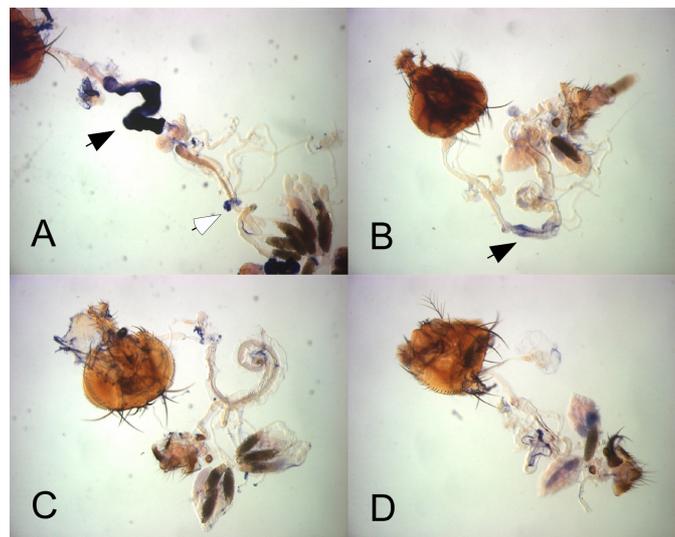


Abbildung 4.16: Nahrungsabhängige *tobi*-Expression in weiblichen Adulten. (A) Kontrollfliegen *InsP3 > LacZ*, gefüttert mit Hefe, und (B) mit Fliegenfutter. (C) IPC-defiziente Fliegen *InsP3 > rpr/hid* gefüttert mit Hefe und (D) mit Fliegenfutter. Die schwarzen Pfeile deuten auf die gefärbten Darmbereiche, der weiße Pfeil auf den Darm-gebundenen Fettkörper.

4.5.6 Identifizierung der *tobi*-induzierenden Nahrungskomponente

Bisher konnte gezeigt werden, dass *tobi* abhängig von der Nahrungsquelle reguliert wird. Das verwendete Futter war zum einen sehr proteinreich und kohlenhydratarm (Hefe) und zum anderen proteinarm und kohlenhydratreich (Fliegenfutter). Welche der im Futter enthaltenen Komponenten ist für die unterschiedlich starke Expression verantwortlich? Diese Frage sollte anhand von Wildtyp-Weibchen untersucht werden. Dazu wurden Verdünnungsreihen von

Hefeextrakt und Saccharose erstellt. Wildtypfliegen erhielten im Alter von 12 Tagen für 48 h die verschiedenen Verdünnungen als Nahrungsquelle. Danach wurde die *tobi*-Expression mit Hilfe quantitativer RT-PCR ermittelt.

Bei Gabe von Hefeextrakt zeigte sich eine konzentrationsabhängige Regulation (Abbildung 4.17 A). Die Proteinverdünnung wurde in einer 20%-igen Saccharose-Lösung durchgeführt, um eine Hungerreaktion zu vermeiden. Die Expression von *tobi*-mRNS sank mit Abnahme der Hefeextraktkonzentration. Auch bei Gabe von Saccharose zeigte sich ein Effekt (Abbildung 4.17 B). Im Gegensatz zum Hefeextrakt wurde *tobi* durch eine Abnahme der Zuckerkonzentration induziert. Allerdings war der Effekt von Hefeextrakt auf die *tobi*-Expression stärker als der von Saccharose. Um festzustellen, ob die beobachteten Regulationen durch andere Proteine und Zucker reproduzierbar waren, wurde alternativ das Milchprotein Casein und der Einfachzucker Glucose getestet (Abbildung 4.17 C, D). In beiden Fällen konnte der gleiche Effekt wie vorher bei Hefeextrakt und Saccharose beobachtet werden.

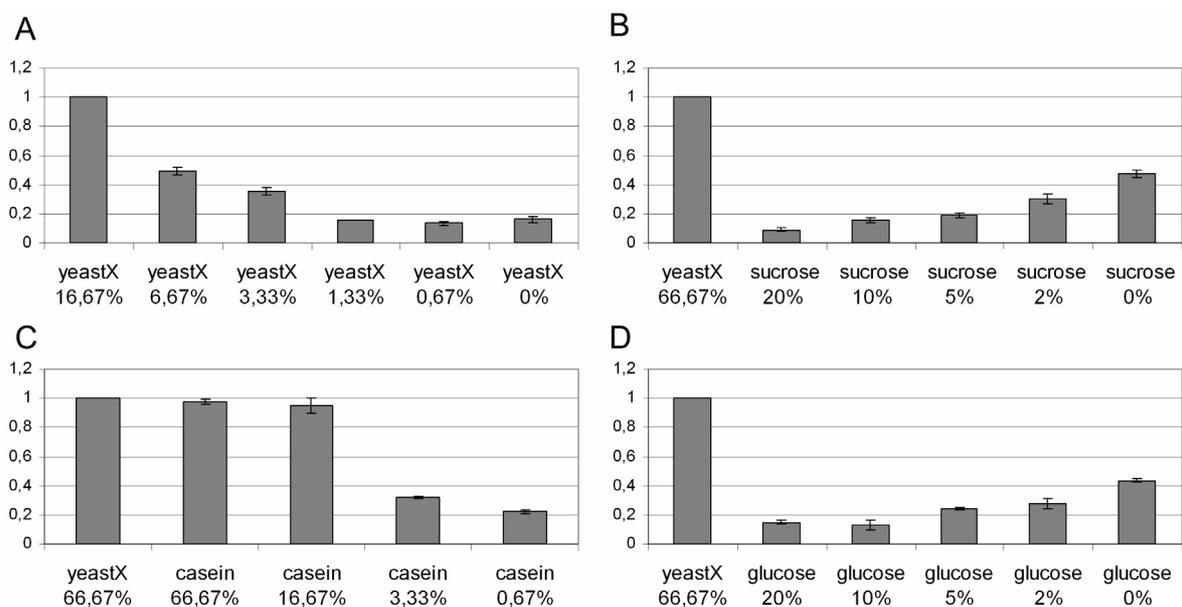


Abbildung 4.17: *tobi*-Expression bei unterschiedlichen Verdünnungsreihen protein- und zuckerhaltiger Lösungen. (A) Hefeextrakt (yeastX) in PBS/20% Saccharose (B) Saccharose (sucrose) in PBS, Hefeextrakt in PBS/20% Saccharose diente zur Normalisierung (C) Casein in PBS/20% Saccharose (D) Glucose in PBS

Um zu überprüfen, ob die im Wildtyp gezeigte Regulation von *tobi* bei der Kontrolllinie *InsP3 > LacZ* und der IPC-defizienten Linie *InsP3 > rpr/hid* ebenfalls abhängig von der Proteinmenge der Nahrung reguliert war, wurden quantitative RT-PCRs durchgeführt. Die Weibchen wurden mit verschiedenen Verdünnungen von Hefeextrakt in 20%-iger

Saccharose-Lösung in PBS gefüttert. Zur Bestätigung des zuckerabhängigen Effekts erhielten die Tiere Lösungen einer Saccharose-Verdünnungsreihe als Nahrungsquelle.

Tatsächlich ließ sich im Fall der Kontrolllinie *InsP3 > LacZ* eine eindeutige Verringerung der *tobi* mRNA-Menge bei abnehmender Proteinkonzentration feststellen (Abbildung 4.18 A). Auch im Fall der Zuckerverdünnungsreihe wurde ein dem Wildtyp ähnlicher Effekt auf die Induktion der *tobi*-Expression beobachtet (Abbildung 4.18 B). Für die IPC-defizienten Fliegen konnte in keinem der untersuchten Fälle eine Expression nachgewiesen werden.

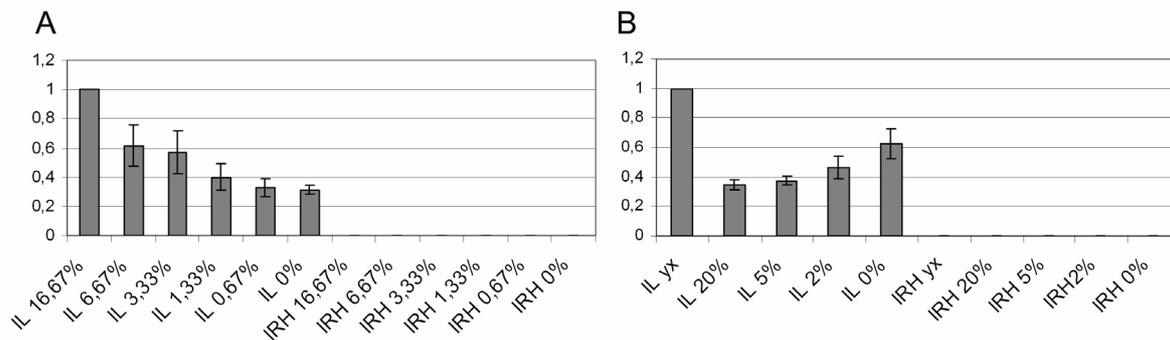


Abbildung 4.18: Protein- und Zucker-abhängige Expression von *tobi* in adulten *InsP3 > LacZ* (IL) Fliegen und *InsP3 > rpr/hid* (IRH) Fliegen. (A) Hefeextrakt in PBS/20% Saccharose (B) Saccharose in PBS. yx = 16,67% Hefeextrakt in PBS/20% Saccharose.

4.5.7 Beeinflussung der *tobi*-Expression durch *akh*-Zell-Knockout

Bereits in Kapitel 4.2.2 wurde auf die Verbindung der IPCs mit den *akh*-produzierenden Zellen hingewiesen. Diese beiden Zellgruppen stehen in direktem Kontakt zueinander und werden auch als funktionelles Homolog der α - und β -Zellen des Säuger-Pankreas bezeichnet. So stellte sich nun die Frage, ob die Expression von *tobi* auch von der Signalvermittlung der *akh*-produzierenden Zellen abhängig ist. Dazu wurde die transgene Fliegenlinie *akh-Gal4* mit der Apoptoselinie *UAS-rpr/hid* gekreuzt, um eine Zerstörung der *akh*-produzierenden Zellen zu erreichen. Die resultierenden Weibchen wurden daraufhin mit Hilfe von semiquantitativer RT-PCR auf die Expression von *tobi* untersucht (Abbildung 4.19 B). Tatsächlich zeigte sich, dass auch in diesem Fall, genau wie bei dem IPC-Zell-Knockout die Expression von *tobi* komplett reprimiert wurde. Als Kontrolle diente in diesem Fall *akh > LacZ*. In Tieren dieser Kontrolllinie wurde *tobi* wie auch in Wildtyp-Fliegen nahrungsabhängig reguliert (Abbildung 4.19 B, C). Zum Vergleich mit den bisherigen Ergebnissen wurden die *tobi*-Expressionslevels in Wildtyp-Fliegen mit semiquantitativer RT-PCR dargestellt (Abbildung 4.19 A).

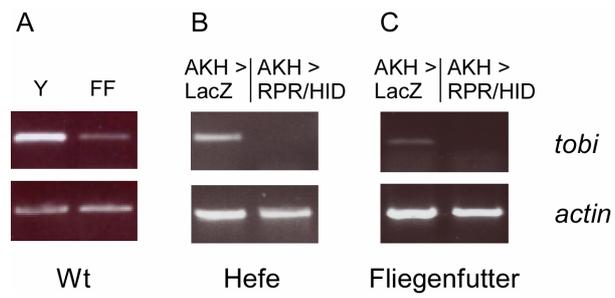


Abbildung 4.19: Nahrungsabhängige Expression von *tobi* in *akh*-defizienten Fliegen. (A) Nahrungsabhängige Expression in Wiltyp-Fliegen bei Gabe von Hefe (Y) und Fliegenfutter (FF). (B) Expression in der Kontrolllinie *akh > LacZ* und der *akh*-defizienten Linie *akh > rpr/hid*, gefüttert mit Hefe und (C) mit Fliegenfutter.

5 Diskussion

Die Erkrankung Diabetes ist Ärzten seit langer Zeit bekannt. Während bis zum Beginn des 20. Jahrhunderts eine Diagnose dieser Krankheit noch einen langsamen, sicheren Tod bedeutete, eröffnete die Entdeckung des Insulins durch Frederick Banting und Charles Best im Jahre 1921 eine Möglichkeit die Symptome des Diabetes zu behandeln. Seit dieser Zeit wurden viele Studien bezüglich des Insulins und seiner Wirkung im Organismus unternommen (Saltiel et al. 2001). Der zugehörige Signaltransduktionsweg wurde entdeckt und viele seiner Komponenten sind evolutionär hoch konserviert. Modellorganismen wie *Drosophila*, *C. elegans* und *Mus musculus* wurden zu Studien herangezogen, da sie ebenso wie der Mensch über Komponenten des Insulin-Signaltransduktionsweges verfügen (Garofalo 2002). Die Forschung arbeitet mit Hochdruck daran, weitere Komponenten mit Hilfe von Modellorganismen zu entdecken und homologe Gene im Menschen zu identifizieren. Ein detailliertes Verständnis der Insulinwirkung könnte dazu beitragen, neue Ansatzpunkte für die Therapie ernährungsbedingter Störungen wie z.B. Diabetes Mellitus oder Übergewicht zu finden. Es konnte auch gezeigt werden, dass Insulin bzw. Mitglieder der Insulin-Peptid Familie wie IGF-1 einen Effekt auf die Entwicklung und die Fruchtbarkeit des Organismus ausüben (Butler et al. 2001; Bartke et al. 2004). Zudem hat Insulin eine bedeutende Funktion in der Übermittlung von Signalen an das Gehirn, wo es als Neurohormon die Regulation der Nahrungsaufnahme beeinflusst (Schwartz et al. 2005).

In dieser Arbeit wurden in der Fruchtfliege die Insulin-produzierenden Zellen des Gehirns zerstört und der Effekt auf den Metabolismus untersucht. Im Gegensatz zu vorherigen Studien wurde der Fokus auf die erwachsene Fliege gerichtet. So sollte herausgefunden werden, welche metabolischen Konsequenzen daraus resultieren und wie messbare Parameter wie Körperkomposition, Fertilität und Lebensdauer beeinflusst wurden.

Eine der Aufgaben von Insulin ist die Anpassung des Metabolismus an unterschiedliche Nahrungsbedingungen. Wie sich diese gestaltet, sollte durch die Verwendung von Futterquellen untersucht werden, die sich vor allem durch den Anteil an Proteinen und Kohlenhydraten unterscheiden. Heutzutage ist die Frage nach der richtigen, - gesunden - Ernährung wichtiger denn je, da das Problem der Fehlernährung der modernen Gesellschaft viele, teils dramatische Konsequenzen verursacht. Zwar kann der Nahrungsbedarf einer Fruchtfliege nicht mit dem des Menschen verglichen werden, aber die grundlegenden metabolischen Folgen auf den Organismus können dadurch untersucht werden.

Ein weiterer Ansatz war die genomweite Suche nach Zielgenen einer verminderten Insulin-Signalwirkung und der Versuch, diese zu charakterisieren.

5.1 Die Expression der *dilps* in neuroendokrinen Zellen des Gehirns verdeutlicht ihre Funktion als hormonellen Mediator

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass alle im Gehirn produzierten *dilps* in denselben neuroendokrinen Zellen im medianen Teil des Protocerebrums exprimiert werden. In der Larve senden diese Insulin-produzierenden Zellen (IPCs) unter anderem axonale Prozesse zum subösophagealen Ganglion und in die Ringdrüse. Die Ringdrüse ist das wichtigste endokrine Organ der Larve. Sie ist zum einen mit dem medianen Bereich des Gehirns verbunden, andererseits umschließt sie ringförmig die Aorta der Larve. Sie besteht aus der Corpora allata, der Corpora cardiaca und der Prothoraxdrüse. In ihr werden wichtige Hormone wie Ecdyson und Juveniles Hormon aber auch Glucagon und Insulin produziert bzw. gespeichert und von dort in den Körper sezerniert (Richard et al. 1991; Rulifson et al. 2002). Im adulten Tier ist die Ringdrüse als solche nicht mehr vorhanden. Während der Metamorphose wandert sie posterior, und heftet sich letztendlich anterior des Proventriculus an den Ösophagus; die Prothoraxdrüse degradiert (Dai et al. 1991). In Adulten bleibt die neuronale Verbindung der Insulin-produzierenden Zellen mit den Corpora cardiaca Zellen erhalten. In diesen Zellen wird das Glucagonhomolog *akh* exprimiert (Kim et al. 2004; Lee et al. 2004). Die *akh*-produzierenden Zellen senden wiederum Prozesse zum Gehirn und zum Proventriculus. Die Verbindung von Insulin- und *akh*-produzierenden Zellen wurde als funktionelles Analog der α - und β -Zellen des Säuger-Pankreas angesehen. So zeigte eine Studie, dass Insulin in den Zellen der Corpora cardiaca gespeichert werden kann (Rulifson et al. 2002). Die Erkenntnisse dieser Arbeit zeigen, dass das IPC-AKH-Netzwerk auch in adulten Fliegen eine zentrale Rolle spielt.

5.2 Die Verwendung des *dilp3*-Promoters ermöglicht die Zerstörung der IPCs spät in der larvalen Entwicklung

Durch die Studie der larvalen Expression der *dilps* wurde gezeigt, dass *dilp3* zum einen das am schwächsten exprimierte Gehirn-Insulin war und zum anderen mit jedem Larvenstadium einer stetigen Induktion unterlag. Dies lässt darauf schließen, dass *dilp3* in der Larve eine eher untergeordnete Rolle spielt. Viel wahrscheinlicher ist, dass seine Funktion während des

Puppenstadiums oder sogar erst im adulten Tier an Bedeutung gewinnt. Diese erst sehr spät ausreichend eintretende Expression wurde dazu genutzt, die IPCs mittels Expression von *rpr* und *hid* unter Kontrolle der *dilp3*-Promotoraktivität zu zerstören. Es zeigte sich, dass die IPCs in Larven des dritten Stadiums kurz vor der Verpuppung noch in der Lage waren, *dilp3* mRNA zu exprimieren. Zu diesem Zeitpunkt war die Promotoraktivität noch nicht stark genug, eine Apoptose zu induzieren. In den Adulten hingegen war keine Expression von *dilp3*-mRNA mehr möglich, da die IPCs zerstört waren. Die resultierenden Fliegen zeigten keine Verlängerung ihrer larvalen Entwicklungszeit. Die alleinige Verwendung von *rpr* resultierte nur in einer teilweisen Zerstörung der IPCs in den adulten Tieren. Dies ist ebenfalls durch die schwache Promotoraktivität zu erklären. In vorhergegangenen Studien, die einen Teil des *dilp2*-Promotors zur Expression von *rpr* verwendeten, wurden die IPCs bereits während der larvalen Entwicklung zerstört (Ikeya et al. 2002; Rulifson et al. 2002). Dies steht in absolutem Einklang mit der Tatsache, dass *dilp2* zum einen das am stärksten larval exprimierte Insulin ist und zum anderen schon sehr früh in der Entwicklung in ausreichendem Maß verfügbar ist.

Mit diesem experimentellen Ansatz war es nun möglich, den Effekt der Insulin-Defizienz in Adulten getrennt von entwicklungsabhängigen Effekten zu betrachten.

5.3 Die Körperphysiologie ist abhängig von Insulin und der Nahrungsbedingung

Bei der Untersuchung verschiedener Körperparameter zeigte sich bei den Kontrollfliegen ein deutlicher Unterschied zwischen Tieren, die Fliegenfutter als Nahrung erhielten und denen, die mit Hefesuspension gefüttert wurden. Hefe ist eine sehr proteinreiche Nahrungsquelle die wenige Kohlenhydrate enthält, während Fliegenfutter proteinarm ist, dafür aber viele Kohlenhydrate in Form von Disacchariden (Zuckerrübensaft) und Stärke (Maismehl) enthält. In dieser Arbeit wurden vor allem Weibchen untersucht und es ist bekannt, dass sie zur Eiproduktion auf Proteine als Nahrungsquelle angewiesen sind (Terashima et al. 2004).

Die gemessenen Körperparameter zeigten eine Korrelation zwischen den im Futter angebotenen Nährstoffen und den im Körper gespeicherten Energiedepots. Bei einer kohlenhydratreichen Ernährung kam es vermehrt zu einer Speicherung von Glycogen, der Speicherform von Kohlenhydraten. Die Lipidreserven waren ebenfalls erhöht, da in Zeiten des Überflusses der Körper dazu neigt, die aufgenommenen Nährstoffe in Fettreserven umzuwandeln. Aufgrund der hydrophoben Eigenschaft von Fett ist dies für den Organismus

wesentlich günstiger als Reserven in Glycogen anzulegen. Glycogen ist extrem hydrophil und so muss der Körper mit dem Glycogen ebenfalls eine entsprechende Menge Wasser aufnehmen. Der Glycogenspeicher kann dafür wesentlich schneller auf- und abgebaut werden als ein Fettdepot, was auch erklärt, dass er bei Fliegen, die einer kohlenhydratarmen Diät ausgesetzt waren, deutlich schneller abgebaut wurde als die Lipide. Die Betrachtung des Proteingehalts der Fliegen zeigte ebenfalls eine Korrelation mit der in der Nahrung angebotenen Proteinmenge. Es ist bekannt, dass Fliegen bei proteinreichem Futter mehr Eier legen und dies wird auch durch die Größe der Ovarien der verwendeten Fliegen bestätigt. So erscheint es auch logisch, dass Fliegen mit einer erhöhten Eiproduktion ein höheres Körpergewicht haben.

Bei der Betrachtung der Körperkomposition der IPC-defizienten Fliegen zeigten sich ähnliche Tendenzen wie in den Kontrolltieren. Es kam zu einer Erhöhung des Glycogenspeichers bei kohlenhydratreicher Nahrung und zu einer Erhöhung der Proteinmenge bei proteinreicher Nahrung. Im Fall der Lipidmenge war allerdings kein Unterschied bei unterschiedlicher Nahrung zu beobachten. Betrachtet man diese Effekte im Vergleich mit den Kontrollen fiel auf, dass die IPC-defizienten Fliegen sich nicht so gut an unterschiedliche Nahrungsbedingungen anpassen konnten. So erscheint es auch logisch, dass bei ihnen die Fettreserven keinen Unterschied bei Hefe und Fliegenfutter aufwiesen, da sie nicht so leicht ab- und aufgebaut werden können wie der Glycogenspeicher.

In diesem experimentellen Ansatz wurden alle Fliegen zunächst auf Fliegenfutter aufgezogen, und den experimentellen Futterbedingungen für zwei Tage ausgesetzt. Somit waren diejenigen Tiere, die auf Hefesuspension umgesetzt wurden, einem Wechsel der Nahrungsbedingung unterworfen, diejenigen auf Fliegenfutter jedoch nicht. Vergleicht man die Ergebnisse des Fliegenfutters mit denen der Hefe zeigen sich diejenigen metabolischen Anpassungen, die ein gesundes Tier innerhalb von zwei Tagen vornehmen kann. Würden diese Effekte stärker ausfallen, wenn man die Tiere für einen längeren Zeitraum dieser neuen Futterbedingung aussetzt? Andererseits könnten die Veränderungen bereits ihr mögliches Maximum erreicht haben und eine Verlängerung des Experimentes würde keine weitere Veränderung in den Energiespeichern der Tiere hervorrufen. Die Frage, die sich nun stellt ist folgende: Sind die IPC-defizienten Fliegen nicht in der Lage, sich den unterschiedlichen Nahrungsbedingungen anzupassen, oder brauchen sie einfach nur mehr Zeit? So wäre es interessant, das Experiment mit unterschiedlichen Inkubationszeiten zu wiederholen um die Adaptionsfähigkeit und -geschwindigkeit der IPC-defizienten Fliegen zu untersuchen.

In Säugern verursacht eine gestörte Insulin-Signaltransduktion eine Erhöhung des Glucosespiegels im Blut. In Insekten findet man neben Glucose auch das Disaccharid Trehalose in der Hämolymphe. Trehalose ist der hauptsächliche Blutzucker der Insekten und kann sehr schnell in Glucose umgewandelt werden (Nation 2002). Im Gegensatz zur Glucosekonzentration war die Trehalosekonzentration in der Hämolymphe Insulin-defizienter Fliegen leicht erhöht. In vorhergegangenen Veröffentlichungen konnte bereits eine Erhöhung des Blutzuckers bei *dilp2 > rpr* Fliegen gezeigt werden. Allerdings wurden in diesen Studien „nüchterne“ Fliegen untersucht (Broughton et al. 2005). Bereits ein Zeitraum von wenigen Stunden reicht aus, um die Fliege in diesen Zustand zu versetzen und es wäre sehr interessant, die oben genannten Messungen an Fliegen, denen für einige Zeit Fliegenfutter oder Hefe entzogen wurde, zu wiederholen.

5.4 Die Verminderung der Insulin-Signalwirkung beeinflusst die Lebensdauer nur bei bestimmten Nahrungsbedingungen

Der Einfluss des Insulin-Signaltransduktionsweges auf die Lebensdauer konnte bereits für Mutanten des Insulinrezeptors und des Insulin-Rezeptorsubstrats CHICO und für *dilp2 > rpr* Fliegen gezeigt werden (Clancy et al. 2001; Tatar et al. 2001; Broughton et al. 2005). Dieses Ergebnis konnte hier nur mit Einschränkungen bestätigt werden. Es zeigte sich, dass bei den verwendeten Nahrungsbedingungen nur die proteinreiche Nahrungsquelle Hefe einen lebensverlängernden Effekt auf die IPC-defizienten Fliegen im Vergleich zur Kontrolle ausübte. Die Verwendung von Fliegenfutter zeigte hingegen keinen Effekt auf die Lebensdauer. Die Betrachtung der Kontrollen zeigte deutlich, dass die mittlere Lebensdauer bei Gabe von Hefesuspension von 60 auf 27 Tage, und die totale Lebensdauer von 78 auf 47 Tage verkürzt wurde. Es ist bekannt, dass die Lebenserwartung abhängig von dem kalorischen Input (kalorische Restriktion) und der Zusammensetzung der Nahrung (diätische Restriktion) beeinflusst werden kann. Da es in der Fruchtfliege schwierig ist, die tatsächliche Nahrungsaufnahme festzustellen, kann an dieser Stelle nur vermutet werden, ob die Verkürzung der Lebensspanne bei Gabe von Hefe durch den höheren Proteinanteil oder durch eine vermehrte Nahrungsaufnahme erfolgte.

Auch im Fall der Insulin-defizienten Fliegen konnte ein solcher Effekt beobachtet werden, die mittlere Lebensspanne verkürzte sich von 61 auf 44 Tage und die totale Lebensspanne von 78 auf 62 Tage. Allerdings war die Verkürzung nicht so dramatisch wie in den Kontrollen. Bei teilweise IPC-defizienten Fliegen (*InsP3 > rpr*) konnte die Verwendung der

proteinreichen Nahrung die Lebensdauer nicht beeinflussen. Da jedoch das Experiment betreffend $\text{InsP3} > rpr$ anders durchgeführt wurde, kann man die absoluten Zahlen nicht mit denen vergleichen, die bei $\text{InsP3} > rpr/hid$ festgestellt wurden. Die Fliegen wurden nicht dreimal wöchentlich umgesetzt, sondern einmal täglich. Dies kann einen zusätzlichen Stressfaktor für die Tiere bedeuten. Die Kontrolltiere der beiden auf Hefe durchgeführten Experimente sollten eigentlich die gleiche Lebenserwartung besitzen, jedoch lebten die täglich umgesetzten Tiere 19 Tage länger. Aus diesem Grund müssen die bei der Analyse der $\text{InsP3} > rpr$ Fliegen erhaltenen Daten getrennt von den anderen Experimenten betrachtet werden.

Einige Studien postulieren, dass Langlebigkeit mit einer reduzierten Eiproduktion korreliert (Partridge et al. 2005). Es konnte auch gezeigt werden, dass Eiproduktion und Lebenserwartung entkoppelt auftreten können (Clancy et al. 2001). Die Messung der Fekundität zeigte keine signifikante Reduktion in der Zahl der von Insulin-defizienten Fliegen gelegten Eier. Da in dieser Arbeit die ersten 20 Tage untersucht wurden, könnte es zum Beispiel passieren, dass im späteren Leben Unterschiede auftreten. So wäre es zum Beispiel vorstellbar, dass die Insulin-defizienten Tiere durch die erhöhte Lebensspanne länger in der Lage sind Eier zu produzieren als die Kontrollfliegen. Ebenfalls vorstellbar wäre ein Szenario, in dem die Fliegen früher als die Kontrollen mit der Eiproduktion aufhören und dadurch einen Überlebensvorteil erhalten.

5.5 Charakterisierung des target of brain insulin

Die genomweite Expressionsanalyse Insulin-defizienter Fliegen führte zur Identifizierung einer α -Glucosidase, die bei den Insulin-defizienten Fliegen stark reprimiert wurde, jedoch auch durch die Wahl der Nahrung beeinflusst werden konnte. Die Expression dieses Gens ist nicht nur von der Anwesenheit der Insulin-produzierenden Zellen abhängig, sondern auch von deren Vermögen, Signale weiterzuleiten (siehe 4.5.2 $\text{InsP3} > \text{TetxLc}$), als auch von der Anwesenheit der *dilps* in diesen Zellen (siehe 4.5.3 *dilp3*-RNAi). Dies verdeutlicht, dass das Signal, welches die Expression der α -Glucosidase reguliert von den IPCs stammt, und dass es durch Insulin weitergegeben wird, welches als Neurohormon auf den Organismus wirkt. Bisher ist die α -Glucosidase weitgehend uncharakterisiert. Sie erhielt den Namen „target of brain Insulin“, da sie auf das Insulin der IPCs reagiert. Homologe Gene konnten in vielen anderen Spezies identifiziert werden. Doch ist auch in den meisten Organismen nicht mehr bekannt, als dass es sich um eine α -Glucosidase handelt. Diese Konservierung deutet darauf

hin, dass es sich bei diesem Gen um ein wichtiges Schlüsselenzym innerhalb des Organismus handelt. Die weitere Charakterisierung von *tobi* in *Drosophila* kann möglicherweise auch Hinweise auf seine Funktion im menschlichen Organismus liefern.

Die Expression von *tobi* wurde in Adulten im Darm und im Fettkörper nachgewiesen. Die Expression im Darm bezog sich auf einen deutlich abgegrenzten Bereich. Die genaue Funktion dieses Bereichs ist nicht klar, jedoch konnte gezeigt werden, dass der Darm bei *Drosophila* aus unterschiedlich rezeptiven Bereichen besteht (Strasburger 1932).

Wahrscheinlich werden in dieser Region des Darms vermehrt Kohlenhydrate aufgenommen und die α -Glucosidase wird am Ort ihres Bedarfs produziert. Die erhöhte Expression von *tobi* bei kohlenhydratarmer Nahrung könnte nötig sein, um den kaum vorhandenen Zucker in der Nahrung effektiver spalten und somit dem Körper zur Verfügung stellen zu können. Der Fettkörper nimmt bei *Drosophila* als Leberhomolog eine wichtige Rolle ein. In ihm werden nicht nur Glycogen und Lipide gespeichert. Er agiert zudem auch als Nahrungssensor, der das Wachstum des Organismus in der Larve koordiniert (Colombani et al. 2003). Die Expression der α -Glucosidase im Fettkörper deutet darauf hin, dass sie in den Abbau von Glycogen involviert ist. Bei der Aufnahme kohlenhydratarmer Nahrung muss der Organismus Energie aus körpereigenen Reserven gewinnen. Dies geschieht zunächst durch den Abbau der Glycogenreserven, dann folgen die Fettreserven. In Insulin-defizienten Fliegen ist keine Expression der α -Glucosidase nachweisbar. Auch konnte gezeigt werden, dass diese Tiere bei Gabe von Hefesuspension nicht in der Lage waren, ihre Glycogenreserven so stark zu vermindern wie die Kontrollen. Entweder haben diese Tiere kein Bedarf an Energie aus eigenen Reserven oder aber diejenigen Mechanismen, die solche Vorgänge auslösen, sind gestört.

TOBI ist nicht die einzige α -Glucosidase in *Drosophila*. Dies erklärt, warum die Insulin-defizienten Fliegen trotzdem, wenn auch in geringerem Maß in der Lage sind, Glycogen abzubauen. Die Familie der α -Glucosidasen ist allgemein als Enzymgruppe definiert, die in die Spaltung endständiger 1,4- α -glucosidischer Bindungen involviert ist. Beim Menschen wird die saure von der neutralen α -Glucosidase unterschieden. Die saure Variante spaltet Glycogen in den Lysosomen der Zellen, die neutrale ist ein sezerniertes Darmenzym, das Disaccharide und Oligosaccharide spaltet. Die Expression von *tobi* in Glycogen-haltigen Zellen und im Darm deutet darauf hin, dass es in der Fliege beide Funktionen erfüllen könnte. Betrachtet man das Expressionsmuster von *tobi*, zeigt sich, dass es vor allem im Darm exprimiert wird. Es ist zu vermuten, dass aufgrund der Präparationsmethode sehr viel loses

Material verloren gegangen ist, und in den Adulten nur diejenigen Fettkörper erhalten blieben, die fest an den übrigen Geweben verankert waren. Tatsächlich kann so keine Aussage darüber getroffen werden, ob alle Fettkörper der Adulten *tobi* exprimieren, und ob die Hauptmenge an exprimiertem *tobi* nicht vielleicht doch aus dem Fettkörper stammen könnte.

Interessanterweise existiert auch im Menschen ein *tobi*-Homolog. Es bleibt allerdings noch festzustellen, ob dieses Gen im Menschen aktiv ist und ob es ebenfalls Nahrungs- und Insulin-abhängig reguliert wird.

5.6 *tobi* wird abhängig von der Proteinkonzentration reguliert

Es konnte gezeigt werden, dass die *tobi*-Expression durch unterschiedliche Protein- und Kohlenhydratkonzentrationen reguliert wird. Dabei ist der beobachtete Effekt von Proteinen wesentlich stärker als der von Kohlenhydraten. Die *tobi*-Expression korrelierte bis zur Sättigung direkt mit der Proteinmenge, während sie bei einem sinkenden Kohlenhydratgehalt wieder anstieg. Es bleibt allerdings zu beachten, dass bei dem experimentellen Ansatz trotz einer Reduktion der angebotenen Proteinmenge immer noch genügend Saccharose als Futterquelle zur Verfügung gestellt wurde und damit ein Hungereffekt vermieden wurde. Dies war bei den Zuckerverdünnungen nicht der Fall, hier könnte eine Induktion durch Hunger der Fall sein. Dieser Effekt konnte ebenso bei Gabe von Mono- als auch von Disacchariden beobachtet werden. Wäre die Steuerung der Expression von *tobi* direkt von den Zuckern im Nahrungsbrei des Darms abhängig, sollte es durch Disaccharide aktiviert werden. Dies ist hier aber nicht der Fall. Vielmehr hat es den Anschein, dass der Energiestatus des Körpers von einer übergeordneten Instanz verarbeitet wird und diese dann die Information weiterleitet, die letztendlich zur Induktion von *tobi* führt. Wenn der Organismus hungert, dann wird ein Sparprogramm eingeleitet, das die überlebenswichtigen Prozesse fördert und die weniger wichtigen hemmt. Die Tatsache, dass *tobi* in einer zunehmenden Hungersituation induziert wird, unterstreicht seine essentielle Bedeutung im Organismus.

Betrachtet man den Effekt einer proteinreichen Ernährung auf die weibliche Fliege, so fällt die Aufmerksamkeit sofort auf die Eiproduktion. Die Ovarien nehmen an Größe zu und es werden wesentlich mehr Eier gelegt. Dies macht auch Sinn, da die Tiere das in der Nahrung enthaltene Protein zur Eiproduktion benötigen. Solche Vorgänge kosten den Körper natürlich auch sehr viel Energie. Das könnte erklären, dass *tobi* bei einer zunehmenden Proteinmenge induziert wird. Es beschafft die nötige Energie durch Glycogenabbau im Fettkörper und im Darm spaltet es effektiver die vorhandenen Di- und Oligosaccharide, die dann in die Hämolymphe aufgenommen werden können.

Eine klinische Studie beschäftigte sich mit den insulinotropen Eigenschaften von verschiedenen Proteinen. So konnte unter anderem für das Milchprotein Casein nachgewiesen werden, dass es die Insulin-Sekretion stimulieren kann (Nilsson et al. 2004). Die Fliegen in dem hier verwendeten experimentellen Ansatz wurden verschiedenen Verdünnungen von Hefeextrakt und Casein ausgesetzt. Wenn Casein in der Fliege ebenfalls die Ausschüttung von Insulin induziert, kann dies zu einer erhöhten Expression von *tobi* führen. Falls Hefe eine ähnliche insulinotrope Eigenschaft wie Casein aufweist, erklärt das ebenfalls die Korrelation zwischen Proteinkonzentration und *tobi*-Induktion.

Die in Wildtypen beobachteten Effekte bezüglich der nahrungsabhängigen Regulation von *tobi* konnten in den Kontrollen reproduziert werden. In den Insulin-defizienten Fliegen konnte allerdings in keiner der untersuchten Bedingungen eine Induktion von *tobi* aufgezeigt werden. Dies zeigt deutlich, dass die IPCs unbedingt erforderlich sind, um das *tobi*-induzierende Signal weiterzuleiten. Zudem konnte gezeigt werden, dass bei einer Zerstörung der *akh*-produzierenden Zellen durch *rpr* und *hid* ebenfalls eine starke Repression von *tobi* auftrat. Dies bestärkt das Modell der IPCs und *akh*-Zellen als Pankreas-Homolog. Die beiden Zelltypen kommunizieren miteinander. Zusätzlich zu funktionierenden IPCs werden auch die *akh*-Zellen benötigt, um das Signal zur *tobi*-Induktion weiterzugeben. Sehr interessant wäre es nun, weitere Komponenten dieses Signalnetzwerks auf Zell- und Organebene mit Hilfe der Expression von *tobi* als Marker zu identifizieren.

5.7 *tobi* als negativer Effektor der Langlebigkeit?

Die erhaltenen Ergebnisse werfen ein interessantes Licht auf *tobi* in Bezug auf die Lebensdauer. Obwohl die beiden nicht exakt korrelieren zeichnen sich Tendenzen ab. Im Fall einer erhöhten *tobi*-Expression kommt es zu einer deutlichen Verkürzung in der Lebensdauer. Ist *tobi* reprimiert, leben die Tiere länger (Abbildung 5.1).

Kann *tobi* den Metabolismus beeinflussen und damit langfristig auch Einfluss auf die Lebenserwartung eines Organismus nehmen? Oder sind die beobachteten Effekte auf *tobi* und die Lebensdauer voneinander unabhängige Konsequenzen einer verminderten Insulin-Signalwirkung? Diese Fragen lassen sich an dieser Stelle nicht beantworten, liefern aber einen weiteren Ansatz zur Studie des durch den Insulin-Signaltransduktionsweg vermittelten Mechanismus des Alterns.

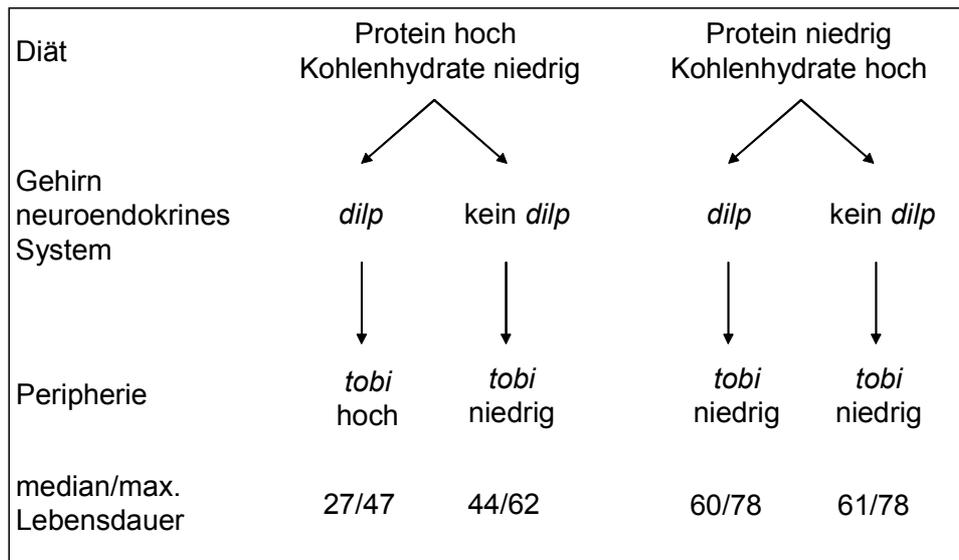


Abbildung 5.1: Zusammenhang der Nahrungsbedingung mit der Lebenserwartung und der Expression von *tobi* im normalen und IPC-defizienten Zustand. Es werden zwei unterschiedliche Nahrungsbedingungen gezeigt. Zum einen die proteinreiche und kohlenhydratarme Hefe und zum anderen das proteinarme und kohlenhydratreiche Fliegenfutter. In beiden Bedingungen wird *tobi* durch Abwesenheit der im Gehirn exprimierten Insuline reprimiert, zusätzlich wird es bei vorhandenem Insulin durch Fliegenfutter als Nahrungsquelle erniedrigt. Ist *tobi* erhöht, erniedrigt sich die Lebenserwartung deutlich.

5.8 Ausblick

Der Einfluss des Insulin-Signaltransduktionsweges, speziell der IPCs, auf die Körperphysiologie, die Lebensdauer und die Expression von Zielgenen konnte in dieser Arbeit anhand der Untersuchung weiblicher Fliegen gezeigt werden. Es ist bekannt, dass Männchen und Weibchen einen unterschiedlichen Bedarf an Energie und Nahrungskomponenten haben. So überleben weibliche Fliegen Perioden eines kompletten Nahrungsentzugs wesentlich länger als männliche. Zudem zeigten Mutationen des Insulin-Signaltransduktionsweges einen positiven Einfluss auf die weibliche Lebenserwartung, nicht aber auf die männliche. Könnten sich die in dieser Arbeit festgestellten Effekte einer Insulin-Defizienz in Männchen anders ausprägen? Um dies festzustellen, müssen weitere Untersuchungen durchgeführt werden. In vorläufigen Experimenten zeigte sich bereits, dass in Männchen durch Insulin-Defizienz kein positiver Effekt auf die Lebenserwartung entstand. Allerdings bleibt noch offen, inwiefern die Körperphysiologie betroffen ist. Bezüglich der *tobi*-Expression in IPC-defizienten männlichen Fliegen konnte bisher zumindest kein Unterschied zu den Weibchen festgestellt werden. Die Lebensdauer in Weibchen könnte von anderen Parametern abhängen, als die von Männchen.

Kann man die erhaltenen Daten auf den Säuger übertragen, für den bereits gezeigt werden konnte, dass der Insulin-Signaltransduktionsweg eine Rolle beim Alterungsprozess spielt?

Durch Verwendung einer transgenen Fliegenlinie, die *tobi*-RNAi exprimiert wird es möglich *tobi* aus dem Organismus zu entfernen. Der resultierende Phänotyp kann mit dem von Mutanten des Insulin-Signalweges verglichen werden. Durch Verwendung eines Fettkörper-spezifischen Promotors kann *tobi*-RNAi selektiv im Fettkörper exprimiert werden. In diesem Fall könnte man die Funktion der α -Glucosidase im Darm intakt halten und getrennt vom der Funktion im Fettkörper betrachten.

Die Frage nach der genauen Rolle von *tobi* im Organismus, speziell als mögliche Komponente des Insulin-Signaltransduktionsweges bietet einen interessanten Ansatzpunkt für künftige Studien.

6 Anhang

6.1 Literaturverzeichnis

Antonetti, D. A., P. Algenstaedt and C. R. Kahn (1996). "Insulin receptor substrate 1 binds two novel splice variants of the regulatory subunit of phosphatidylinositol 3-kinase in muscle and brain." *Mol Cell Biol* **16**(5): 2195-203.

Bartke, A. and H. Brown-Borg (2004). "Life extension in the dwarf mouse." *Curr Top Dev Biol* **63**: 189-225.

Bauer, M. (2004). "Untersuchung ernährungsabhängiger Expressionsprofile im Transkriptom der murinen Leber (*Mus musculus*) und Larven des Zebrafisch (*Danio rerio*)." Dissertation Universität Heidelberg.

Blundell, T. L. and R. E. Humbel (1980). "Hormone families: pancreatic hormones and homologous growth factors." *Nature* **287**(5785): 781-7.

Böhni, R., J. Riesgo-Escovar, S. Oldham, W. Brogiolo, H. Stocker, B. F. Andruss, K. Beckingham and E. Hafen (1999). "Autonomous control of cell and organ size by CHICO, a *Drosophila* homolog of vertebrate IRS1-4." *Cell* **97**(7): 865-75.

Brazil, D. P., Z. Z. Yang and B. A. Hemmings (2004). "Advances in protein kinase B signalling: AKTion on multiple fronts." *Trends Biochem Sci* **29**(5): 233-42.

Britton, J. S. and B. A. Edgar (1998). "Environmental control of the cell cycle in *Drosophila*: nutrition activates mitotic and endoreplicative cells by distinct mechanisms." *Development* **125**(11): 2149-58.

Britton, J. S., W. K. Lockwood, L. Li, S. M. Cohen and B. A. Edgar (2002). "*Drosophila*'s insulin/PI3-kinase pathway coordinates cellular metabolism with nutritional conditions." *Dev Cell* **2**(2): 239-49.

Brogiolo, W., H. Stocker, T. Ikeya, F. Rintelen, R. Fernandez and E. Hafen (2001). "An evolutionarily conserved function of the *Drosophila* insulin receptor and insulin-like peptides in growth control." *Curr Biol* **11**(4): 213-21.

Broughton, S. J., M. D. Piper, T. Ikeya, T. M. Bass, J. Jacobson, Y. Driege, P. Martinez, E. Hafen, D. J. Withers, S. J. Leivers, et al. (2005). "Longer lifespan, altered metabolism, and stress resistance in *Drosophila* from ablation of cells making insulin-like ligands." *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**(8): 3105-10.

Buch, S. (2002). "Funktion und Regulation von Insulin-artigen Genen in *Drosophila melanogaster* (Meigen)." Diplomarbeit **Universität Karlsruhe**.

Butler, A. A. and D. LeRoith (2001). "Minireview: tissue-specific versus generalized gene targeting of the *igf1* and *igf1r* genes and their roles in insulin-like growth factor physiology." *Endocrinology* **142**(5): 1685-8.

- Chen, C., J. Jack and R. S. Garofalo** (1996). "The Drosophila insulin receptor is required for normal growth." *Endocrinology* **137**(3): 846-56.
- Cho, K. S., J. H. Lee, S. Kim, D. Kim, H. Koh, J. Lee, C. Kim, J. Kim and J. Chung** (2001). "Drosophila phosphoinositide-dependent kinase-1 regulates apoptosis and growth via the phosphoinositide 3-kinase-dependent signaling pathway." *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**(11): 6144-9.
- Clancy, D. J., D. Gems, L. G. Harshman, S. Oldham, H. Stocker, E. Hafen, S. J. Leivers and L. Partridge** (2001). "Extension of life-span by loss of CHICO, a Drosophila insulin receptor substrate protein." *Science* **292**(5514): 104-6.
- Colombani, J., S. Raisin, S. Pantalacci, T. Radimerski, J. Montagne and P. Leopold** (2003). "A nutrient sensor mechanism controls Drosophila growth." *Cell* **114**(6): 739-49.
- Cross, D. A., D. R. Alessi, P. Cohen, M. Andjelkovich and B. A. Hemmings** (1995). "Inhibition of glycogen synthase kinase-3 by insulin mediated by protein kinase B." *Nature* **378**(6559): 785-9.
- Dai, J. D. and L. I. Gilbert** (1991). "Metamorphosis of the corpus allatum and degeneration of the prothoracic glands during the larval-pupal-adult transformation of *Drosophila melanogaster*: a cytophysiological analysis of the ring gland." *Dev Biol* **144**(2): 309-26.
- Dorman, J. B., B. Albinder, T. Shroyer and C. Kenyon** (1995). "The age-1 and daf-2 genes function in a common pathway to control the lifespan of *Caenorhabditis elegans*." *Genetics* **141**(4): 1399-406.
- Fernandez, R., D. Tabarini, N. Azpiazu, M. Frasch and J. Schlessinger** (1995). "The Drosophila insulin receptor homolog: a gene essential for embryonic development encodes two receptor isoforms with different signaling potential." *Embo J* **14**(14): 3373-84.
- Finch, C. E. and G. Ruvkun** (2001). "The genetics of aging." *Annu Rev Genomics Hum Genet* **2**: 435-62.
- Fruman, D. A., L. C. Cantley and C. L. Carpenter** (1996). "Structural organization and alternative splicing of the murine phosphoinositide 3-kinase p85 alpha gene." *Genomics* **37**(1): 113-21.
- Gao, X., T. P. Neufeld and D. Pan** (2000). "Drosophila PTEN regulates cell growth and proliferation through PI3K-dependent and -independent pathways." *Dev Biol* **221**(2): 404-18.
- Gao, X. and D. Pan** (2001). "TSC1 and TSC2 tumor suppressors antagonize insulin signaling in cell growth." *Genes Dev* **15**(11): 1383-92.
- Garofalo, R. S.** (2002). "Genetic analysis of insulin signaling in Drosophila." *Trends Endocrinol Metab* **13**(4): 156-62.
- Giannakou, M. E., M. Goss, M. A. Junger, E. Hafen, S. J. Leivers and L. Partridge** (2004). "Long-lived Drosophila with overexpressed dFOXO in adult fat body." *Science* **305**(5682): 361.
- Hamm, A.** (2005). "Untersuchung nahrungsinduzierter Änderungen des Expressionsprofils der Maus (*Mus musculus*)." Dissertation Universität Karlsruhe.

- Hetru, C., K. W. Li, P. Bulet, M. Lagueux and J. A. Hoffmann** (1991). "Isolation and structural characterization of an insulin-related molecule, a predominant neuropeptide from *Locusta migratoria*." *Eur J Biochem* **201**(2): 495-9.
- Huang, H., C. J. Potter, W. Tao, D. M. Li, W. Brogiolo, E. Hafen, H. Sun and T. Xu** (1999). "PTEN affects cell size, cell proliferation and apoptosis during *Drosophila* eye development." *Development* **126**(23): 5365-72.
- Hwangbo, D. S., B. Gershman, M. P. Tu, M. Palmer and M. Tatar** (2004). "*Drosophila* dFOXO controls lifespan and regulates insulin signalling in brain and fat body." *Nature* **429**(6991): 562-6.
- Ikeya, T., M. Galic, P. Belawat, K. Nairz and E. Hafen** (2002). "Nutrient-dependent expression of insulin-like peptides from neuroendocrine cells in the CNS contributes to growth regulation in *Drosophila*." *Curr Biol* **12**(15): 1293-300.
- Jäckel, J.** (2003). "Calibration and averaging for multiple scanned cDNA microarrays." German Conference on Bioinformatics 2003, Munich, Germany.
- Jünger, M. A., F. Rintelen, H. Stocker, J. D. Wasserman, M. Vegh, T. Radimerski, M. E. Greenberg and E. Hafen** (2003). "The *Drosophila* forkhead transcription factor FOXO mediates the reduction in cell number associated with reduced insulin signaling." *J Biol* **2**(3): 20.
- Katzenberger, J.** (2004). "Etablierung eines Systems zur genomweiten Analyse nahrungsabhängig regulierter Gene in der Fruchtfliege *Drosophila melanogaster*." Dissertation Universität Karlsruhe.
- Kawakami, A., M. Iwami, H. Nagasawa, A. Suzuki and H. Ishizaki** (1989). "Structure and organization of four clustered genes that encode bombyxin, an insulin-related brain secretory peptide of the silkworm *Bombyx mori*." *Proc Natl Acad Sci U S A* **86**(18): 6843-7.
- Kenyon, C., J. Chang, E. Gensch, A. Rudner and R. Tabtiang** (1993). "*A. C. elegans* mutant that lives twice as long as wild type." *Nature* **366**(6454): 461-4.
- Kerouz, N. J., D. Horsch, S. Pons and C. R. Kahn** (1997). "Differential regulation of insulin receptor substrates-1 and -2 (IRS-1 and IRS-2) and phosphatidylinositol 3-kinase isoforms in liver and muscle of the obese diabetic (*ob/ob*) mouse." *J Clin Invest* **100**(12): 3164-72.
- Kim, S. K. and E. J. Rulifson** (2004). "Conserved mechanisms of glucose sensing and regulation by *Drosophila corpora cardiaca* cells." *Nature* **431**(7006): 316-20.
- Kimura, K. D., H. A. Tissenbaum, Y. Liu and G. Ruvkun** (1997). "*daf-2*, an insulin receptor-like gene that regulates longevity and diapause in *Caenorhabditis elegans*." *Science* **277**(5328): 942-6.
- Krymskaya, V. P.** (2003). "Tumour suppressors hamartin and tuberlin: intracellular signalling." *Cell Signal* **15**(8): 729-39.
- Lee, G. and J. H. Park** (2004). "Hemolymph sugar homeostasis and starvation-induced hyperactivity affected by genetic manipulations of the adipokinetic hormone-encoding gene in *Drosophila melanogaster*." *Genetics* **167**(1): 311-23.

- Leevers, S. J., D. Weinkove, L. K. MacDougall, E. Hafen and M. D. Waterfield** (1996). "The Drosophila phosphoinositide 3-kinase Dp110 promotes cell growth." *Embo J* **15**(23): 6584-94.
- Maehama, T. and J. E. Dixon** (1999). "PTEN: a tumour suppressor that functions as a phospholipid phosphatase." *Trends Cell Biol* **9**(4): 125-8.
- Marin-Hincapie, M. and R. S. Garofalo** (1999). "The carboxyl terminal extension of the Drosophila insulin receptor homologue binds IRS-1 and influences cell survival." *J Biol Chem* **274**(35): 24987-94.
- Montagne, J., M. J. Stewart, H. Stocker, E. Hafen, S. C. Kozma and G. Thomas** (1999). "Drosophila S6 kinase: a regulator of cell size." *Science* **285**(5436): 2126-9.
- Mora, A., D. Komander, D. M. van Aalten and D. R. Alessi** (2004). "PDK1, the master regulator of AGC kinase signal transduction." *Semin Cell Dev Biol* **15**(2): 161-70.
- Morris, J. Z., H. A. Tissenbaum and G. Ruvkun** (1996). "A phosphatidylinositol-3-OH kinase family member regulating longevity and diapause in *Caenorhabditis elegans*." *Nature* **382**(6591): 536-9.
- Nakae, J., B. C. Park and D. Accili** (1999). "Insulin stimulates phosphorylation of the forkhead transcription factor FKHR on serine 253 through a Wortmannin-sensitive pathway." *J Biol Chem* **274**(23): 15982-5.
- Nation, J. L.** (2002). *Insect physiology and biochemistry*. Boca Raton Fla., CRC Press.
- Nilsson, M., M. Stenberg, A. H. Frid, J. J. Holst and I. M. Bjorck** (2004). "Glycemia and insulinemia in healthy subjects after lactose-equivalent meals of milk and other food proteins: the role of plasma amino acids and incretins." *Am J Clin Nutr* **80**(5): 1246-53.
- Oldham, S., J. Montagne, T. Radimerski, G. Thomas and E. Hafen** (2000). "Genetic and biochemical characterization of dTOR, the Drosophila homolog of the target of rapamycin." *Genes Dev* **14**(21): 2689-94.
- Paradis, S., M. Ailion, A. Toker, J. H. Thomas and G. Ruvkun** (1999). "A PDK1 homolog is necessary and sufficient to transduce AGE-1 PI3 kinase signals that regulate diapause in *Caenorhabditis elegans*." *Genes Dev* **13**(11): 1438-52.
- Partridge, L., D. Gems and D. J. Withers** (2005). "Sex and death: what is the connection?" *Cell* **120**(4): 461-72.
- Partridge, L., M. D. Piper and W. Mair** (2005). "Dietary restriction in Drosophila." *Mech Ageing Dev* **126**(9): 938-50.
- Patti, M. E. and C. R. Kahn** (1998). "The insulin receptor--a critical link in glucose homeostasis and insulin action." *J Basic Clin Physiol Pharmacol* **9**(2-4): 89-109.
- Pessin, J. E. and A. R. Saltiel** (2000). "Signaling pathways in insulin action: molecular targets of insulin resistance." *J Clin Invest* **106**(2): 165-9.

- Pessin, J. E., D. C. Thurmond, J. S. Elmendorf, K. J. Coker and S. Okada** (1999). "Molecular basis of insulin-stimulated GLUT4 vesicle trafficking. Location! Location! Location!" *J Biol Chem* **274**(5): 2593-6.
- Pierce, S. B., M. Costa, R. Wisotzkey, S. Devadhar, S. A. Homburger, A. R. Buchman, K. C. Ferguson, J. Heller, D. M. Platt, A. A. Pasquinelli, et al.** (2001). "Regulation of DAF-2 receptor signaling by human insulin and ins-1, a member of the unusually large and diverse *C. elegans* insulin gene family." *Genes Dev* **15**(6): 672-86.
- Pschyrembel, W. and H. Hildebrandt** (1994). *Klinisches Wörterbuch : mit 268 Tabellen*. Berlin, de Gruyter.
- Raught, B., A. C. Gingras and N. Sonenberg** (2001). "The target of rapamycin (TOR) proteins." *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**(13): 7037-44.
- Richard, D. S. and L. I. Gilbert** (1991). "Reversible juvenile hormone inhibition of ecdysteroid and juvenile hormone synthesis by the ring gland of *Drosophila melanogaster*." *Experientia* **47**(10): 1063-6.
- Rulifson, E. J., S. K. Kim and R. Nusse** (2002). "Ablation of insulin-producing neurons in flies: growth and diabetic phenotypes." *Science* **296**(5570): 1118-20.
- Ruvkun, G. and O. Hobert** (1998). "The taxonomy of developmental control in *Caenorhabditis elegans*." *Science* **282**(5396): 2033-41.
- Saltiel, A. R. and C. R. Kahn** (2001). "Insulin signalling and the regulation of glucose and lipid metabolism." *Nature* **414**(6865): 799-806.
- Schmidt, R. F. and G. Thews** (1980). *Physiologie des Menschen*. Berlin, Heidelberg, New York, Springer.
- Schwartz, M. W. and D. Porte, Jr.** (2005). "Diabetes, obesity, and the brain." *Science* **307**(5708): 375-9.
- Skolnik, E. Y., A. Batzer, N. Li, C. H. Lee, E. Lowenstein, M. Mohammadi, B. Margolis and J. Schlessinger** (1993). "The function of GRB2 in linking the insulin receptor to Ras signaling pathways." *Science* **260**(5116): 1953-5.
- Smit, A. B., E. Vreugdenhil, R. H. Ebberink, W. P. Geraerts, J. Klootwijk and J. Joosse** (1988). "Growth-controlling molluscan neurons produce the precursor of an insulin-related peptide." *Nature* **331**(6156): 535-8.
- Strasburger, M.** (1932). "Bau, Funktion und Variabilität des Darmtraktes von *Drosophila melanogaster* Meigen." *Zeitschrift für wissenschaftliche Zoologie*. Leipzig **140**: 539-649.
- Sweeney, S. T., K. Broadie, J. Keane, H. Niemann and C. J. O'Kane** (1995). "Targeted expression of tetanus toxin light chain in *Drosophila* specifically eliminates synaptic transmission and causes behavioral defects." *Neuron* **14**(2): 341-51.
- Tatar, M., A. Kopelman, D. Epstein, M. P. Tu, C. M. Yin and R. S. Garofalo** (2001). "A mutant *Drosophila* insulin receptor homolog that extends life-span and impairs neuroendocrine function." *Science* **292**(5514): 107-10.

- Terashima, J. and M. Bownes** (2004). "Translating available food into the number of eggs laid by *Drosophila melanogaster*." *Genetics* **167**(4): 1711-9.
- Thomas, G. and M. N. Hall** (1997). "TOR signalling and control of cell growth." *Curr Opin Cell Biol* **9**(6): 782-7.
- Verdu, J., M. A. Buratovich, E. L. Wilder and M. J. Birnbaum** (1999). "Cell-autonomous regulation of cell and organ growth in *Drosophila* by Akt/PKB." *Nat Cell Biol* **1**(8): 500-6.
- Wang, M. C., D. Bohmann and H. Jasper** (2005). "JNK extends life span and limits growth by antagonizing cellular and organism-wide responses to insulin signaling." *Cell* **121**(1): 115-25.
- Weindruch, R., R. L. Walford, S. Fligiel and D. Guthrie** (1986). "The retardation of aging in mice by dietary restriction: longevity, cancer, immunity and lifetime energy intake." *J Nutr* **116**(4): 641-54.
- Weinkove, D., T. P. Neufeld, T. Twardzik, M. D. Waterfield and S. J. Leever** (1999). "Regulation of imaginal disc cell size, cell number and organ size by *Drosophila* class I(A) phosphoinositide 3-kinase and its adaptor." *Curr Biol* **9**(18): 1019-29.
- White, M. F. and L. Yenush** (1998). "The IRS-signaling system: a network of docking proteins that mediate insulin and cytokine action." *Curr Top Microbiol Immunol* **228**: 179-208.
- Wu, Q. and M. R. Brown** (2006). "Signaling and function of insulin-like peptides in insects." *Annu Rev Entomol* **51**: 1-24.
- Zhang, H., J. P. Stallock, J. C. Ng, C. Reinhard and T. P. Neufeld** (2000). "Regulation of cellular growth by the *Drosophila* target of rapamycin dTOR." *Genes Dev* **14**(21): 2712-24.

6.2 Abkürzungsverzeichnis

AGE-1	AGEing alteration 1
akh	Adipokinetisches Hormon
Akt/PKB	Phosphokinase B
APS	adaptor protein with pleckstrin homology and src
BAD	BCL2-antagonist of cell death
CBL	Casitas B-lineage lymphoma
cDNS	copy DNS
CNS	zentrales Nervensystem
CT	counts
Cy	curly Markergen
CyO	Balancer mit Cy
d3Ri	transgene <i>dilp3</i> RNAi-UAS-Linie
Daf-18	dauer formation-18
DAF-2	dauer formation-2
dilps	<i>Drosophila</i> insulin-like peptides
dINR	<i>Drosophila</i> Insulin-Rezeptor
ddH ₂ O	bidestilliertes Wasser
DEPC	Diethyl-Pyrocbonat
dH ₂ O	einfach destilliertes Wasser
DNS	Desoxyribonukleinsäure
F1	erste Filial-Generation
FISH	Fluoreszenz- <i>in situ</i> Hybridisierung
FOXO	forkhead box, sub-group O
Gab-1	GRB2-associated binding protein 1
GLUT4	glucose transporter 4
Grb2	growth factor receptor bound protein 2
GSK-3	glycogen synthase kinase 3
HID	Apoptosefaktor
hINR	menschlicher Insulin-Rezeptor
IGF-I/II	insulin-like growth factor
InsP3-Gal4	transgene <i>dilp3</i> -Promoterlinie

IPCs	Insulin-produzierende Zellen
IRR	insulin receptor-related receptor
IRS1-4	insulin receptor substrates
JNK	Jun-N-terminale Kinase
MAPK	mitogen-activated protein kinase
mNSCs	median neurosecretory cells
mRNS	messenger Ribonucleinsäure
PDK-1	phosphoinositide dependent kinase 1
PH	pleckstrin homology domains
PI3K	Phosphatidylinositol 3-Kinase
PIP2	Phosphatidylinositol-4,5-P2
PIP3	Phosphatidylinositol-3,4,5-P3
PTEN	phosphatase and tensin homolog
RPR	Apoptosefaktor
RNAi	<i>RNA interference</i>
S6-Kinase	ribosomal protein S6 kinase
SH2	Src-Homology 2
SHC	Src homology 2 domain containing
SRC	v-src sarcoma
TDC2	Tyrosin Decarboxylase 2
TetxLc	tetanus toxin light chain
TOBI	target of brain insulin
TOR	target of rapamycin
TSC1/2	tuberous sclerosis complex 1/2
UAS-d3Ri	transgene <i>dilp3</i> -RNAi-Linie
VNC	ventraler Nervenstrang

6.3 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1.1: Zellautonome und nichtautonome Funktionen von Insulin	2
Abbildung 1.2: Schema des Insulin-Signaltransduktionsweges	4
Abbildung 1.3: Evolutionäre Konservierung des Insulin-Signaltransduktionsweges.....	6
Abbildung 1.4: Konservierter Insulin-Signaltransduktionsweg in <i>Drosophila</i>	7
Abbildung 4.1: Expression der <i>dilps</i> in Larven.....	46
Abbildung 4.2: Entwicklungsabhängige Expression von <i>dilp2</i> , <i>dilp3</i> und <i>dilp5</i> während der Larvalentwicklung.....	47
Abbildung 4.3: Axonale Projektion der Insulin-produzierenden Zellen.....	48
Abbildung 4.4: Vergleich der räumlichen Expression von <i>dilp3</i> und der Projektionsneuronen im larvalen und adulten Gehirn.....	49
Abbildung 4.5: Konnektivität Insulin- und <i>akh</i> -produzierender Zellen in der adulten Fliege.	50
Abbildung 4.6: Zerstörung der IPCs durch Apoptose.....	51
Abbildung 4.7: Analyse der Körperzusammensetzung.....	53
Abbildung 4.8: Fruchtbarkeit IPC-defizienter Fliegen.	54
Abbildung 4.9: Langlebigkeit IPC-defizienter Weibchen.....	55
Abbildung 4.10: Microarray-Untersuchung IPC-defizienter adulter Weibchen.....	57
Abbildung 4.11: Konservierte Domänen von CG11909 (TOBI).....	60
Abbildung 4.12: Expressionsunterschiede von <i>tobi</i> in verschiedenen Fliegenlinien.....	62
Abbildung 4.13: Expressionsunterschiede der <i>dilps</i> und von <i>tobi</i> in der transgenen Fliegenlinie d3Ri.....	63
Abbildung 4.14: Expressionsunterschiede von <i>tobi</i> bei unterschiedlichen Nahrungsquellen.	64
Abbildung 4.15: <i>tobi</i> Fluoreszenz- <i>in situ</i> Hybridisierung an Wildtyp-Fliegen	65
Abbildung 4.16: Nahrungsabhängige <i>tobi</i> -Expression in weiblichen Adulten.....	66
Abbildung 4.17: <i>tobi</i> -Expression bei unterschiedlichen Verdünnungsreihen protein- und zuckerhaltiger Lösungen	67
Abbildung 4.18: Protein- und Zucker-abhängige Expression von <i>tobi</i> in adulten InsP3 > LacZ (IL) Fliegen und InsP3 > <i>rpr/hid</i> (IRH) Fliegen.	68
Abbildung 4.19: Nahrungsabhängige Expression von <i>tobi</i> in <i>akh</i> -defizienten Fliegen.....	69
Abbildung 5.1: Zusammenhang der Nahrungsbedingung mit der Lebenserwartung und der Expression von <i>tobi</i> im normalen und IPC-defizienten Zustand	80