



---

**Forschungszentrum Karlsruhe**  
in der Helmholtz-Gemeinschaft

---

**Wissenschaftliche Berichte**  
FZKA 7316

**Nutritionomik:  
Analyse nahrungsabhängiger  
Gen- und Proteinregulation in  
*Drosophila melanogaster*  
(Meigen)**

**S. Walther**

Institut für Toxikologie und Genetik

Juni 2007



**Forschungszentrum Karlsruhe**

in der Helmholtz Gemeinschaft

Wissenschaftliche Berichte

**FZKA 7316**

**Nutrionomik:**

**Analyse nahrungsabhängiger Gen- und Proteinregulation**

**in *Drosophila melanogaster* (Meigen)**

Steffen Walther

Institut für Toxikologie und Genetik

von der Fakultät für Chemie und Biowissenschaften der

Universität Karlsruhe genehmigte Dissertation

Forschungszentrum Karlsruhe GmbH, Karlsruhe

2007

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:0005-073162

**Nutritionomik:**  
**Analyse nahrungsabhängiger Gen- und Proteinregulation**  
**in *Drosophila melanogaster* (Meigen)**

**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  
Diplom-Biologe Steffen Walther

aus Ludwigshafen am Rhein

Dekan: Prof. Dr. H. Puchta

Referent: PD Dr. M.J. Pankratz

Korreferent: Prof. Dr. med. Margot Zöller

Tag der mündlichen Prüfung: 17. Juli 2006



## Zusammenfassung

Die Ernährung spielt eine wichtige Rolle für jeden Organismus. Die Aufnahme und Verwertung finden sich in allen Lebewesen in einem mehr oder weniger komplexen System wieder. Ernährung ist eine Grundbedingung für Leben. Die Identifikation und Charakterisierung von Signalwegen, die für die Ernährung wichtig sind, ist daher seit langer Zeit Ziel vieler Forscher. Die Verfügbarkeit von Mikroarrays half, erste umfangreiche Analysen des Transkriptoms durchzuführen. Der Vergleich von differenziell gefütterten Larven des Modellorganismus *Drosophila melanogaster* ermöglichte es, Gene zu identifizieren, die eine zuckerspezifische Regulation aufwiesen. Eines dieser Gene war *sugarbabe*, das durch seine schnelle und starke Induktion besonders auffiel. In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass *sugarbabe* durch *chico*, eine Komponente des Insulinsignalweges, nicht reguliert wird. So konnte gezeigt werden, dass das adipokinetische Hormon (*akh*) und das C/EBP-Homolog *slbo* Einfluss auf die Expression von *sug* aufweisen.

Da die Expression von mRNS und deren Proteine oftmals nicht korreliert, sollten die Daten der Mikroarrays mit Hilfe von zweidimensionaler Gelelektrophorese und Massenspektrometrie überprüft und wenn möglich ergänzt werden. Hierfür war es notwendig, die benötigten Techniken am Institut zu etablieren. Vergleicht man die Daten der Mikroarray-Experimente mit denen der 2D-GE, so fällt auf, dass viele Proteine eine abweichende Regulation aufweisen. Besonders interessant ist dabei EF-1- $\alpha$ 48D, ein Elongationsfaktor, der eine wichtige Rolle bei der Proteinbiosynthese spielt und somit für die Regulation weiterer Proteine verantwortlich zeichnen könnte. Die Arbeit konnte zeigen, dass Mikroarrays ein wichtiges Hilfsmittel bei der Erforschung von Regulationsmechanismen sind. Zusätzliche Techniken, wie die Proteomik, sind aber essentiell für einen globalen und umfassenden Einblick in die komplexen Regelwerke nieder- und höherorganisierter Organismen.

## Abstract

Nutritionomic:  
Analysis of feeding dependant gene and protein regulation in  
*Drosophila melanogaster* (Meigen)

Feeding is essential for every organism. Uptake and utilization of nutrition are taking place in all animals in a more or less complex system. Feeding is a fundamental condition for life. Identification and characterization of signal pathways important for nutrition is an aim for many researchers for a long time. With the availability of microarrays first substantial analyses of the transcriptome were possible. Using *Drosophila melanogaster* as a model organism and comparing differentially fed larvae it was possible to identify genes that are regulated in a sugar dependant manner. One of these genes was called *sugarbabe* that showed a strong and fast induction upon sugar. In this study it could be shown that *sugarbabe* is not affected by *chico* which is a component of the insulin signalling pathway. So it could be shown that the adipokinetic hormone (*akh*) and the C/EBP-homolog *slbo* affected the regulation of *sugarbabe*. In many cases the expression data of mRNA and their corresponding proteins do not correlate. The microarray data should be validated and if possible supplemented by additional two-dimensional gel electrophoresis and subsequent mass spectrometry.

Therefore it was necessary to establish this technique at the institute. Comparing the data out of the microarray experiments with the 2D gel electrophoresis many proteins show a divergent regulation. Of particular importance is EF-1- $\alpha$ 48D, an elongation factor that plays an important role in protein-biosynthesis. So it could be responsible for regulation of additional proteins.

The study could show that microarrays are an important tool for the investigation of regulatory mechanisms. Additional techniques like proteomics are equally essential for a global and comprehensive insight in the complex control installation of lower and higher organisms.



---

# Inhaltsverzeichnis

<b>ZUSAMMENFASSUNG.....</b>	<b>I</b>
<b>INHALTSVERZEICHNIS .....</b>	<b>III</b>
<b>ABBILDUNGSVERZEICHNIS.....</b>	<b>VI</b>
<b>ABKÜRZUNGEN.....</b>	<b>IX</b>
<b>1 EINLEITUNG.....</b>	<b>1</b>
1.1 PROTEINE UND PROTEOMIK .....	1
1.2 GRUNDLAGEN DER PROTEOMIK.....	6
1.2.1 Trennung der Proteine .....	7
1.2.2 Detektion und Quantifizierung der Proteine.....	8
1.2.3 Identifizierung der Proteine .....	9
1.2.4 Matrix assistierte Laser Desorptions Ionisations Flugzeit Massenspektrometrie (MALDI).....	10
1.2.4.1 Tandem-Massenspektrometrie .....	12
1.2.5 Elektrospray-Ionisations-Massenspektrometrie (ESI-MS).....	13
1.3 NUTRIONOMIK .....	15
1.3.1 Der Insulinsignalweg .....	16
1.4 ERNÄHRUNGSABHÄNGIGE REGULATION VON GENEN .....	17
1.5 DROSOPHILA MELANOGASTER ALS MODELLORGANISMUS FÜR NAHRUNGSBEDINGTE EXPRESSIONSÄNDERUNGEN .....	18
1.6 ZIEL DER ARBEIT .....	20
<b>2 MATERIAL .....</b>	<b>21</b>
2.1 BEZUGSQUELLEN FÜR VERBRAUCHSMATERIALIEN UND CHEMIKALIEN.....	21
2.2 BEZUGSQUELLEN FÜR ENZYME .....	24
2.3 BEZUGSQUELLEN FÜR KITS .....	25
2.4 BEZUGSQUELLEN FÜR GERÄTE .....	25
2.5 LÖSUNGEN UND MEDIEN .....	26
2.6 FLIEGENLINIEN .....	28
2.7 VEKTOREN UND PLASMIDE .....	28
2.8 BAKTERIENSTÄMME .....	28
2.9 PCR PRIMER.....	29
2.10 PRIMERSEQUENZEN .....	29
<b>3 METHODEN.....</b>	<b>30</b>
3.1 FLIEGENHALTUNG .....	30
3.2 FÜTTERUNGSEXPERIMENTE .....	30
3.3 ERZEUGUNG TRANSGENER FLIEGEN .....	31
3.4 CHROMOSOMENLOKALISATION .....	33
3.5 GEL-ELEKTROPHORESEN .....	34
3.5.1 Gelelektrophorese von DNS und RNS.....	34
3.5.2 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE).....	35

---

3.5.2.1	Coomassie-Färbung .....	35
3.5.2.2	Silberfärbung.....	36
3.6	ISOLIERUNG VON NUKLEINSÄUREN .....	36
3.6.1	Isolierung von genomischer DNS .....	36
3.6.2	Isolierung von RNS aus Drosophila-Larven .....	37
3.6.3	Isolierung von DNS-Fragmenten aus Agarosegelen .....	37
3.6.4	Isolierung von Plasmid-DNS aus Bakterien.....	38
3.6.4.1	Plasmidisolierung mittels Mini-Präparation .....	38
3.6.4.2	Plasmidisolierung mittels Maxi-Präparation.....	39
3.7	DNS-KLONIERUNGSTECHNIKEN .....	39
3.7.1	Restriktionsverdau von DNS.....	39
3.7.2	DNS-Präzipitation .....	41
3.7.3	DNS-Ligation .....	41
3.7.4	Herstellung Hitzeschock-kompetenter Zellen.....	42
3.7.5	Transformation und Selektion .....	42
3.8	POLYMERASE-KETTENREAKTION (PCR).....	43
3.8.1	Reverse Transkriptase-PCR (RT-PCR).....	43
3.8.2	Real Time PCR.....	45
3.9	WESTERN-TRANSFER .....	46
3.9.1	Nass-Transfer (Wet-Blot).....	46
3.9.2	Halbtrockener-Transfer (Semidry-Blot).....	46
3.10	KONZENTRATIONSBESTIMMUNG VON DNS- UND RNS-LÖSUNGEN .....	47
3.11	KONZENTRATIONSBESTIMMUNG VON PROTEINEN .....	47
3.12	ZWEIDIMENSIONALE GELELEKTROPHORESE.....	48
3.12.1	Isoelektrische Fokussierung der IPG-Streifen.....	48
3.12.2	Equilibrierung der IPG-Streifen .....	49
3.12.3	Auftrag der IPG-Streifen .....	49
3.12.4	Analyse der Gele .....	50
3.12.5	Ausschneiden der Proben .....	51
3.12.6	Trypsinverdau.....	51
3.12.7	Mikro-Entsalzung des tryptisch gespalteten Peptidgemisches.....	53
3.13	MASSENSPEKTROMETRIE.....	53
3.14	X-GAL-FÄRBUNG.....	55
3.15	GLYCINTITERBESTIMMUNG IN LARVEN HÄMOLYMPHE.....	55
<b>4</b>	<b>ERGEBNISSE .....</b>	<b>57</b>
4.1	CHARAKTERISIERUNG VON SUGARBABE.....	57
4.1.1	Lokalisation der Expression innerhalb von Drosophila melanogaster Larven.....	59
4.1.2	Beteiligung von sug am Insulin-Signalweg.....	60
4.1.3	Beeinflussung der sug Expression durch akh-Zell-Knockout.....	62
4.1.4	Beteiligung von C/EBP am sug Signalweg.....	65
4.2	PROTEOMIK .....	71
4.2.1	Probenvorbereitung .....	71
4.2.2	Untersuchung differentiell exprimierter Proteine in Drosophila melanogaster .....	74
4.2.3	Proteomuntersuchung IPC defizienter Fliegen.....	77
4.2.3.1	Proteinregulation in IPC defizienten Fliegen.....	78
4.2.3.2	Optimierung des Trypsinverdau und Verringerung der Fremdkontamination.....	82

---

4.2.3.3	Vergleich der Silber- und Coomassie Brillant Blau Färbung bei zweidimensionaler Gelelektrophorese.....	83
4.2.3.4	Analyse der Coomassie gefärbten InsP3-Gele.....	85
4.2.4	Proteomanalyse von differenziell gefütterten <i>Drosophila melanogaster</i> Larven .....	88
4.2.5	Glycinbestimmung in <i>pumpless</i> Larven .....	92
<b>5</b>	<b>DISKUSSION.....</b>	<b>94</b>
5.1	Regulation von <i>sug</i> durch Komponenten des Insulin-Signalweges .....	95
5.2	AKH EXPRESSION BEI ZUCKERGEFÜTTERTEN LARVEN .....	96
5.3	AKH ALS NEGATIVER REGULATOR DER SUGARBABE EXPRESSION? .....	96
5.4	SLBO IST AN DER REGULATION VON SUG BETEILIGT .....	97
5.5	EINSCHRÄNKUNGEN DER PROTEOMIK .....	100
5.5.1	Die Sensitivität.....	100
5.5.2	Die Visualisierung – ein Flaschenhals der 2D basierten Proteomanalyse.....	101
5.6	DER EXPERIMENTELLE AUFWAND .....	102
5.7	PROTEOMIK UND RNS BASIERENDE TECHNOLOGIEN.....	102
5.8	VALIDIERUNG VON PROTEOMDATEN .....	104
5.9	VERGLEICH VON DATEN DER PROTEOM- UND MRNS-ANALYSE DIFFERENZIELL GEFÜTTERTER LARVEN .....	105
5.10	<i>PUMPLESS</i> HAT EINEN EINFLUSS AUF DEN GLYCINTITER DER HÄMOLMPHE.....	107
5.11	AUSBLICK.....	108
<b>6</b>	<b>ANHANG.....</b>	<b>109</b>
6.1	EINSTELLUNGEN FÜR MS-MESSUNGEN .....	109
6.1.1	Akquisition .....	109
6.1.2	Aufbereitung.....	111
6.2	EINSTELLUNGEN FÜR MS-MS-MESSUNGEN .....	112
6.2.1	Interpretation.....	112
6.2.2	Akquisition und Aufbereitung .....	113
<b>7</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS: .....</b>	<b>115</b>

## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1.2-1:	Prinzipieller Ablauf einer Proteomanalyse, Schematische Darstellung .....	6
Abbildung 1.2-2:	Aufbau eines MALDI-MS mit Linear- und Reflektormodus.....	11
Abbildung 1.2-3:	Schematischer Aufbau eines ToF/ToF-Massenspektrometers .....	13
Abbildung 1.2-4:	Bildung des Taylor Konus und Desolvatisierung der Probe im ESI-MS...	14
Abbildung 1.2-5:	Aufbau eines Tripple Quadrupol Elektrospray Massenspektrometers. ....	15
Abbildung 1.3-1:	Homologe Insulinsignalwege .....	16
Abbildung 1.5-1:	Lebenszyklus von Drosophila melanogaster. ....	18
Abbildung 4.1-1:	Übersicht der verwendeten Promotorbereiche zur Herstellung einer transgenen Fliegenlinie.....	58
Abbildung 4.1-2:	Kreuzungsschema zur Chromosomenlokalisierung von sug .....	58
Abbildung 4.1-3:	Kreuzungsschema für den Austausch von Balancern.....	61
Abbildung 4.1-4:	Semiquantitative RT-PCR. Chico Expression.....	61
Abbildung 4.1-5:	Nahrungsabhängige Expression von sug in akh defizienten Drosophila melanogaster Larven. ....	63
Abbildung 4.1-6:	Expressionsunterschiede von akh in akh defizienten Larven.....	64
Abbildung 4.1-7:	Expressionsunterschiede von sug in akh defizienten Larven .....	64
Abbildung 4.1-8:	Übersicht über C/EBP Bindestellen innerhalb des sug Promotors.....	65
Abbildung 4.1-9:	Kreuzungsschema zur Erzeugung von transheterozygoten slbo Mutanten	66
Abbildung 4.1-10:	Semiquantitative RT-PCR. sug Expression in slbo Mutanten.....	66
Abbildung 4.1-11:	Expressionsunterschiede von sugarbabe in Wildtyp und transheterozygoten slbo Mutanten.....	67
Abbildung 4.1-12:	Expressionsunterschiede von sugarbabe in Wildtyp und transheterozygoten slbo Mutanten.....	68
Abbildung 4.1-13:	Relative Expressionsänderung von normal- und zuckergefütterten Larven .....	69
Abbildung 4.2-1:	Schlüsselstellen der Proteomik.....	71
Abbildung 4.2-2:	Zweidimensionale Gelmuster differenziell gefütterter Wildtyp Larven ...	73
Abbildung 4.2-3:	Überblick über verschiedenen 2D Gele.....	74
Abbildung 4.2-5:	Silbergefärbte 2D Gele.(LacZ und reaper/hid).....	79
Abbildung 4.2-6:	Vergleich verschiedener Färbetechniken.....	84
Abbildung 4.2-7:	Coomassie gefärbte zweidimensionale Gele von InsP3 > LacZ und InsP3 > reaper/hid Fliegen.....	86
Abbildung 4.2-8:	Referenzgele der Coomassie gefärbten zweidimensionalen Gele von normal- und zuckergefütterten Larven .....	89
Abbildung 4.2-9:	Kinetik des Glycintiters in Wildtyp und ppl Larven .....	93
Abbildung 5.4-1:	Konservierte Domänen von CG4354 (slbo) .....	97
Abbildung 5.4-2:	Modell der mit sug in Verbindung stehenden Signalweg.....	99
Abbildung 5.7-1:	Limitierungen der verwendeten Analysemethoden.....	103
Abbildung 5.9-1:	Stimulation der Translationsinitiierung durch dTor .....	106
Abbildung 5.10-1:	Abbau von Glycin mit Hilfe des Glycinspaltsystems.....	107
Abbildung 6.1-1:	Einstellungen am Applied Biosystems 4700 Proteomics Analyzer „Instrument“ und „Spectrum“ .....	109
Abbildung 6.1-2:	Einstellungen am Applied Biosystems 4700 Proteomics Analyzer „Spectrum-Advanced“ .....	110

Abbildung 6.1-3: Einstellungen am Applied Biosystems 4700 Proteomics Analyzer "Processing Method" .....	111
Abbildung 6.2-1: Einstellungen am Applied Biosystems 4700 Proteomics Analyzer „Interpretation“ .....	112
Abbildung 6.2-2: Einstellungen am Applied Biosystems 4700 Proteomics Analyzer „Instrument“ und „Automatic Control“ .....	113

## Tabellenverzeichnis

Tabelle 3.8-1: Erststrang-Reaktion .....	44
Tabelle 4.1-1: Vergleich der relativen Expressionsänderung zwischen Wildtyp (WT) und slbo-Mutanten. ....	69
Tabelle 4.2-1: Mit Massenspektrometrie identifizierte Proteine von Abbildung 4.2-3 .....	76
Tabelle 4.2-2: Übersicht über ausgeschnittene und identifizierte Proteinspots der zweidimensionalen Gele aus Abbildung 4.2-5 .....	80
Tabelle 4.2-3: Übersicht über ausgeschnittene und identifizierte Proteinspots der zweidimensionalen Gele aus Abbildung 4.2-7 .....	87
Tabelle 4.2-4: Übersicht über ausgeschnittene und identifizierte Proteinspots der zweidimensionalen Gele aus Abbildung 4.2-8 .....	90
Tabelle 4.2-5: Liste regulierter Proteine aus Abbildung 4.2-8.....	91

## Abkürzungen

% (v/v)	Prozentualer Volumenanteil bezogen auf das Gesamtvolumen
% (w/v)	Prozentualer Mengenanteil bezogen auf das Gesamtvolumen
amu	Atomare Masseneinheit (atomic mass unit) (1 amu = 1 Da)
cDNS	in DNS umgeschriebene RNS, so dass keine Introns mehr enthalten sind
Da	Dalton (nicht SI-konforme Masseinheit)
dH <sub>2</sub> O	destilliertes Wasser
ddH <sub>2</sub> O	bidestilliertes Wasser
DNS	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuclease
ds	doppelsträngig
<i>E. coli</i>	Escherichia coli
g <sub>n</sub>	Erdbeschleunigung (9,81 m/s <sup>2</sup> )
Hid	Apoptosefaktor
ISW	Insulinsignalweg
M	Mol
mRNS	messenger-RNS
MS	Massenspektrometrie
MS-MS	Tandem-Massenspektrometrie
m/z	Masse-zu-Ladung Verhältnis
OD <sub>x</sub>	Optische Dichte bei einer Wellenlänge von x nm
ORF	open reading frame = Offenes Leseraster
PCR	polymerase chain reaction = Polymerase-Kettenreaktion
pH	Wert für den Säuregehalt
ppm	Teile pro Million (part per million)
RNS	Ribonukleinsäure
Rpr	Apoptosefaktor
RT	Raumtemperatur oder Reverse Transkriptase
SDS	Sodiumdodecylsulfat = Natriumdodecylsulfat; Detergenz
sek	Sekunde (wurde zwecks Übersichtlichkeit der offiziellen Abkürzung s vorgezogen)
ss	single stranded = einzelsträngig
T <sub>m</sub>	Schmelztemperatur bei Primern





# 1 Einleitung

Im Jahre 1923 publizierte der englische Arzt Garrod die Hypothese, dass angeborene Stoffwechselfehler auf das Fehlen spezifischer Enzyme zurückgehen, die normalerweise unter Anweisung der Wildtyp-Erbanlagen hergestellt werden (Garrod, 1923). Obwohl diese Arbeit kaum beachtet wurde, war somit bereits die „ein-Gen-ein-Enzym-Hypothese“ geboren. Nach Experimenten mit dem Pilz *Neurospora crassa* formulierten Beadle und Tatum ihre „Ein-Gen-ein-Protein-Hypothese“, nach der ein definierter DNS-Abschnitt die Information für ein Protein enthält (Beadle und Tatum, 1941). Noch im selben Jahrzehnt führte Pauling die Ursache der Sichelzellanämie auf einen genetisch bedingten Defekt im Hämoglobinmolekül zurück (Pauling et al., 1949). Später stellte man fest, dass Proteine wie z.B. Hämoglobin aus mehreren Polypeptiduntereinheiten aufgebaut sein können (Ingram, 1989), für die funktionell zusammenhängende genetische Einheiten (Cistrone, äquivalent zu Gene) kodieren. Die ursprünglichen Theorien wurden zur „ein-Cistron-ein-Enzym-Theorie“ (Benzer, 1955) bzw. allgemeiner zur „ein-Gen-ein-Polypeptid-Hypothese“ präzisiert. Das Zusammenspiel aus Gen und Protein gestaltet sich allerdings sehr viel komplexer als diese Theorie es beschreibt.

## 1.1 Proteine und Proteomik

Das Wort „Protein“ stammt aus dem Griechischen („proteos“) und kann mit „erstrangig“ übersetzt werden. Die Untersuchung dieser Makromoleküle, ihrer Struktur, Eigenschaften und Funktion beschäftigt Wissenschaftler schon seit mindestens zwei Jahrhunderten. Ein großer Schritt zur modernen Analytik und zum Verständnis des Aufbaus von Proteinen waren die Arbeiten von Pehr Edman und Frederic Sanger zur Sequenzanalyse von Proteinen und Peptiden in den 50er Jahren des letzten Jahrhunderts (Edman, 1950) (Sanger, 1951). Hiermit konnte gezeigt werden, dass Proteine eine gemeinsame und definierte Struktur aus kovalent gebundenen Einzelbausteinen, den Aminosäuren, aufweisen. Einen regelrechten

Boom in der Proteinanalytik lösten 1975 O'Farrell und Klose aus, als sie nie zuvor gesehene Bilder von Trennungen tausender Proteine mittels zweidimensionaler (2D) Gelelektrophorese zeigten (Klose, 1975) (O'Farrell, 1975). Eine hochauflösende Trennmethode, die Proteine selbst aus komplexen Gemischen wie Zellen, Geweben oder Körperflüssigkeiten separieren konnte, stand plötzlich zur Verfügung. Zu dieser Zeit existierte allerdings noch keine ausreichend sensitive Methode, die so isolierten Proteine auch zu identifizieren. Es dauerte bis Ende der 80er Jahre als die Massenspektrometrie einen weiteren Entwicklungssprung vollbrachte und Techniken entwickelt wurden, die eine Identifizierung der Proteine ermöglichten.

Zugleich gab es auf dem Gebiet der Genomanalyse weltweite, gemeinsame Anstrengungen, komplette Genome verschiedener Spezies durchzusequenzieren. Bis dato sind so die kompletten Genome einer Vielzahl von Spezies erfolgreich sequenziert worden (Stand: 2006):

ca. 2 000 Viren, 28 Archaeen, 119 Bakterien und 41 Eukaryoten darunter *Anopheles gambiae*, *Encephalitozoon cuniculi*, *Arabidopsis thaliana*, *Homo sapiens* (Venter et al., 2001) (I.H.G.S.C., 2004), *Saccharomyces cerevisiae*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Caenorhabditis elegans*, *Oryza sativa* und *Drosophila melanogaster* (Adams et al., 2000) (Myers et al., 2000). Die Analyse der komplexen RNS-Pools in Zellen, den sogenannten Transkriptomen, ist in den letzten Jahren vor allem durch die Entwicklung von DNS-Mikroarrays, bei denen DNS-Fragmente auf feste Träger gebunden werden (DeRisi et al., 1997) (Bauer, 2004) (Katzenberger, 2004) (Hamm, 2005), effizient geworden. So gelang es, einen großen Teil der entsprechenden mRNS parallel zu detektieren und zu quantifizieren. Hierfür werden ganze mRNS-Populationen von Zellen, Organen oder ganzen Organismen revers transkribiert, die cDNS mit Fluoreszenzfarbstoffen markiert und dann an die DNS-Fragmente auf den Mikroarrays hybridisiert. Mit dieser Technik ist es auf effektive Weise möglich, Transkriptome parallel, sensitiv, qualitativ und quantitativ zu charakterisieren. Diese Technologien können viel zum Verständnis der komplexen biochemischen Zusammenhänge in Zellen beitragen.

Dennoch wird es immer deutlicher, dass solche als „Transkriptomik“ bezeichneten Untersuchungen zwar zwingend notwendig, aber nicht hinreichend für das

Verständnis der komplexen biochemischen Vorgänge in der Zelle sind. Experimentelle Befunde belegen, dass die Quantität einzelner mRNA-Moleküle oft nicht mit der Quantität des zugehörigen Proteins korreliert (Gygi et al., 1999) (Anderson et al., 1997). Außerdem ist bekannt, dass Gene zwar transkribiert werden können, die entsprechende mRNA aber nicht unbedingt translatiert werden muss. Auch auf Proteinebene besteht eine hohe und dynamische Variabilität. So werden Proteine oft posttranslational modifiziert wie z.B. phosphoryliert, glykosyliert, acetyliert, ubiquitinyliert, farnesyliert oder sulfatiert und so ihre Stabilitäten oder auch ihre Bindungseigenschaften moduliert. Man kennt heutzutage über 200 verschiedene Arten von posttranslationalen Modifikationen, sowie alternatives Spleißen auf mRNA-Ebene (Graveley, 2001) oder „mRNA-Editing“, die weitere Divergenzen verursachen. Eine Untersuchung an humanen Protein-Sequenzen konnte zeigen, dass beispielsweise von 6 330 annotierten Sequenzen in der SwissProt-Datenbank, 16 449 potentielle bzw. experimentell ermittelte posttranslationale Modifikationen gefunden werden konnten (O'Donovan et al., 2001). Eine weitere Studie zeigte, dass über die Hälfte der bekannten Proteine beim Menschen glykosyliert sind (Apweiler et al., 1999). Zusätzlich werden Proteine häufig sezerniert, so dass als Konsequenz die Konzentration der entsprechenden mRNA nicht mit der Konzentration des entsprechenden Proteins korreliert. Aus diesen Gründen ist eine zu den RNS-Technologien komplementäre Technologie nötig, welche die Analyse von ganzen Protein-Populationen zulässt. Hierbei ist es wünschenswert, nach Möglichkeit das gesamte komplexe Proteingemisch gleichzeitig darzustellen, zu analysieren und in einem nächsten Schritt Vergleiche zwischen verschiedenen Proteingemischen durchzuführen. So können beispielsweise die Proteinprofile von differenziell gefütterten Larven verglichen werden. Die Gesamtheit der **Proteine**, die in einem Gewebe- oder Zelltyp exprimiert werden, wird in Analogie zum Begriff **Genom** üblicherweise als **Proteom** (Wilkins et al., 1996) bezeichnet. Techniken für die Analyse dieser komplexen Proteingemische werden, in Analogie zum Begriff „Genomik“, als „Proteomik“ bezeichnet.

Der Begriff musste aber in der Folgezeit genauer definiert werden und so versteht man heute unter dem Begriff Proteom „das zu einem bestimmten Zeitpunkt und unter

exakt definierten Randbedingungen quantitativ ermittelte Proteinmuster eines Organismus, einer Zelle, einer Organelle oder auch einer Körperflüssigkeit“ (Lottspeich, 1999). Diese Definition zeigt schon einige der Grenzen der Genomforschung auf und weist auf die Notwendigkeit, aber auch auf Probleme eines Proteomansatzes hin:

- Im Gegensatz zu dem statischen, exakt definierbaren Genom ist das Proteom ein sehr dynamisches Gebilde, das von einer Vielzahl von Parametern beeinflusst wird.
- Eine vollständige Sequenzierung eines Organismus bedeutet noch nicht, dass man weiß, wo sich die „coding“ Regionen innerhalb der Nukleotidsequenz befinden. Die Bioinformatik allein ist (noch) nicht in der Lage, mit Sicherheit Exons oder Spleißingvarianten zu entdecken. Im Vergleich von etwa 18 000 Genen bei *Drosophila melanogaster* geht man heutzutage von mindestens etwa hunderttausend unterschiedlichen Proteinspezies aus. Ein Extrembeispiel hierfür ist das *Drosophila* Gen *Dscam*, das mit 95 Exons theoretisch alleine etwa 38 000 unterschiedliche Proteine kodieren könnte (Graveley, 2005).
- Für die biologische Aktivität und Wirkung eines Proteins sind seine Menge und die genaue Kenntnis seiner posttranslationalen Modifikationen von großer Bedeutung.
- Es existiert keine direkte Korrelation zwischen Genexpression, Proteinkonzentration und Proteinaktivität. Hierbei spielen eine Vielzahl von komplexen und hochvernetzten Funktionsabläufen eine Rolle.
- Es gibt keinen biologischen Zustand, in dem alle Gene, oder im Genom kodierten Proteine, zur gleichen Zeit exprimiert werden.
- Das Proteom ist neben diesen endogenen Faktoren ebenso von exogenen Parametern wie Temperatur, Stress, Pharmaka, Interaktionen und zellspezifischer Expression abhängig (Lottspeich, 1998).

- Es gibt auf der Proteinebene wesentlich größere Mengenunterschiede als auf der Genomebene. Dies bedeutet, es liegen Proteine in sehr geringer Kopienzahl neben Proteinen mit sehr hoher Kopienzahl vor. Analytisch betrachtet ist es jedoch äußerst schwierig, schwach exprimierte Proteine neben stark exprimierten Proteinen nachzuweisen (Corthals, 2000).

Trotz dieser Schwierigkeiten spricht man schon jetzt vom Jahrzehnt der Proteomforschung (Anderson, 2000). Bei allen berechtigten Erwartungen an die Proteomanalyse darf jedoch nicht der Eindruck entstehen, sie könne isoliert von sämtlichen anderen Techniken eingesetzt werden. Nur das Zusammenspiel der Proteomanalyse mit den Methoden der Genom-, sowie Transkriptomanalyse, der Molekularbiologie aber auch der klassischen Biochemie wird uns einen besseren Einblick in die komplexen funktionellen Regulations- und Stoffwechselnetzwerke eines Organismus eröffnen.

Bisher wurden einige „large scale“ Proteomprojekte von Organismen gestartet wie z.B. *Saccharomyces cerevisiae* (Hodges et al., 1998), *Escherichia coli* (VanBogelen et al., 1997) und *Drosophila melanogaster* (Schoofs et al., 2003). Zusätzlich wurde die systematische Proteomanalyse einiger Protein-Extrakte von *Drosophila* wie z.B. Hämolymphe (Vierstraete et al., 2003) und des zentralen Nervensystems (Baggerman et al., 2002) erfolgreich untersucht. Ein Bereich, der bisher allerdings mehr oder weniger außer Acht gelassen wurde, ist die Untersuchung nahrungsabhängiger Proteinregulation bei *Drosophila melanogaster*.

## 1.2 Grundlagen der Proteomik

Die Kernschritte zur Analyse von Proteomen bestehen in der Extraktion und Auftrennung komplexer Proteingemische (2D-Gelelektrophorese oder mittels HPLC), sowie der Detektion von Proteinen und deren Quantifizierung. Danach werden interessante Proteine ausgeschnitten und identifiziert. Die prinzipielle Vorgehensweise ist in Abbildung 1.2-1 dargestellt.

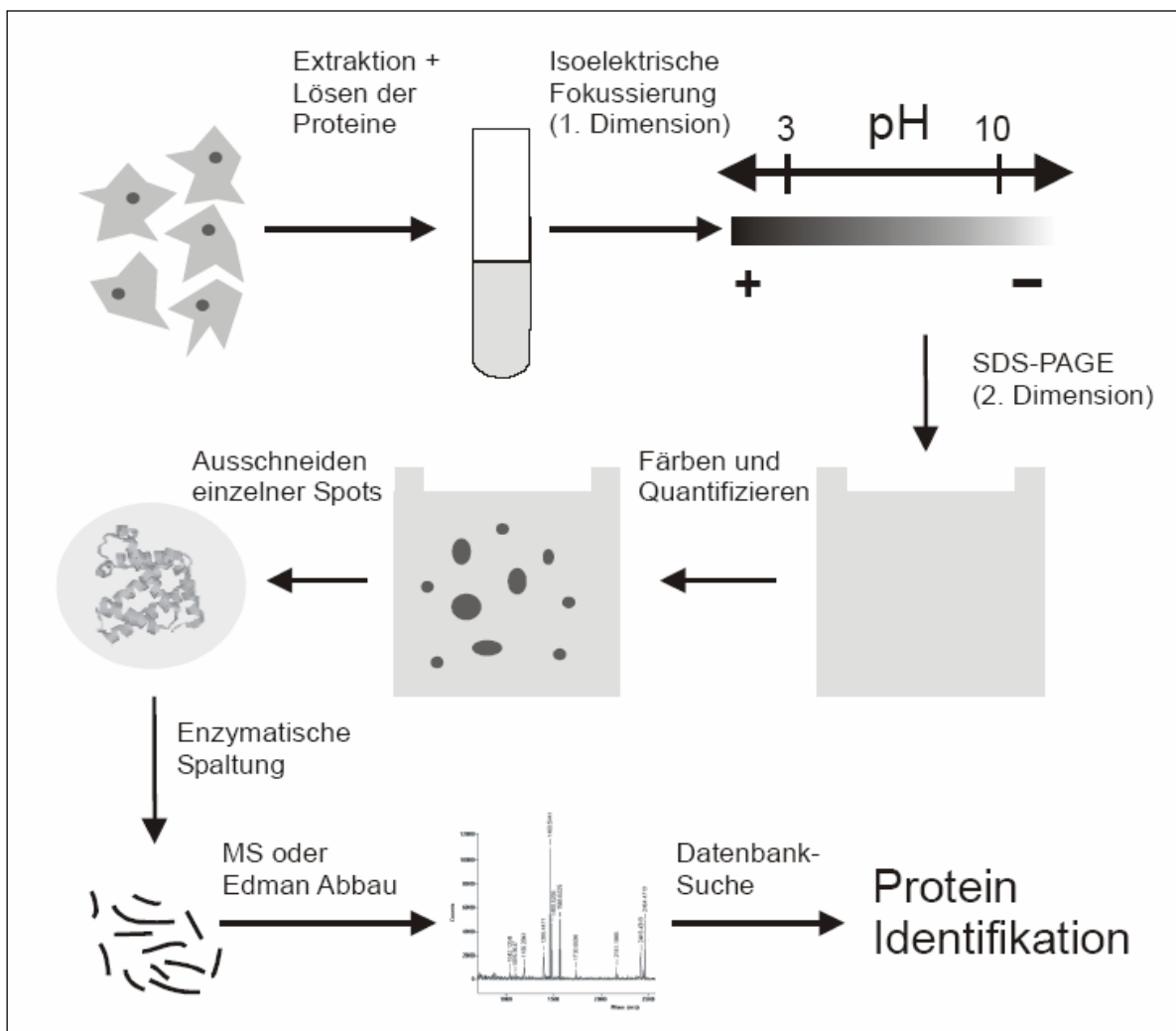


Abbildung 1.2-1: Prinzipieller Ablauf einer Proteomanalyse, Schematische Darstellung

### 1.2.1 Trennung der Proteine

Die am häufigsten verwendete Technologie zur Trennung komplexer Proteingemische ist die zweidimensionale Gelelektrophorese (2D-GE) (O'Farrell, 1975). Hierbei werden die Proteine zunächst mittels isoelektrischer Fokussierung nach ihrer Ladung und anschließend mittels SDS-PAGE ihrem Molekulargewicht entsprechend getrennt. Eine wichtige Neuerung innerhalb der ersten Dimension war die Entwicklung immobilisierter pH-Gradienten (IPG) (Bjellqvist, 1982). Zum einen sind isoelektrische Fokussierungen mit IPGs reproduzierbarer und technisch einfacher durchzuführen als mit freien Trägerampholyten und zum anderen ist es mit IPGs möglich, ohne Verzerrung des pH-Gradienten größere Mengen eines Gesamtproteingemisches aufzutrennen (bis zu 15 mg) (Bjellqvist, 1993). Dies macht es zwar möglich Proteine niedriger Konzentration zu detektieren und zu identifizieren, jedoch sind Proteinmengen über 1 mg nur sehr schwer ohne Artefakte zu fokussieren. Neben der Reproduzierbarkeit der Gele stellt auch die exakte Trennung extrem saurer bzw. basischer Proteine (wie z.B. Histone), sowie die Trennung von sehr kleinen und sehr großen Proteinen ein erhebliches Problem dar. Üblicherweise ist nur der pH-Bereich zwischen 3 und 10 und der Größenbereich zwischen 10 und 150 kDa zugänglich. Zwar gibt es für den basischen pH-Bereich (pH 10-12) speziell angepasste Methoden der isoelektrischen Fokussierung (Wildgruber, 2000), jedoch sinkt die Auflösung oberhalb pH 9 zum Teil drastisch.

Aufgrund vieler Limitationen der 2D-Gel Technik versucht man in letzter Zeit, diese zu ersetzen bzw. weiter zu verbessern. Als Alternativen stehen chromatographische und elektrophoretische Techniken und deren Kombinationsmöglichkeiten zur Auswahl (Issaq, 2001). In letzter Zeit wurden einige Versuche unternommen, mittels multidimensionaler HPLC (zumeist Kombinationen aus Ionenaustausch- und Reversed-Phase-Chromatographie (Yates, 2001), sowie Ausschlußchromatographie) oder der Kopplung von HPLC und Kapillarelektrophorese (Manabe, 1999) diese komplexen Gemische aufzutrennen.

### 1.2.2 Detektion und Quantifizierung der Proteine

Die Detektion kann mit verschiedenen Methoden durchgeführt werden, wobei im Falle der 2D-Gele Färbungen angewendet werden. Die wichtigsten Parameter sind eine möglichst hohe Sensitivität, ein möglichst breiter, linearer dynamischer Bereich für Proteine mit unterschiedlichen Mengen und die Kompatibilität mit der nachfolgenden Analytik (Massenspektrometrie). Am häufigsten verwendet werden die Silberfärbung mit einem linearen Arbeitsbereich von ca. 1-60 ng/mm<sup>2</sup> (Berggren, 2000) und die Färbungen mit dem Triphenylmethanfarbstoff Coomassie Brilliant Blau R250 mit einem Arbeitsbereich von 50 ng – 1 µg/mm<sup>2</sup>. Die Silberfärbung erweist sich allerdings als schwer reproduzierbar, und bis 1996 (Shevchenko, 1996) waren keine Protokolle für den „In Gel“-Verdau von Silber gefärbten Gelen vorhanden. Während Coomassie Brilliant Blau nicht sensitiv genug ist, um die Mehrzahl der aufgetrennten Proteine in einem komplexen Proteingemisch zu visualisieren, ist die Silberfärbung zwar empfindlicher, jedoch die Quantifizierung Silber gefärbter Gele ungleich schwieriger. Es ist technisch sehr anspruchsvoll, reproduzierbare Silberfärbungen durchzuführen. Bei anschließender Quantifizierung der Signale können bei optimaler Durchführung Varianzen bis zu 20 % (Quadroni, 1999) auftreten.

In den letzten Jahren werden zunehmend Fluoreszenzfarbstoffe wie SYBPRO Ruby verwendet (Patton, 2000, 2002), da sie äußerst empfindlich sind, einen großen linearen, dynamischen Bereich haben und sich gut für Automatisierungen eignen. In allen Fällen erfolgt die Auswertung heutzutage computerunterstützt. Softwareprogramme verschiedener Firmen ermöglichen eine automatische Spoterkennung, Spotquantifizierung und anschließende Gelvergleiche. Ein neuer Ansatz für die Quantifizierung liegt in der Isotopenmarkierung bestimmter Aminosäuren und bedient sich anschließend der Massenspektrometrie für den quantitativen Vergleich.



### 1.2.3 Identifizierung der Proteine

Die erste Technik, die eine eindeutige Proteinidentifizierung zuließ, war die N-terminale-Edman-Sequenzierung (Edman, 1967) (Hewick, 1981) (Aebersold, 1986). Die Empfindlichkeit dieser Technik liegt bei ca. 10 pmol (Lottspeich, 1998), was 1 µg eines 100 kDa Proteins entspricht. Obwohl die N-terminale Sequenzierung nicht sonderlich empfindlich ist, hat sie den Vorteil, dass man de novo Proteinsequenzdaten generieren kann und somit die Analyse völlig unbekannter Proteine möglich ist. Mittlerweile haben allerdings Proteinidentifizierungsstrategien, die auf Massenspektrometrie mit anschließender Proteindatenbanksuche beruhen, an Bedeutung gewonnen, während Edman-Abbau nur noch in ganz seltenen Fällen verwendet wird. Das meist verwendete Verfahren zur Identifizierung von Proteinen mit bekannter Sequenz ist das MALDI Peptide Mass Fingerprinting (MALDI-PMF) (Henzel, 1993) (Yates, 1993). Hierbei werden die zu analysierenden Proteinspots im Gel enzymatisch mit Trypsin gespalten und mittels MALDI-ToF-MS (Matrix assistierte Laser Desorptions Ionisations Flugzeit (Time of Flight) Massenspektrometrie) (Karas, 1988) (Tanaka et al., 1988) das Molekulargewicht der entstehenden Fragmente genau bestimmt. Die erhaltenen Daten werden dann mit Hilfe von Computerprogrammen mit den Molekulargewichten der Fragmente verglichen, die sich theoretisch aus der Spaltung eines bestimmten Proteins ergeben müssten. Dies geschieht mit allen Datenbankeinträgen bekannter oder von Open Reading Frames abgeleiteter Proteine.

Die Proteinsequenzen mit den besten Übereinstimmungen werden anschließend ausgegeben. Die Empfindlichkeit dieser Technik liegt im unteren Picomol-beziehungsweise oberen Femtomol-Bereich (Lottspeich, 1998). Hier wird nun deutlich wie wichtig die Verfügbarkeit von komplett sequenzierten Genomen für eine erfolgreiche Proteomanalyse ist. Nur durch das Vorhandensein von exakten Gendatenbanken und den daraus resultierenden Proteinsequenzdaten ist es möglich, die erhaltenen Fragmentgrößen *in silico* einem bestimmten Protein zuzuweisen.

Proteinsequenzdaten anderer Spezies führen wie beispielsweise bei Homologieanalysen von DNS-Sequenzdaten (z.B. BLAST), meist nicht zur

Identifizierung des Proteins. Dies hat zur Folge, dass die Identifikation von Proteinen aus Spezies mit nur wenigen Protein-Datenbankeinträgen problematisch ist. Außerdem ist die Methode nur schwer auf stark posttranslational modifizierte und bisher unbekannte Proteine anwendbar, da durch die Modifikationen auch die Größe der entstehenden Fragmente stark verändert wird.

Eine weitere wichtige Methode ist ESI-MS (Metzger, 1994) (Wilm, 1996). ESI-MS steht für **Elektrospray-Ionisations-Massenspektrometrie** (Fenn, 1989). Die Empfindlichkeit dieses Verfahrens liegt im unteren Picomol-Bereich (Lottspeich, 1988). Eine Weiterentwicklung der bestehenden MALDI-MS Technik, bei der eine zusätzliche Fragmentierung der mittels MALDI-ToF-MS identifizierten Peptide erfolgt (MALDI-ToF/ToF-MS oder Tandem-Massenspektrometrie), kann zusätzliche Sequenzdaten liefern. Im folgenden Abschnitt sollen kurz die theoretischen Grundlagen der beiden hier erwähnten und in dieser Arbeit verwendeten massenspektrometrischen Techniken erklärt werden.

### **1.2.4 Matrix assistierte Laser Desorptions Ionisations Flugzeit Massenspektrometrie (MALDI)**

Auf einem metallischen Probenhalter (target plate) wird die Probe (Analyt) mit der Matrix in einem Verhältnis von circa 1: 1 000 - 10 000 gemischt. Bei der Verdunstung des Lösungsmittels kommt es zu einer Kokristallisation von Analyt und Matrix, wobei das Analytmolekül in den Kristallverband der Matrix eingebettet wird. Der Einbau der Probe in das Kristallgitter der Matrix ist dabei essentiell für das Funktionieren des nachfolgenden Prozesses. Daher ist ein Entsalzen der Probe vor der Analyse notwendig. Die Entsalzung der Proben kann z. B. mittels einer HPLC-Auftrennung erfolgen, wird aber heutzutage meist mit kommerziell erhältlichen „ZipTips“ (Kusmann, 1997) durchgeführt. Dies sind kleine Spitzen, die mit Reversed-Phase (RP) C<sub>18</sub>-Material gefüllt sind. Die Peptide binden dabei an das RP-Material und werden nach mehreren Waschschritten mit einem Anteil von circa 50 - 80 % an anorganischem Lösungsmittel von der Säule eluiert. Die Proben werden nach Auskristallisierung in das Hochvakuum des Massenspektrometers ( $10^{-9}$  mbar)

überführt. Die Matrix kann die Lichtenergie eines eingestrahnten, gebündelten Laserpulses optimal absorbieren und dabei schlagartig ins Vakuum verdampfen (s. Abbildung 1.2-2). Für Proteine und Peptide haben sich u.a. Zimtsäurederivate wie Sinapinsäure (Beavis, 1989) oder 4-Hydroxy- $\alpha$ -cyanozimtsäure (= HCCA) (Beavis et al., 1992), aber auch Benzooesäurederivate wie 2,4-Dihydroxybenzooesäure (Huth-Fehre et al., 1992) bewährt. Es wird angenommen, dass Analytmoleküle wie z.B. Peptide nach der Laserirradiation von der expandierenden Matrixwolke (*expanding plume*) mitgerissen und durch Matrixfragmentradikale chemisch ionisiert werden (Vertes et al., 1993). Es entstehen hauptsächlich einfach protonierte Peptide ( $[M+H]^+$ ) oder deprotonierte Peptide ( $[M-H]^-$ ) des Analyten. Sollen positiv geladene Teile detektiert werden, so liegt eine positive Beschleunigungsspannung von 10 - 30 kV am Probenhalter an. Umgekehrt liegt eine negative Spannung an, wenn deprotonierte Peptide analysiert werden sollen.

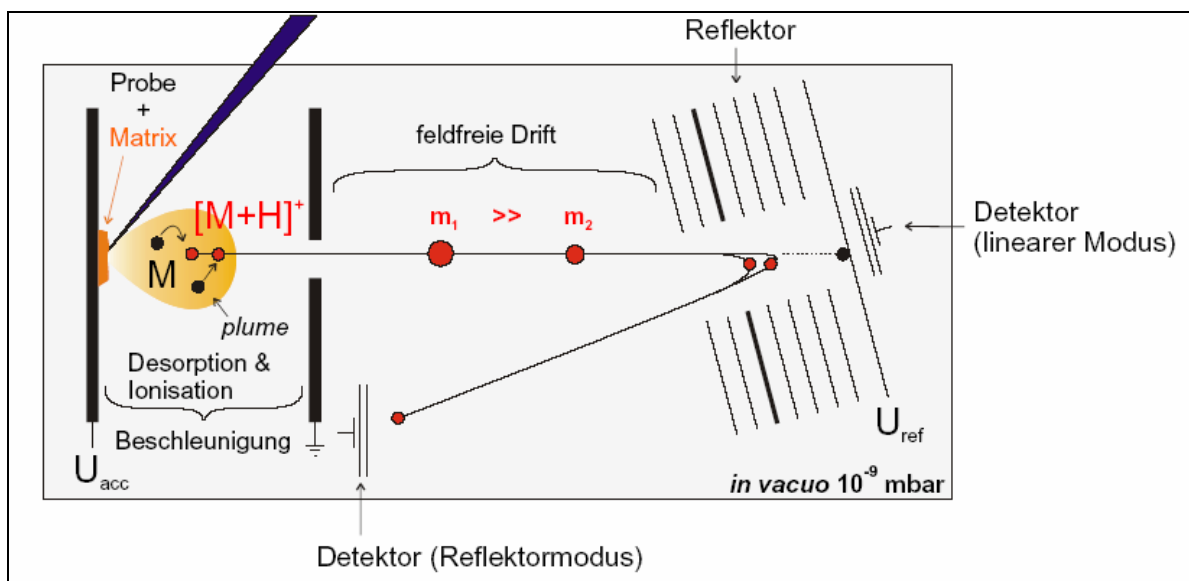


Abbildung 1.2-2: Aufbau eines MALDI-MS mit Linear- und Reflektormodus

Die geladenen Molekülionen werden über eine kurze Distanz in Richtung der Lochplatte im elektrischen Feld beschleunigt. Entlang einer anschließenden, feldfreien Driftstrecke separieren sich nun die Ionen aufgrund ihrer unterschiedlichen Fluggeschwindigkeiten, die durch ihr jeweiliges  $m/z$  (Masse/Ladung) Verhältnis und die Stärke des Beschleunigungsfeldes bestimmt ist. Ein Detektor registriert das

Eintreffen der Molekülonen am Ende der Driftstrecke. In erster Näherung ist die Flugzeit proportional zur Wurzel des  $m/z$  Verhältnisses ( $\text{ToF} \sim \sqrt{m/z}$ ). Zur Erhöhung der massenspektrometrischen Auflösung ( $m/\Delta m$ ) sind moderne MALDI-Massenspektrometer zusätzlich mit einem Reflektor ausgerüstet. Dieser befindet sich am Ende des Flugrohres und besteht aus mehreren Metallringen oder Gittern, an denen mehrstufige Reflektorpotentiale  $U_{\text{ref}}$  angelegt sind. Ionen gleichen  $m/z$  mit unterschiedlichen Endgeschwindigkeiten, wie sie z.B. aus verschiedenen Anfangsgeschwindigkeiten und Ionisations-Orten herrühren können, dringen unterschiedlich tief in das zunehmende elektrische Feld des Reflektors ein. Dieses Feld beschleunigt die Ionen zurück und bildet sie fokussiert auf dem zweiten Detektor (*reflektormode detector*) ab (s. Abbildung 1.2-2). Die so erhaltenen Informationen eines Peptides nennt man Peptidmassenfingerabdruck (peptide mass fingerprint = PMF).

### 1.2.4.1 Tandem-Massenspektrometrie

Werden Peptide in einem Massenspektrometer weiter fragmentiert und die Massen der Fragmente bestimmt, spricht man von Tandem-Massenspektrometrie (MS/MS). Die Auswahl der zu fragmentierenden Peptide erfolgt in einer ersten MALDI-ToF-Messung. Hier werden nach erfolgreicher Messung die fünf stärksten Signale für eine anschließende MS/MS-Messung ausgewählt. Abbildung 1.2-3 zeigt den Aufbau eines Tandem-Massenspektrometers. Nach Beschleunigung und zeitlicher Auswahl des zu fragmentierenden Peptids („Timed Ion Selector“) gelangt dieses in die Kollisionszelle (collision cell). Durch das Abbremsen der Peptide (retarding lens) vor Eintritt in die Zelle (üblicherweise bis auf 1 oder 2 keV Energie) und verschiedene Gasdrücke können Stoßenergien eingestellt werden, die bevorzugt zu Fragmentierungen an den Peptid-bindungen oder der -seitenketten führen. Die Fragmente werden anschließend in Source 2 wieder beschleunigt und die Auftrennung nach Flugzeit erfolgt im anschließenden Flugrohr und Reflektor. Durch die kürzere Länge des verbleibenden Flugrohres und Unschärfen, die bei den Stoßprozessen entstehen, ist die Massengenauigkeit bei MS/MS-Spektren deutlich niedriger als bei MS-Messungen. Ein

Vorteil dieser Fragmentierungsmethode ist, dass die Peptide hauptsächlich an der Peptidbindung fragmentieren, so dass die Massendifferenzen zwischen den Fragmenten den jeweils abgespalteten Aminosäuren entsprechen. Sind die Fragmente vom C-Terminus her intakt, spricht man von y-Ionen; sind sie hingegen vom N-Terminus her intakt, spricht man von b-Ionen. Es gibt noch eine ganze Reihe weiterer Fragmente, die durch Brüche an anderen Bindungen entstehen, die aber bei MALDI-ToF/ToF relativ selten auftreten (a, c, x, z, sowie interne Fragmente).

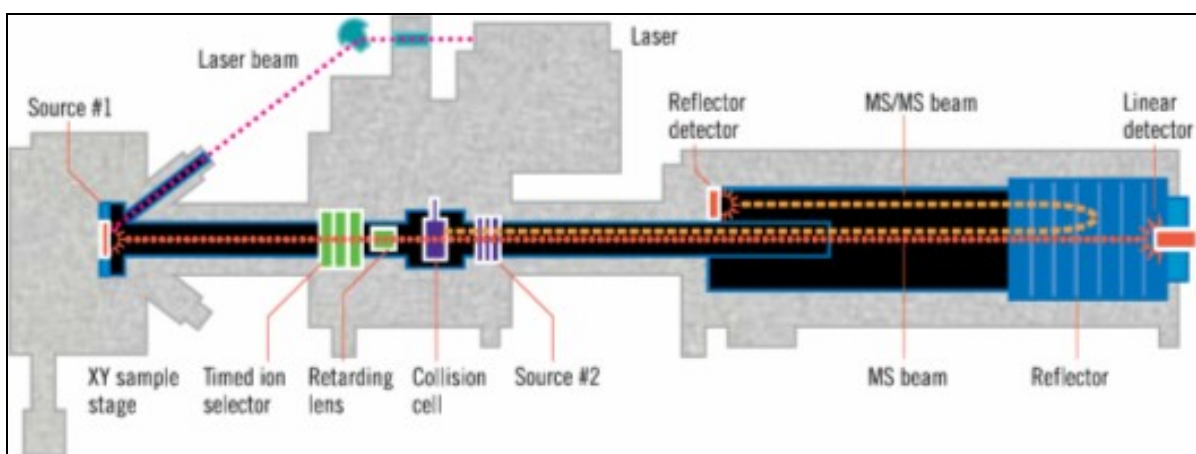


Abbildung 1.2-3: Schematischer Aufbau eines ToF/ToF-Massenspektrometers (4700 Proteomics Analyzer der Firma Applied Biosystems)

Mithilfe von MS/MS-Spektren können vielfältige Informationen über die Aminosäuresequenz gewonnen werden. Dies eignet sich besonders für die Bestätigung von nicht eindeutigen Identifizierungen mittels PMF und die Charakterisierung von posttranslationalen Modifikationen. Die Suche basiert dabei genau wie beim PMF auf dem Vergleich mit einer Datenbank. Zusätzlich können beide Messmethoden kombiniert und so die Vorteile beider Techniken für eine Identifizierung eines Proteins genutzt werden.

### 1.2.5 Elektrospray-Ionisations-Massenspektrometrie (ESI-MS)

Die direkte Analyse gelöster Biomakromoleküle wie Peptide und Proteine ermöglicht die ESI-MS (Siuzdak, 1994), (Przybylski et al., 1996). Eine Lösung dieser Analyte in

wasserhaltigen, organischen Lösungsmitteln wird hierbei unter atmosphärischem Druck in einem elektrischen Feld fein versprüht. Hierzu wird eine metallisierte, spitz ausgezogene, durchlässige Kapillare ( $\varnothing$  0,1 mm), die mit der Probenlösung gefüllt ist, an eine Hochspannungsquelle (0,3 - 6 kV) angeschlossen. Im elektrischen Feld deformiert sich die Flüssigkeitsoberfläche an der Austrittsstelle der Kapillare zum sog. „Taylor Cone“ (s. Abbildung 1.2-4). Dieser emittiert an seiner Spitze hochgeladene Tröpfchen. Die Aerosolbildung wird bei größerer Flüssigkeitszufuhr in der Regel mit einem zerstäubend wirkenden Gasstrom (z.B.  $N_2$ ) und durch Wärmezufuhr unterstützt. Durch Stöße mit Molekülen eines entgegenströmenden Gases (*curtain gas*) erfolgt die Desolvatisierung des Aerosols. Dabei verringert sich die Tröpfchengröße durch Verdampfen des Lösungsmittels so lange, bis die repulsiven Coulombkräfte in den Tröpfchen größer werden, als die Oberflächenspannung. Als Folge werden viel kleinere Tropfen (sog. Mikrotropfen) emittiert, die im Verhältnis zum Volumen eine große Ladung tragen und im elektrischen Feld stark beschleunigt werden (zur Theorie Wilm et al., 1994). Aus kleinen Analytmolekülen werden hauptsächlich einfach geladene Ionen erzeugt. Makromoleküle liefern dagegen verschiedene mehrfach geladene Ionen.

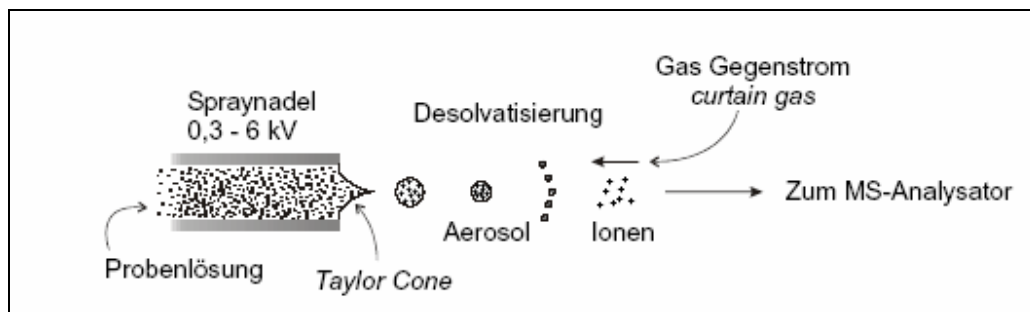


Abbildung 1.2-4: Bildung des Taylor Konus und Desolvatisierung der Probe im ESI-MS

Bei den in dieser Arbeit verwendeten Geräten handelte es sich um Triple Quadrupol Elektrospray Massenspektrometer (s. Abbildung 1.2-5). Die Ionen werden über sog. „ion guide“-Quadrupole (Q0 und *stubbies* in Abbildung 1.2-5), die auf bestimmten Hochfrequenzen arbeiten, vom Feinvakuum- in den Hochvakuum-Bereich des Massenspektrometers überführt. Der nachfolgende Quadrupol (Q1) ist auf eine feste Frequenz abgestimmt, so dass diesen nur Ionen eines bestimmten  $m/z$  Wertes

passieren können. Die so herausgefilterten, vorzugsweise doppelt oder 3-fach geladenen Ionen gelangen in die Kollisionskammer, in der sie mit verdünnten Gasen wie  $N_2$  oder  $Ar$  kollidieren und fragmentieren (*collision induced decay* = CID). Der Quadrupol Q2 in der Kollisionskammer wirkt als *ion guide* und verhindert das Entweichen der Ionen. Der letzte Quadrupol (Q3 in Abbildung 1.2-5) dient schließlich der Auftrennung der entstandenen Fragmente. Daher wird seine Frequenz im erwarteten  $m/z$ -Bereich variiert.

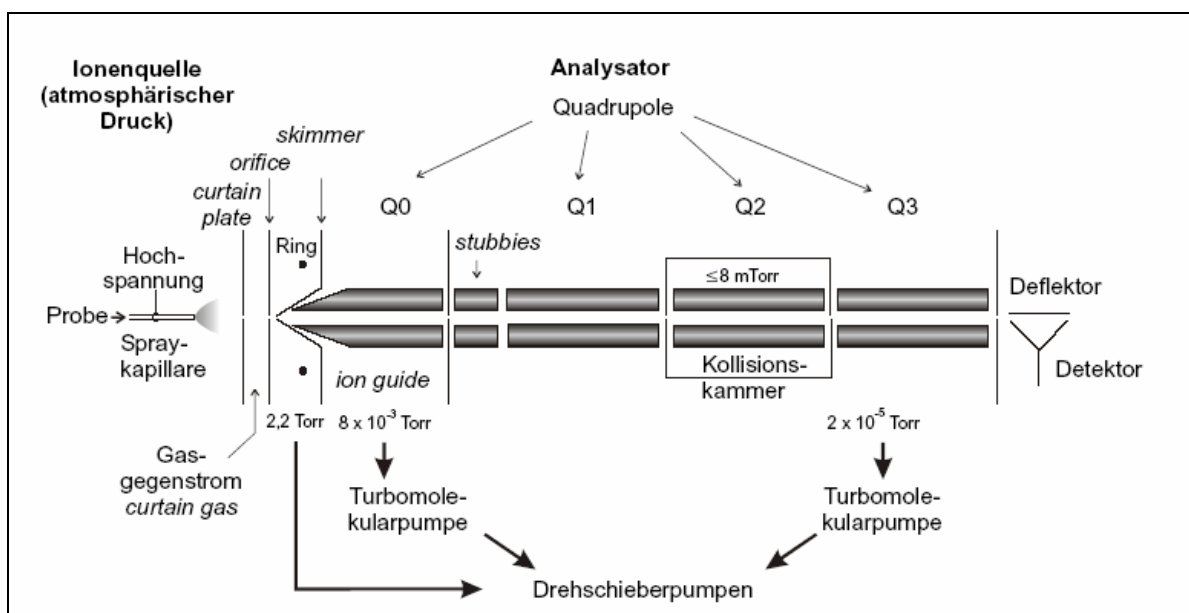


Abbildung 1.2-5: Aufbau eines Triple-Quadrupol-Elektrospray-Massenspektrometers. Der Aufbau entspricht dem Gerät API 300 von PE/Sciex

Diese Technik ermöglicht es, kleine Mengen von unterschiedlichen Metaboliten, wie z.B. Aminosäuren in mehr oder weniger komplexen Proben zu identifizieren und über einen, der Probe zugesetzten internen Standard zu quantifizieren.

### 1.3 Nutrionomik

Nahrung ist für alle Organismen, unabhängig ob einzellige oder mehrzellige Lebewesen, essentiell. Biologische Systeme sind auf chemische Energie angewiesen, die fast ausschließlich durch Pflanzen gebildet wird. Pflanzen sind Teil der als Primärproduzenten bezeichneten untersten Stufe innerhalb der

Nahrungspyramide und bilden das Fundament für alle höheren Tiere. Die Evolution führte durch Mutation und Selektion über Jahrmillionen zu einer immer weiter steigenden Komplexität der Zellorganisation innerhalb eines Individuums und gleichzeitig zu einem optimierten Verwertungssystem der aufgenommenen Nahrung. Je komplexer ein Lebewesen aufgebaut war, umso wichtiger wurde die gleichbleibende Versorgung mit Nährstoffen und Aufrechterhaltung der Homeostase. Kohlenhydrate und Proteine stellen für viele Lebewesen die wichtigsten Nahrungsquellen dar. Mit diesen Nährstoffen in Verbindung stehende Regulationsprozesse und Signalwege sollten daher konserviert vorliegen.

### 1.3.1 Der Insulinsignalweg

Auf der Suche nach Homologen zum bereits bekannten Insulinsignalweg bei Säugern, stieß man bald in *Drosophila* und *Caenorhabditis elegans* auf ähnliche Komponenten (Lehner, 1999), (Brogiolo et al., 2001) (Gems, D. et al., 2001).

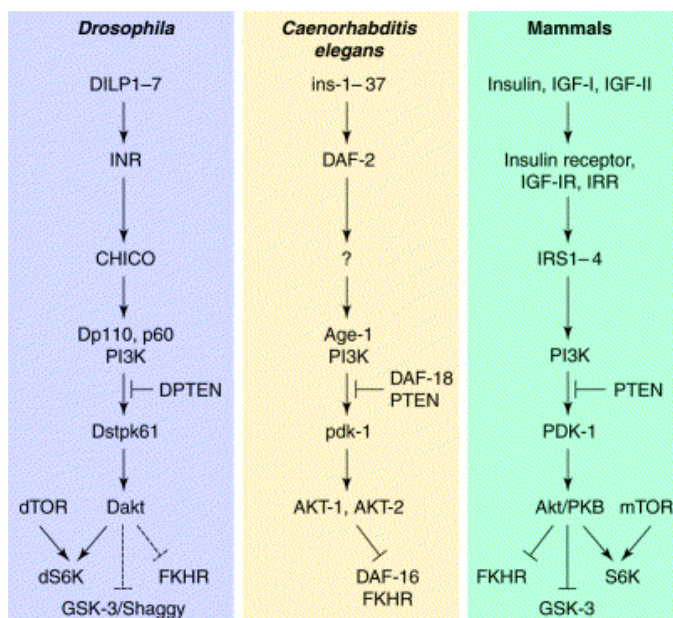


Abbildung 1.3-1: Homologe Insulinsignalwege unterschiedlicher Spezies (Garofalo, 2002)



Der Insulinsignaltransduktionsweg ist bei *C.elegans* und *D. melanogaster* in vielen Fällen homolog zu dem der Säuger. Der Insulinrezeptor besteht bei Säugern aus je zwei  $\alpha$  und  $\beta$  Untereinheiten und bildet ein tetrameres Protein (Leevers, 2001). Das *C.elegans* Homolog DAF-2 (Kimura, 1997), (Ruvkun, 1998) und das *Drosophila* Homolog dInR (Yenush, 1996) führten bei Mutationen der Rezeptoren zu vergleichbaren Phänotypen. Veränderungen des Wachstums, der Körpergröße und der Lebensspanne waren die Folgen (Brogiolo, 2001) (McCulloch, 2003). Die Erkenntnis, dass der Insulinsignalweg Einfluss auf die Lebensdauer besitzt, wurde durch die Tatsache gestützt, dass eine kalorienarme Diät bei Säugern ebenfalls zu einer Verlängerung der Lebensspanne führte (Lane, 1999) (Roth, 2000) (Buch, 2006). Die Identifikation von Genen war und ist ein wichtiger Schritt auf dem Weg zur Identifizierung genetischer Signalwege und deren Regulation. Eine Technik zur schnellen Identifizierung von regulationsaktiven Genen stellen Mikroarrays zur Verfügung.

#### **1.4 Ernährungsabhängige Regulation von Genen**

Die Technik der Mikroarrays ermöglicht es, auf einem kleinen Chip in der Größe eines handelsüblichen Objektträgers, die Expression von mehreren tausend Genen gleichzeitig zu bestimmen. Zur Bestimmung nahrungsabhängig regulierter Gene wurden Gruppen von 2. Instar Larven mit einer Hefesuspension (Kontroll-Gruppe), 20 %-ige Zuckerlösung und einer PBS-Lösung gefüttert (Hunger-Gruppe). Die Gene wurden je nach Regulation in unterschiedliche Kategorien klassifiziert. Eine dieser Kategorien enthielt Gene, die unter Zuckerbedingungen stark reguliert wurden, während sich unter Hungerbedingungen keine Veränderung zur Kontrolle zeigten (Zinke, 2002).

Eines dieser Gene war *sugarbabe* (CG3850), welches bereits nach einer Stunde unter Zucker um etwa das siebzehnfache hochreguliert wurde. Es wurde vermutet, dass *sugarbabe* als Transkriptionsfaktor die Regulation von Zielgenen des Fettstoffwechsels bewirkt. Der genaue Mechanismus sowie Art und Weise der Regulation sind bis jetzt ungeklärt. Eine Analyse des Promoterbereichs zeigte eine mögliche Beteiligung von C/EBP in der *sug* Regulation. Diese Beteiligung sollte im

Rahmen dieser Arbeit weiter untersucht und analysiert werden. Neben der Analyse der Genomik-Daten sollten zusätzliche Untersuchungen der nahrungsabhängigen Proteinregulation einen tieferen Einblick in die beteiligten metabolischen Signalwege geben. Die Kombination aus Nutriogenomik und Nutriproteomik führte zur Etablierung des Begriffes Nutrionomik.

### 1.5 *Drosophila melanogaster* als Modellorganismus für nahrungsbedingte Expressionsänderungen

Larven der Fruchtfliege *Drosophila melanogaster* eignen sich besonders gut für die Untersuchung von Nahrungsveränderungen, da sie während der ersten 100 Stunden ihrer Entwicklung kontinuierlich Nahrung zu sich nehmen. Die Larven vervielfachen dabei ihr Gewicht innerhalb von nur wenigen Tagen um das 200-fache. Die Entwicklung einer Larve von der Eiablage bis zur Puppe dauert unter optimalen Bedingungen (25 °C und ausreichend Nahrung) lediglich 117 Stunden (s. Abbildung 1.5-1).

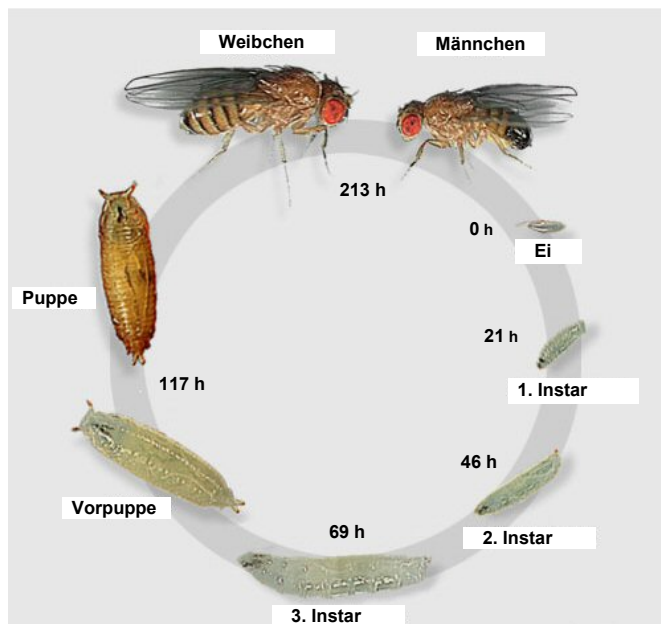


Abbildung 1.5-1: Lebenszyklus von *Drosophila melanogaster*. Die Angaben beziehen sich auf Entwicklung unter optimalen Bedingungen

Die Abbildung verdeutlicht gleichzeitig den enormen Größenzuwachs innerhalb der ersten Larvalstadien. Um diese enorme Größenzunahme in diesem kurzen Zeitraum zu erreichen, sind die Larven auf ein ständiges Nahrungsangebot angewiesen. Der Entzug von Nährstoffen hat somit sofortige und teilweise drastische Auswirkungen auf den Organismus. Zinke (Zinke, 2002) konnte zeigen, dass sich Larven des 2. Instar sehr schnell auf ein wechselndes Nahrungsangebot einstellen können. Es konnte gezeigt werden, dass es durch Untersuchung der RNS-Mengen möglich ist, metabolische Signalwege zu identifizieren, die von Larven benötigt werden, um beispielsweise Zucker als alleinige Nahrungsquelle nutzen zu können. Detaillierte Daten zum Proteom liegen bisher allerdings nicht vor.

## 1.6 Ziel der Arbeit

Für die Untersuchung nahrungsvermittelter Proteinregulation, sollte zunächst ein System etabliert werden, mit dem es möglich war, die Proteinregulation eines Organismus oder nur Teilen dessen proteomweit zu untersuchen. Die Auftrennung der sehr komplexen Proben sollte mittels zweidimensionaler Gelelektrophorese (2D-GE) erfolgen. Die 2D-GE ist in der Lage unter optimalen Bedingungen bis zu 1 000 einzelne Proteine zu trennen und der weiteren Analyse zugänglich zu machen. Verdau und anschließende Massenspektrometrie der Proteine sollte es ermöglichen, Proteine zu identifizieren, die bei der Anpassung an verschiedene Nahrungsbedingungen wichtig sind, oder die, bei Mutationen wichtiger Komponenten des Insulinsignalweges, unterschiedlich zum Wildtyp reguliert werden.

Gleichzeitig sollten die Genregulation, sowie der beteiligte Signalweg von *sug* (CG3850) weiter untersucht und charakterisiert werden. Es konnte bereits gezeigt werden, dass *sug* mit den Zielgenen CG8093, CG6271 und CG6277 interagiert und deren Genregulation beeinflusst. Als Transkriptionsfaktor besitzt *sug* fünf Zinkfinger des Motivs Cys<sub>2</sub>-His<sub>2</sub>, das hauptsächlich als DNS-Bindemotiv klassifiziert wurde (Pavletich et al., 1991) (Jacobs, 1992). Dieses Bindemotiv ist in der Lage innerhalb des Promoters der Zielgene zu binden. In dieser Arbeit sollte nun die Signalkaskade, die zur Aktivierung und Regulation von *sug* führt, weiter untersucht werden. Ein sehr viel versprechender Kandidat war der Transkriptionsfaktor C/EBP, für den 5 mögliche Bindestellen innerhalb des *sug* Promoters identifiziert werden konnten.

## 2 Material

### 2.1 Bezugsquellen für Verbrauchsmaterialien und Chemikalien

<b>Name</b>	<b>Abkürzung</b>	<b>Bezugsquelle</b>
α-Cyano-4-hydroxy-Zimtsäure p.A.	CHCA	Applied Biosystems, Darmstadt
β-Mercaptoethanol	β-ME	Roth, Karlsruhe
11 cm Strip Holder		Amersham Biosciences Europe GmbH, Freiburg
3-(N-Morpholino)-propansulfonsäure	MOPS	Roth, Karlsruhe
5-Bromo-4-chloro-3-indolyl-Phosphat	X-Phos	Roth, Karlsruhe
Aceton		Roth, Karlsruhe
Acetonitril LC-MS CHROMASOLV	ACN	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Agar		Difco Laboratories, Augsburg
Agarose		PeqLab, Erlangen
Ammoniumperoxydisulfat	APS	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Ampicillin	Amp	Roth, Karlsruhe
Apfelsaft		Verschiedene Hersteller
Bacto Trypton, Select Pepton		Difco, Detroit, Michigan, USA
Bakterienplatten		Greiner, Frickenhausen
Bierhefe		Brecht, Eggenstein
Blaukappengefäße (15 ml und 50 ml)		Greiner, Frickenhausen
Bradford Reagenz		BioRad, München
Bromphenolblau		Serva, Heidelberg
Calciumchlorid	CaCl <sub>2</sub>	Merck, Darmstadt
Coomassie Brillant Blau R250		Serva, Heidelberg
Dalt Six Gelgießstand, Gelkassetten		Amersham Biosciences Europe GmbH, Freiburg
Destreak Rehydrierungslösung		Amersham Biosciences Europe GmbH, Freiburg
Dinatriumhydrogenphosphat	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	Roth, Karlsruhe
Dithiothreitol; Threo-1,4-dimercapto-2,3-butandiol; Cleland's Reagenz	DTT	Invitrogen Lifetechnologies (Deutschland), Karlsruhe
DNS-Längenmarker, 1 kb-Leiter		Invitrogen Lifetechnologies (Deutschland), Karlsruhe
DNS-Längenmarker, 100 bp-Leiter		PeqLab, Erlangen
Equilibrierungsröhren		Amersham Biosciences Europe GmbH, Freiburg
Essigsäure, 100%, p.A.		Merck, Darmstadt
Ethanol, p.A.		Roth, Karlsruhe
Ethanol, technisch		Roth, Karlsruhe
Ethidiumbromid		Roth, Karlsruhe

## Material

Ethylendiamintetraessigsäure, Titrierkomplex 3	EDTA	Roth, Karlsruhe
Ethylenglykol-bis-(2-aminoethyl)-tetraessigsäure	EGTA	Roth, Karlsruhe
Ettan IPGphor Manifold		Amersham Biosciences Europe GmbH, Freiburg
Fadenagar		Brecht, Eggenstein
Faltenfilter		Macherey-Nagel, Düren
Ficoll 400		Roth, Karlsruhe
Formaldehyd 37 %		Merck, Darmstadt
Formamid		Roth, Karlsruhe
Frischhefe		Fala, Straßburg, Frankreich
Gel Blotting Papier (GB002)		Schleicher&Schuell, Dassel
Glucose		Roth, Karlsruhe
Glycerol, Glycerin		Roth, Karlsruhe
Glycin		Roth, Karlsruhe
Hefe-Extrakt		Invitrogen Lifetechnologies (Deutschland), Karlsruhe
4-(2-Hydroxyethyl)-piperazin-1-ethansulfonsäure	HEPES	Roth, Karlsruhe
Hyperfilm™ ECL		Amersham Biosciences Europe GmbH, Freiburg
Immobiline DryStrip pH 3-10 (11cm linear)		Amersham Biosciences Europe GmbH, Freiburg
Immobiline DryStrip pH 3-10 (24 cm linear)		Amersham Biosciences Europe GmbH, Freiburg
Immobiline DryStrip Cover Fluid		Amersham Biosciences Europe GmbH, Freiburg
Immobiline DryStrip Reswelling Tray, for 7-24 cm IPG strips		Amersham Biosciences Europe GmbH, Freiburg
Injektionsnadeln (Femtotips)		Eppendorf, Hamburg
IPG-Puffer pH 3-10		Amersham Biosciences Europe GmbH, Freiburg
Isopropanol, 2-Propanol		Merck, Darmstadt
Kaliumchlorid	KCl	Roth, Karlsruhe
Kaliumdihydrogenphosphat	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Roth, Karlsruhe
Kanamycin A Monosulfat	Km	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Klebeband, doppelseitig		Scotch 3M, USA
Klorix (Hypochloridlösung)		Colgate-Palmolive, Heidelberg
Levamisol		Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Litiumchlorid	LiCl	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Magnesiumchlorid	MgCl <sub>2</sub>	Roth, Karlsruhe
Magnesiumsulfat	MgSO <sub>4</sub>	Roth, Karlsruhe
Maismehl		Friedrichstal Mühle, Stutensee
Methanol		Roth, Karlsruhe
Methanol HPLC Qualität		Sigma-Aldrich, Taufkirchen

Mikrozentrifugenreaktionsgefäße (1,6; 2,0 ml)		Eppendorff, Hamburg
Milchpulver		verschiedene Hersteller
N,N,N',N'-Tetramethyldiamin	TEMED	Roth, Karlsruhe
N,N'-Methylenbisacrylamid		Roth, Karlsruhe
Natriumacetat, p.A.	NaAc	Roth, Karlsruhe
Natriumcarbonat	NaCO <sub>3</sub>	Roth, Karlsruhe
Natriumchlorid	NaCl	Roth, Karlsruhe
Natriumdodecylsulfat, p.A.	SDS	Roth, Karlsruhe
Natriumhydroxid, Plätzchen, p.A	NaOH	Roth, Karlsruhe
(tetra)-Natrium-Pyrophosphat-Decahydrat	Na <sub>4</sub> P <sub>2</sub> O <sub>7</sub> *10H <sub>2</sub> O	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Natriumphosphat	Na <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Merck, Darmstadt
Natriumthiosulfat	Na <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	Roth, Karlsruhe
Nipagin		Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Nonidet-P40	NP-40	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Nylonmembranen ( <i>Hybond</i> )		Amersham Biosciences Europe GmbH, Freiburg
Nylonmembranen ( <i>porablot NY amp</i> )		Macherey-Nagel, Düren
Oligo-d(T) <sub>12-18</sub>		Amersham Biosciences Europe GmbH, Freiburg
Oligonukleotide		MWG-Biotech, Ebersberg
P81-Filterpapier		Schleicher&Schuell, Dassel
Phosphat gepufferte Salzlösung	PBS	Invitrogen Lifetechnologies (Deutschland), Karlsruhe
Poly(A) DNS		Amersham Biosciences Europe GmbH, Freiburg
Rinderserum-Albumin	BSA	NEB, Frankfurt
RNA-Längenmarker		Sigma-Aldrich, Taufkirchen
RNA sample loading buffer		Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Rotiphorese Gel 30 (37,5:1)		Roth, Karlsruhe
Saccharose		Roth, Karlsruhe
Salzsäure, 37%, p.A.	HCl	Merck, Darmstadt
Silbernitrat	AgNO <sub>3</sub>	Roth, Karlsruhe
Trifluoressigsäure für Proteinsequenzanalyse	TFA	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Triton X-100		Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Tris(hydroxymethyl)aminomethan	Tris	Roth, Karlsruhe
Trypton, Pepton		Roth, Karlsruhe
Tween20		Roth, Karlsruhe
Whatman 3MM-Filterpapier		Schleicher&Schuell, Dassel
Zuckerrübensirup		Grafschafter, Meckenheim

## 2.2 Bezugsquellen für Enzyme

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

<b>Name</b>	<b>Abkürzung</b>	<b>Bezugsquelle</b>
Calf Intestine Phosphatase	CIP	NEB, Frankfurt
Desoxyribonuklease	DNaseI	Promega, Mannheim
Go-Taq-Polymerase	Taq	Invitrogen Lifetechnologies (Deutschland), Karlsruhe
Lysozym		Boehringer, Mannheim
M-MLV-Reverse Transkriptase	RT	Promega, Mannheim
Proteinase K		Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Restriktionsendonucleasen		Gibco, Invitrogen, Karlsruhe oder NEB, Frankfurt oder Promega, Mannheim
Ribonuklease	RNase	Promega, Mannheim
Ribonuklease Inhibitor	RNasin	Promega, Mannheim
SuperScript™II RNase H <sup>-</sup> Reverse Transcriptase	RT	Invitrogen Lifetechnologies (Deutschland), Karlsruhe
T4 DNS-Ligase		Invitrogen Lifetechnologies (Deutschland), Karlsruhe
Trypsin (Proteomics Quality), aus Schweinepankreas		Sigma-Aldrich, Taufkirchen



### 2.3 Bezugsquellen für Kits

<b>Name</b>	<b>Bezugsquelle</b>
2D Quant Protein Assay Kit	Amersham Biosciences Europe GmbH, Freiburg
2D Clean-up Kit	Amersham Biosciences Europe GmbH, Freiburg
ECL Western blotting detection reagents	Amersham Biosciences Europe GmbH, Freiburg
NucleoSpin® Extract 2 in 1 Kit	Macherey-Nagel, Düren
NucleoSpin® RNA II Kit	Macherey-Nagel, Düren
NucleoSpin® RNA L Kit	Macherey-Nagel, Düren
Microcon®30 Centrifugal Filter Devices	Millipore, Eschbronn
Plus One Silver Staining Kit, Protein	Amersham Biosciences Europe GmbH, Freiburg
Qiagen Plasmid Maxi Kit	Qiagen, Hilden
QIAquick Gel Extraction Kit	Qiagen, Hilden
RC DC Protein Assay Kit	Bio-Rad, München
TOPO TA Cloning® Kit	Invitrogen, Groningen, Niederlande

### 2.4 Bezugsquellen für Geräte

<b>Gerät</b>	<b>Typ</b>	<b>Hersteller</b>
4700 Proteomics Analyzer	MALDI-ToF/ToF	Applied Biosystems, Kalifornien, USA
Brutschrank	Perfect	Memmert, Schwabach
Bruttschränke mit Schüttler	HT	Infors, Bottmingen, Schweiz
Entwicklungskassetten	Suprema	Dr. Goos, Heidelberg
Ettan IPGPhor		Amersham Biosciences Europe GmbH, Freiburg
Filmentwickler	M35 X-OMAT Processor	Kodak, Stuttgart
Heizblock	ThermoStat Plus	Eppendorf, Hamburg
Heizblock mit Schüttler	ThermoMixer 5436	Eppendorf, Hamburg
Kühlbrutschrank	Kühlbrutschrank 3101	Rumed-Rubarth Apparate GmbH, Laatzen
MDS Sciex API 365 LC/MS/MS triple quadrupole		Applied Biosystems, Kalifornien, USA
Netzgerät für Elektrophorese	(stabilisiert)	Fischer, Heidelberg
Netzgerät für Elektrophorese	200/2.0	BioRad, Hercules, Kalifornien, USA
Netzgerät für Elektrophorese	E844	Consort

## Material

pH-Meter	766 Calimatic	Knick, Berlin
Photometer	BioPhotometer	Eppendorf, Hamburg
Pipetten	Pipetman	Gilson (Deutschland), Langenfeld
Realtime Thermocycler	ABI 7000 Sequence Detection System	Applied Biosystems, Darmstadt
Schüttler		Heidolph, Nürnberg
Schwenktisch	Polymax 2040	Heidolph, Nürnberg
Spektrometer	UV/Vis Spekol	Zeiss, Jena
Thermocycler	PTC-200 Peltier Thermal Cycler, MJ-Research	Biozym, Oldendorf
Tischzentrifuge	Biofuge A	Heraeus, Hanau
Tischzentrifuge	Centrifuge 5415D	Eppendorf, Hamburg
Gel Dokumentations System	E.A.S.Y Win32	Heraeus, Hanau
UV-Leuchttisch	Transilluminator TR-302	Spectroline, New York, USA
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 5403	Eppendorf, Hamburg
Zentrifuge	Megafuge 1.0	Heraeus, Hanau

## 2.5 Lösungen und Medien

<b>Name</b>	<b>Zusammensetzung</b>
Antikörper-Puffer	150 mM NaCl, 20 mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , pH 7,0
AP-Puffer (alkalische Phosphatase Puffer)	100 mM NaCl, 50 mM MgCl <sub>2</sub> , 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
Coomassie Brillant Blau-Entfärbelösung	50 % (v/v) Methanol, 10 % (v/v) Essigsäure
Coomassie Brillant Blau-Färbelösung	0,2 % (w/v) Coomassie Brillant Blau R250, 50 % (v/v) Methanol, 7,5 % (v/v) Essigsäure
DNS-Ladepuffer (10 x)	25 % (w/v) Ficoll 400, 0,15 % (w/v) Bromphenolblau, 0,15 % (w/v) Xylen Cyanol FF
Fliegenfutter (1,5 l)	1,33 l H <sub>2</sub> O, 16,5 g Bierhefe, 81,5 g Maismehl, 8 g Fadenagar, 100 ml Zuckerrübensirup, 200 ml 10% Nipagin (in 100 % Ethanol gelöst)
Lämmli-Puffer	25 mM Tris, 192 mM Glycin, 0,1 % (w/v) SDS

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
Polyacrylamid-Sammelgel	4 % (v/v) Acrylamid, 0,1 % (v/v) N,N'-Methylenbisacrylamid, 125 mM Tris-HCl 6,8, 0,1 % (w/v) SDS, 0,1 % (v/v) APS, 0,1 % (v/v) TEMED
Polyacrylamid-Trenngel	6 bis 12 % (v/v) Acrylamid, 0,16 - 0,32 % (v/v) N,N'-Methylenbisacrylamid, 375 mM Tris-HCl 8,8, 0,1 % (w/v) SDS, 0,1 % (v/v) APS, 0,1 % (v/v) TEMED
Protein Extraktionspuffer	120 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl 7,0, 20 mM NaF, 1 mM Benzamidin, 1mM EDTA, 1mM EGTA, 15 mM Na <sub>4</sub> P <sub>2</sub> O <sub>7</sub> * 10 H <sub>2</sub> O, 1% Nonidet-P40
SDS-Probenpuffer (2 x)	25 mM Tris-HCl 6,8, 4 % (w/v) SDS, 20 % (v/v) Glycerol, 0,01 (w/v) % Bromphenolblau, 2 % (v/v) 2-Mercaptoethanol
Silberentwicklungslösung	6 % (w/v) Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> , 0,02 % (w/v) Formaldehyd, 0,02 % (w/v) Na <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>3</sub>
Silber-Fixlösung	40 % (v/v) Methanol, 12 % (v/v) Essigsäure
TBE (5 x)	445 mM Tris-Base, 520 mM H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub> , 10 mM EDTA, pH 8,2
TBS	10 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, pH 7,5
TBS-Tween-Puffer	20 mM Tris-HCl, 500 mM NaCl, 0.05% (v/v) Tween 20, pH 7.5
TBS-Tween/Triton-Puffer	20 mM Tris-HCl, 500 mM NaCl, 0.05% (v/v) Tween 20, 0.2% (v/v) Triton X-100, pH 7.5
TE-Puffer	10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8,0
TELT-Puffer	50 mM Tris-HCl 8,0, 62,5 mM EDTA, 2,5 M LiCl, 0,4 % (v/v) Triton X-100
Topagar	0,7 % (w/v) Agar in LB-Medium
Western-Transferpuffer (wet)	48 mM Tris-Base, 39 mM Glycin, 20 % (v/v) Methanol pH 8,3
Western-Transferpuffer (semi)	25 mM Tris-HCl, 192 mM Glycin, 20 % (v/v) Methanol, pH 8,3

## 2.6 Fliegenlinien

<b>Linienbezeichnung</b>	<b>Genotyp (Chromosom)</b>	<b>Liniennummer / Bezugsquelle</b>
Akh-Gal4	yw;; pPTGal-akh	Jae H. Park, Knoxville, USA
chico <sup>1</sup>	w; chico <sup>1</sup> /CyO	Ernst Hafen, Zürich, CH
chico <sup>2</sup>	w; chico <sup>2</sup> /CyO	Ernst Hafen, Zürich, CH
InsP3-Gal4	w;; pCaSpeR-InsP3	Eigene Linie
Sp/CyO; Dr/TM3	w/y;Sp/CyO;Dr/TM3,Sb (X, 2, 3)	Eigene Linie
Sug-Gal4	pCaSpeR-Sug (X)	Eigene Linie
UAS-LacZ	w; P(UAS)-lacZ.NZ	BL-3955/ Bloomington
UAS-rpr/hid	Yw, UAS-rpr;; UAS-hid	Ernst Hafen, Zürich, CH
Wildtyp	Oregon R-S	BL-4269/ Bloomington
w <sup>1118</sup>	w <sup>1118</sup> (X)	BL-3605/ Bloomington

## 2.7 Vektoren und Plasmide

<b>Name</b>	<b>Klonierungsmethode oder Bezugsquelle</b>
pBst KS (+)	pBluescript KS, Stratagene
pcDNA 3.1 (-)	pcDNA3.1(-), Invitrogen
pCaSpeR-AUG-Gal4	P-Element-Vektor; L.B. Vosshall, unveröffentlichte Daten, Cell 2000, Vol. 102, S. 147-159
pCR II	pCR <sup>®</sup> II-TOPO-Vektor aus dem TOPO <sup>™</sup> TA Cloning <sup>®</sup> Kit
Δ2,3	Helferplasmid für P-Element-Vektor

## 2.8 Bakterienstämme

<b>Stamm</b>	<b>Genotyp oder Herstellerangabe</b>
<i>E.coli</i> DH5α	<i>supE44 ΔlacU169 (ϕ80lacZΔM15) hsdR17 recA1 endA1 gyrA96 thi-1 relA1</i>
<i>E.coli</i> TOP10	Genotyp siehe TOPO TA Cloning Kit (F <sup>-</sup> <i>mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) ϕ80lacZΔM15 ΔlacX74 recA1 deoR araD139 Δ(ara-leu)7697 galU galK rpsL (Str<sup>R</sup>) endA1 nupG</i> )

## 2.9 PCR Primer

Probe	Primerpaar	Produktgröße und Beschreibung	Zyklen	Annealing-Temperatur (°C)
<i>act5C</i>	<i>Act5+/Act7-</i>	840 bp, Exon 3, im offenen Leseraster von <i>actin5C</i>	18,19	54
<i>act5C</i>	<i>Act-syF/Act-syR</i>	100 bp, cDNS Sequenz für Real Time PCR	40	60
<i>slbo</i>	<i>F1/R1</i>	752 bp, cDNS Sequenz	24	56
<i>slbo</i>	<i>F2/R2</i>	751 bp, cDNS Sequenz	24	56
<i>chico</i>	<i>F1/R1</i>	752 bp, cDNS Sequenz	25	55
<i>chico</i>	<i>F2/R2</i>	759 bp, cDNS Sequenz	25	55
<i>sugarbabe</i>	<i>CG3850 F1/R1</i>	623 bp, cDNS Sequenz	24	52, 54
<i>sugarbabe</i>	<i>CG3850 syF/syR</i>	100 bp, cDNS Sequenz für Real Time PCR	40	60

## 2.10 Primersequenzen

Primer	Größe (Bp)	Primersequenz
<i>act5+</i>	19	CGT CTT CCC ATC GAT TGT G
<i>act7-</i>	19	GAT GCC AGG GTA CAT GGT G
<i>act-syF</i>	19	CCC TCG TTC TTG GGA ATG G
<i>act-syR</i>	21	CGG TGT TGG CAT ACA GAT CCT
<i>slbo-F1</i>	20	AGT CGT CAG GCC GTC TCG TA
<i>slbo-R1</i>	20	GTC CAG GTC CGT CTG AGT GG
<i>slbo-F2</i>	21	AGT TCA CCA ACC TGA CGA CGG
<i>slbo-R2</i>	21	TGT ACA AGG AAT GCC ACA GCG
<i>chico-F1</i>	21	CCT TAT GAC CAC GTT TGG CAA
<i>chico-R1</i>	21	CTA AAA CTG CCG TTG TCG TCG
<i>chico-F2</i>	20	TGA CTT TGC CAG TGC GGA AT
<i>chico-R2</i>	20	TCG AGG TAA CCA TCC TCG GA
<i>sug F1</i>	18	CTC TCG GCT ACT TTA CGC
<i>sug F2</i>	19	CTC GAA GCT GCA CTT GTA G
<i>sug-syF</i>	20	AAC AGG ATG CGG AAT TCT CG
<i>sug-syR</i>	20	CGG TGA CTC CAC GTC CAT CT

## **3 Methoden**

### **3.1 Fliegenhaltung**

Die Fliegen wurden bei 18 °C oder 25 °C in PS-Röhrchen auf Standardfliegenfutter gehalten. Dabei wurden sie alle drei bis vier Wochen auf frisches Fliegenfutter umgesetzt. Die Temperatur ist ein essentieller Faktor bei der Entwicklung der Fliegen. Bei optimalen 25 °C entwickeln sich die Eier innerhalb von 15 Tagen zur Imago. Bei niedrigeren Temperaturen ist die Entwicklung langsamer.

Zur Sammlung von Embryos oder Larven wurden adulte Fliegen in Populationskäfige umgesetzt und auf Apfelsaftagarplatten mit einem Tropfen Frischhefesuspension gezogen. Es ist dabei wichtig, eine große Anzahl an Fliegen zu verwenden, um innerhalb eines kurzen Zeitraums (meist 1 – 4 h) eine genügend große Anzahl an Eiern zu erhalten.

### **3.2 Fütterungsexperimente**

Für Experimente mit verschiedenen Nahrungsbedingungen wurden Eier in einem Lege-Zeitraum von ein bis maximal acht Stunden gesammelt. Die Eier einer Sammlung wurden auf mehrere Apfelagarplatten, die ausreichend mit Frischhefe versehen waren, verteilt. Bis zum Start des Experiments verblieben die Larven bei 25 °C auf diesem Futter. Vor dem Ansetzen des Experiments wurden die Larven in einem Zellkulturnetz ausgiebig mit dH<sub>2</sub>O von der Hefe freigewaschen und dann mit einem Pinsel auf die entsprechend behandelten Faltenfilter gesetzt.

Die Kontrollarven wurden auf einen mit 600 µl 1x PBS getränkten Filter mit einem Tropfen Frischhefesuspension gesetzt, während die Filter bei Zuckerexperimenten mit 600 µl einer Lösung von 20 % Saccharose in 1x PBS getränkt wurden. Nach Ende der Versuchszeit bei 25 °C wurden nur solche Larven für eine RNS-Isolierung bzw. Protein-Extraktion benutzt, die zu diesem Zeitpunkt auf dem Filter der entsprechenden Nahrungsbedingung ausgesetzt waren bzw. in der Kontrollsituation

sich in der Hefe befanden. Bei Versuchen, die mehrere Stunden dauerten, wurden die Larven regelmäßig belüftet. Bevor die Larven in den dem Protokoll entsprechenden Lysispuffer überführt wurden, erfolgte erneut eine ausgiebige Wäsche mit dH<sub>2</sub>O für alle Gruppen. Dies minimierte mögliche Fehler, die eventuell durch den beim Waschen entstehenden Stress auftreten könnten.

### 3.3 Erzeugung transgener Fliegen

Die in dieser Arbeit verwendete Sug-Gal4-Linie wurde in der Arbeitsgruppe von PD M.J. Pankratz hergestellt. Dazu wurden die entsprechenden Sequenzen von *sugarbabe* in den P-Element-Vektor pCaSpeR eingebracht. Dieser Vektor trägt neben einem Ampicillin-Resistenzgen auch eine Kopie des *mini-white*<sup>+</sup>-Gens. Die Injektion erfolgte unter Zuhilfenahme eines Helferplasmids ( $\Delta 2-3$ ), welches die für die Insertion des P-Elementes nötige Transposase kodiert. Eingesetzt wurden 6  $\mu$ g der Konstrukt-DNS und 2  $\mu$ g des Helferplasmids. Die DNS wurde vor der Injektion mit 1/10 Vol. 3M NaAc pH 6 und dem 1,5-fachem Volumen Ethanol 100 % gefällt, zentrifugiert und mit 70 %igem Ethanol gewaschen. Das Pellet wurde getrocknet und in 20  $\mu$ l Injektionspuffer gelöst. Injiziert wurde in das posteriore Ende der 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*<sup>1118</sup>-Fliegen verwendet, um die erfolgreiche Insertion des P-Elementes durch den *w*<sup>+</sup>-Phänotyp zu erkennen. Es wurden ca. 100 Eier bei Raumtemperatur über 30 min gesammelt. Danach wurden die weiteren Schritte bei 18 °C durchgeführt, um die Entwicklungsgeschwindigkeit der Embryonen zu verlangsamen. 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 Klebebandes 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. Dadurch wurde die Wahrscheinlichkeit, dass die Embryonen beim Einführen der Injektionsnadel platzen, herabgesetzt. Um ein weiteres Austrocknen zu vermeiden, wurde mit Halocarbonöl überschichtet, um den Gasaustausch auch weiterhin zu ermöglichen. 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 µl 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 Halokarbonöl 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 Generation dieser Kreuzungen wird 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 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<sup>-</sup>-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 Chromosomen 2, 3 und X untersucht.

### **3.5 Gel-Elektrophoresen**

Die Elektrophorese ist wohl die am meisten benutzte und auch wichtigste Technik im Umgang mit DNS-, RNS und Proteinen. Die Elektrophorese umfasst alle Methoden, bei denen geladene Moleküle durch ein elektrisches Feld aufgetrennt werden. Wichtige Faktoren für die unterschiedliche Laufstrecke im elektrischen Feld sind Ladung der Probe, Größe und Konformation.

#### **3.5.1 Gelelektrophorese von DNS und RNS**

In einem Agarosegel können Nukleinsäuren im elektrischen Feld entsprechend ihrer Größe aufgetrennt, identifiziert und isoliert werden (Sambrook *et al.*, 1989). Je nach Größe der aufzutrennenden DNS-Fragmente wurden 0,8 – 2 % Agarose in 0,5 x TBE durch Erhitzen im Mikrowellenherd gelöst. Nach Abkühlung auf ca. 60 °C wurde der Gellösung 0,4 µg/ml Ethidiumbromid zugesetzt und in einem Elektrophoreseschlitten gegossen. Nach Erhärten des Gels wurde die Gelkammer mit Laufpuffer (0,5 x TBE), aufgefüllt und das Gel beladen. Die Auftrennung erfolgte bei konstanter Spannung (5-10 V/cm). Kleine DNS-Fragmente von bis zu 100 bp wurden in höherprozentigen Gelen (1,2 % - 2 %) aufgetrennt, während große Vektoren bereits mit 0,8 % - 1 % Gelen eine gute Auftrennung zeigen. Die DNS-Fragmente wurden in einem Gel-Dokumentations-System (E.A.S.Y Win32) mittels UV-Fluoreszenz sichtbar gemacht

und dokumentiert. Im Fall von RNS-Proben wurde statt 0,5 x TBE 1 x MOPS-Puffer verwendet (MOPS-Gel).

### **3.5.2 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)**

Protein- oder Bakterienlysate wurden mit Hilfe der diskontinuierlichen SDS-Gelelektrophorese analysiert. Polyacrylamid-Gele sind quervernetzte Polymere aus Acrylamid, N,N'-Methylenbisacrylamid, Tetramethyldiamin (TEMED) und Ammoniumperoxodisulfat (APS). Die Viskosität des Gels wird durch die Menge an N,N'-Methylenbisacrylamid und Acrylamid eingestellt. Es wurden ausschließlich vertikale Gele eingesetzt. Nach dem Gießen des Sammelgels wurde mit Isopropanol überschichtet. Das Sammelgel wurde erst kurz vor Start des Gels gegossen, um einen scharfen pH und Leitensprung zwischen Sammel- und Trenngel zu gewährleisten. Die Proteinproben wurden vor Auftragen drei Minuten bei 95 °C in SDS-Ladepuffer inkubiert. Die Elektrophorese erfolgt bei einer konstanten Spannung von 20 - 150 V. Die Elektrophoresekammer wurde mittels Wasserkühlung auf 20 °C gekühlt. Als Laufpuffer diente 1 x Lämmli-Puffer.

#### **3.5.2.1 Coomassie-Färbung**

Der Nachweis von Proteinen in SDS-Pages erfolgte durch Coomassie-Färbung. Die Färbung erfolgte durch Inkubation des Gels in Coomassie-Färbelösung für 30 min und anschließender Inkubation in Coomassie-Entfärbelösung, bis die Proteinbanden gut sichtbar wurden. Die Färbung konnte durch Aufkochen der Lösungen beschleunigt werden und erzielte ähnlich gute Ergebnisse.

### 3.5.2.2 Silberfärbung

Eine sensitivere Methode zur Visualisierung von Proteinbanden in SDS-PAGE-Gelen ist die Silberfärbung. Sie ist etwa um den Faktor 10 bis 100 sensitiver als die Coomassie-Färbung. Zunächst wurde das Proteingel eine Stunde schüttelnd in 100 ml Silber-Fixlösung fixiert, eine Stunde in dH<sub>2</sub>O gewässert und 30 min in 30 % Ethanol gewaschen. Dann wurde das Gel 1 min in frisch angesetztem 0,02 % Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub> inkubiert und dreimal 30 sek mit dH<sub>2</sub>O gewaschen, bevor es 20 min in 50 ml 0,2 % AgNO<sub>3</sub> gefärbt wurde (im Dunkeln). Nach zweimal 1 min Waschen in dH<sub>2</sub>O, erfolgte die Entwicklung in 50 ml Silberentwicklungslösung, solange bis die Proteinbanden sichtbar wurden. Die Entwicklung wurde durch zweimaliges Waschen mit dH<sub>2</sub>O gestoppt. Alternativ wurde die Färbung auch mit dem *PlusOne™ Silver staining Kit* der Firma Amersham Biosciences durchgeführt.

## 3.6 Isolierung von Nukleinsäuren

### 3.6.1 Isolierung von genomischer DNS

Für die Untersuchung von genomischen Bereichen, die außerhalb der Exons liegen, wurde eine PCR mit genomischer DNS durchgeführt. Diese kann direkt aus Gewebe isoliert werden. Zunächst wurden Larven, Puppen und Embryonen gesammelt, mit dH<sub>2</sub>O gewaschen, in 200 µl Lösung A überführt und homogenisiert. 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 Gewebereste für 15 min bei RT abzentrifugiert. Aus dem Überstand wurde die DNS mit dem 1,5-fachen an Isopropanol ausgefällt und 5 min bei 13 000 rpm pelletiert. Nach zweimaligem Waschen mit 70 % Ethanol wurde das Pellet getrocknet und in 50 µl ddH<sub>2</sub>O gelöst. Die resuspendierte DNS wurde spektralphotometrisch auf Reinheit und Konzentration überprüft.

### 3.6.2 Isolierung von RNS aus *Drosophila*-Larven

Je nach vorhandenem RNS-Gehalt der Proben wurde die RNS mit dem *NucleoSpin*<sup>®</sup> *RNA II Kit* (bis zu 70 mg Gewebe) oder dem *NucleoSpin*<sup>®</sup> *RNA L Kit* (bis zu 200 mg Gewebe) von Macherey-Nagel nach Herstellerangaben (*Standard protocol for isolation of total RNA*) isoliert. Die in Lysispuffer überführten Larven wurden elektro-mechanisch homogenisiert. Eine im Puffer enthaltene Dnase I verdaute noch vorhandene genomische DNS. Zur Verbesserung der Lyse wurden die homogenisierten Proben vor der eigentlichen RNS-Isolierung 30 bis 60 min bei Raumtemperatur (RT) auf einem Vortexer geschüttelt. Die Menge an isolierter Gesamt-RNS (in DEPC-Wasser eluiert) wurde spektralphotometrisch (s. Kap. 3.10) ermittelt (BioPhotometer) und die Qualität mittels eines Mops-Gels (s. Kap. 3.5.1) überprüft. Die so gewonnene Gesamt-RNS wurde in Reverse-Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktionen (RT-PCR) verwendet. Der Einsatz in RT-PCR war durch eine im *NucleoSpin*<sup>®</sup>-Isolierungs-Protokoll enthaltene DNase-Behandlung möglich.

### 3.6.3 Isolierung von DNS-Fragmenten aus Agarosegelen

Nach Identifizierung der interessierenden DNS-Bande unter UV-Licht, wurde diese mit einem sauberen Skalpell ausgeschnitten. Die Extraktion der DNS aus dem Gel erfolgte mit dem *NucleoSpin*<sup>®</sup> *Extract 2 in 1 Kit* nach Herstellerangaben (*Protocol for DNA extraction from agarose gels*). Die Extraktions-Effizienz und -Konzentration der Eluate wurden danach auf einem weiteren DNS-Agarosegel überprüft.

### **3.6.4 Isolierung von Plasmid-DNS aus Bakterien**

#### **3.6.4.1 Plasmidisolierung mittels Mini-Präparation**

Die Mini-Präp ist eine schnelle Methode, Plasmide zu isolieren, liefert aber im Vergleich zur unter Kap. 3.6.4.2 beschriebenen Maxi-Präp nur sehr geringe und meist auch weniger saubere Mengen des Plasmids. Sie wird daher meist für Restriktionsverdau, Ligations- und Klonierungstests eingesetzt. Die Methode basiert auf dem Protokoll von Birnboim und Doly (Birnboim, 1979). Die gewünschten Bakterienkolonien wurden in 3 ml LB-Medium mit dem entsprechenden Selektions-Antibiotikum (Kanamycin 10 µg/ml und/oder Ampicillin 100 µg/ml) über Nacht bei 37 °C geschüttelt. 1,6 ml dieser Über-Nacht-Kultur wurden in ein Mikro-zentrifugenröhrchen überführt und 30 sek bei 10 000 x g pelletiert. Das Bakterien-Pellet wurde mit 200 µl TELT-Puffer und 20 µl Lysozymlösung (10 mg/ml in TE) versetzt und durch vortexen resuspendiert. Dann wurde die Lösung 3 min bei 96 °C und 5 min auf Eis inkubiert. Die Reste aus Proteinen, Zellwand und genomischer DNS wurden 8 min bei 10 000 x g pelletiert. Das Pellet wurde mit einem sterilen Zahnstocher oder einer Pipettenspitze entfernt. Der Überstand wurde anschließend mit 100 µl Isopropanol versetzt, gevortext und dadurch die Plasmid-DNS ausgefällt. Nach 5 min Zentrifugation bei 10 000 x g konnte das DNS-Pellet mit 70 % Ethanol gewaschen, erneut abzentrifugiert und getrocknet werden. Die Plasmid-DNS wurde dann in 25 - 50 µl 10 mM Tris-HCl pH 8,0 gelöst. 5 bis 10 µl dieser Minipräp-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.

### 3.6.4.2 Plasmidisolierung mittels Maxi-Präparation

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

## 3.7 DNS-Klonierungstechniken

Ziel der Klonierung ist das Einbringen und Vermehren eines Stücks DNS in einem meist bakteriellen System. Die DNS kann dabei von den unterschiedlichsten Organismen kommen. Bakterien eignen sich besonders gut, da diese häufig über sogenannte Plasmide verfügen. Dies sind doppelsträngige, ringförmige DNS-Moleküle, die zusätzliche Erbinformationen wie Resistenzen und laut Schlegel (Schlegel, 1992) eine Größe von 1 – 1200 Kb besitzen. Plasmide werden sehr leicht von Bakterien aufgenommen und vermehren sich unabhängig von den Chromosomen der Wirtszelle. Durch ihre Resistenzgene ist eine einfache Selektion der gewünschten Klone möglich.

### 3.7.1 Restriktionsverdau von DNS

Die Restriktionsenzyme wurden entdeckt, als man untersuchte, wie sich Bakterien gegen Viren schützen. Sie zerschneiden die eindringende DNS der Viren und schützen ihre eigene DNS durch Methylierung an entsprechenden Sequenzen. Die Bakterien besitzen dafür ein entsprechendes Modifikationsenzym, das die eigene DNS an Stellen methyliert, an denen das eigene Restriktionsenzym die DNS angreifen würde. Restriktionsenzyme spalten sequenzspezifisch an typischen Stellen der DNS. Diese Stellen sind in der Regel palindrome Sequenzen von vier bis acht

Basenpaaren. Man unterscheidet dabei 2 verschiedene „Schnittmuster“. Sehr viele Restriktionsenzyme schneiden die palindrome Sequenz ungleich. Dadurch entstehen Überhänge an den jeweiligen Strängen, sog. „*Sticky ends*“ oder klebrige Enden. Wird die Sequenz dagegen genau in der Mitte geschnitten, entstehen keine Überhänge. Solche Enden werden „*blunt ends*“ genannt. Während „*blunt end*“ Fragmente mit jedem anderen „*blunt end*“ Fragment ligiert werden können, müssen bei „*sticky ends*“ die Überhänge zueinander kompatibel sein.

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 (i.d.R. 30 µl bei 1 µl Enzym/Glycerin-Lösung) und die Inkubationszeit ein bis zwei Stunden bei optimaler Reaktionstemperatur (37 °C für die meisten Enzyme) und idealen Pufferbedingungen (eingestellt mit dem Puffersystem des jeweiligen Anbieters). Bei Plasmid-DNS aus Minipräps wurde nach der Fraktionierung der Verdaureaktion 1 µg/µl RNaseA zugesetzt, wenn das Insert kleiner als 700 bp war. Dadurch wurden störende RNS-Banden, die bis etwa 1 kB reichten, eliminiert. Nach Zugabe von DNS-Ladepuffer (1 x) wurde die Verdaulösung zur Größenbestimmung und Reinigung der Fragmente in einem DNS-Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt. Dem Verdau eines Vektors folgte immer eine 5'-Dephosphorylierung mit *Calf intestinal Alkaline Phosphatase* (CIP), um eine 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 (20 min) inaktiviert.



### **3.7.2 DNS-Präzipitation**

Zur Konzentrierung, Reinigung und Umpufferung von DNS aus wässrigen Lösungen wurden Präzipitationen mit Hilfe von absolutem Ethanol durchgeführt. Dafür wurde die Lösung mit NaAc (300 mM NaAc, pH 6,0) und dem 2,5-fachen Volumen an 100 %-igem Ethanol versetzt, gemischt und 10 Minuten zentrifugiert (10 000 x g). Das DNS-Pellet wurde getrocknet und in ddH<sub>2</sub>O gelöst. Insertfragmente wurden nach dem Verdau in einem Agarosegel aufgetrennt, ausgeschnitten und aufgereinigt (s. Kap. 3.6.3). Diese Methode ist auch bei Vektor-DNS möglich, bringt aber meist eine geringere Ausbeute als die Fällung.

### **3.7.3 DNS-Ligation**

Bei der Ligation werden zwei DNS-Fragmente zu einem DNS-Strang unter Bildung von Phosphodiesterbindungen kovalent verknüpft. Voraussetzung für eine erfolgreiche Ligation ist das Vorhandensein eines Phosphatrestes am 5'-Ende des DNS-Strangs, der mit dem 3'-Ende des anderen DNS-Fragmentes verbunden wird (Smith et al., 1970). Die Reaktion wird u.a. von der DNS-Ligase des Bakteriophagen T4 unter ATP-Hydrolyse katalysiert. Vor der Ligation wurde die Konzentration der aufgereinigten Vektor- und Insert-DNS auf einem Agarosegel verglichen. Das Insert musste bei einer Ligation in einem drei- bis fünffachen molaren Überschuss im Verhältnis zum Vektor eingesetzt werden. Die Ligation erfolgte mit Hilfe von 400 units T4 DNS-Ligase in einem Gesamtvolumen von 20 µl. Als Puffer diente 1 x T4 DNS-Ligase Puffer. Reaktionsdauer und Temperatur variierten zwischen 10h (über Nacht) bei 18 °C und 2 - 4 h bei Raumtemperatur (RT).

### 3.7.4 Herstellung Hitzeschock-kompetenter Zellen

Zellen, die in der Lage sind, Fremd-DNS aufzunehmen, bezeichnet man als kompetente Zellen. Bei *E.coli*-Zellen kann dieser zeitlich begrenzte Zustand durch die Behandlung mit  $\text{CaCl}_2$  oder  $\text{RbCl}_2$  induziert werden (Mandel et al., 1970) (Dagert et al., 1979). Um kompetente Bakterien herzustellen, wurden 2 ml einer Über-Nacht-Kultur des gewünschten *E.coli*-Stammes zu 200 ml LB-Medium gegeben und bis  $\text{OD}_{600} = 0,5$  wachsen gelassen (Schüttler, 37 °C). Dann wurden je 100 ml Bakterien 10 min bei 800 x g und 4 °C zentrifugiert und das Bakterienpellet auf Eis vorsichtig in je 25 ml steril filtrierter und auf 4 °C vorgekühlter 0,1 M  $\text{CaCl}_2$ -Lösung (frisch angesetzt) resuspendiert und eine Stunde auf Eis gestellt. Anschließend wurde erneut zentrifugiert (10 min, 4 °C, 800 x g), das Bakteriensediment auf Eis mit je 6 ml 0,1 M  $\text{CaCl}_2$ -Lösung (vorbehandelt wie oben) resuspendiert, je 1,5 ml Glycerin hinzugefügt 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.

### 3.7.5 Transformation und Selektion

Die Transformation ist der eigentliche Vorgang, bei dem das Plasmid in die kompetente Bakterienzelle eingebracht wird (Hanahan, 1983). Für eine Transformation wurde das 20- bis 40-fache Volumen kompetenter Bakterien im Verhältnis zur eingesetzten Plasmid-DNS (5 - 10 ng/ $\mu\text{l}$ ) verwendet. Das Gemisch wurde 20 min auf Eis inkubiert, 2 min einem 42 °C Hitzeschock unterzogen und erneut für circa 5 min 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 (ohne Selektions-Antibiotikum) 30 bis 60 min bei 37 °C leicht schüttelnd inkubiert, bevor sie auf LB-Agar ausgestrichen wurden. Je nach Plasmid wurden die LB-Agar-Platten mit Kanamycin (25  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) und/oder Ampicillin (100  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) versetzt. Für Blau-Weiß-Selektion wurden die Platten zusätzlich mit 4 % X-Gal-DMSO-Lösung

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*).

### **3.8 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)**

Die PCR ist eine schnelle Methode zur Vermehrung (Amplifikation) von DNS-Abschnitten (Templates). Erst 1985 entwickelte Kary Mullis (Mullis et al., 1986) eine wirtschaftliche Methode, für die er 1993 den Nobelpreis für Chemie erhielt. Die PCR ist mittlerweile zu einer der wichtigsten Methoden im Umgang mit Nukleinsäuren geworden, da selbst geringste Mengen so stark vermehrt werden, dass weitere Untersuchungen möglich sind.

Die hier verwendete Methode ist modifiziert nach Innis (Innis, 1990). Ein typischer PCR-Ansatz enthielt etwa 10 ng Template-DNS, die beiden Oligonukleotide in einer Endkonzentration von 1 µM, dNTPs in einer Endkonzentration von 200 µM (d.h. je 200 µM dATP, dCTP, dGTP, dTTP) in PCR-Puffer. Standardmäßig wurden die Reaktionen in einem Volumen von 25 bzw. 50 µl mit Hotstart durchgeführt. Zur Vermeidung von Kontaminationen wurden Pipettenspitzen mit Filtereinsatz benutzt. Als Kontrolle auf Fremd-DNS innerhalb einer der verwendeten Reagenzien wurde zusätzlich für jedes Primerpaar ein Ansatz (H<sub>2</sub>O-Kontrolle) ohne Template angesetzt. Die PCR-Reaktionen wurden in einem PTC-200 Peltier Thermal Cycler der Firma MJ Research durchgeführt.

#### **3.8.1 Reverse Transkriptase-PCR (RT-PCR)**

Die RT-PCR ist ein halbquantitatives Verfahren, um die Transkriptionsstärke verschiedener Gene zu bestimmen. Aus einer einzelsträngigen mRNA als Matrize synthetisiert die in *SuperScript™II RNase H Reverse Transcriptase* (RT) enthaltene

*Moloney murine leukemia Virus-Reverse Transcriptase* (MoMuLV-RT) in 5'→ 3'-Richtung einen komplementären DNS-Strang, der anschließend in einer regulären PCR vermehrt wird. Pro Reaktion wurde 1 µg Gesamt-RNS eingesetzt. Für jede neu isolierte RNS wurde außerdem eine Reaktion ohne RT (-RT-Kontrolle) angesetzt. Dies sollte zeigen, ob eine Verunreinigung mit genomischer DNS trotz Dnase I-Behandlung vorliegt. Zur Gesamt-RNS wurde pro Ansatz 1 µl 500 ng/µl Oligo(dT)<sub>12-18</sub> in 11,5 µl Volumen nukleasefreiem H<sub>2</sub>O (12,5 µl Volumen in -RT-Kontrolle) 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* (im Lieferumfang enthalten), 2 µl 0,1 M DTT (ebenfalls enthalten), 1 µl 10 mM dNTP-Mix, 0,25 µl RNasin (40 U/µl) und 1 µl RT (200 U/µl) zugegeben (vgl. Tabelle 3.8-1). Die Reaktion erfolgte 50 min bei 42 °C mit anschließender RT-Inaktivierung (15 min, 75 °C). Die gewonnene cDNS wurde in einem Endvolumen von 100 µl ddH<sub>2</sub>O aufgenommen.

	+RT	-RT
<b>Hybridisierungsansatz</b>	11,75 µl	12,75 µl
<b>5 x 1<sup>st</sup> strand Puffer</b>	4 µl	4 µl
<b>DTT (10 mM)</b>	2 µl	2 µl
<b>dNTP's (10 mM)</b>	1 µl	1 µl
<b>RNasin</b>	0,25 µl	0,25 µl
<b>Rev. Transkriptase</b>	1 µl	-
<b>Gesamtvolumen</b>	20 µl	20 µl

Tabelle 3.8-1: Erststrang-Reaktion

Von dieser cDNS-Lösung konnten jeweils 5 µl als Template-DNS 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 DNS in einer Gelelektrophorese semiquantitativ analysiert werden.

### 3.8.2 Real Time PCR

Ausgehend von cDNS als Template ermöglicht die Real Time PCR eine Analyse der Expressionstärke der untersuchten Gene. Es wurden Primer benötigt, die ein 100 - 200 bp großes Stück innerhalb der cDNS Sequenz des Gens amplifizieren und eine Schmelztemperatur von 60 °C besitzen. Die Erstellung der Primer wurde durch das Programm *ABI-Prism Primer Express™ 1.5a* unterstützt. Als interne Kontrolle wurden *actin* Primer verwendet. Der verwendete Real Time Puffer (*SYBR Green PCR Master Mix, Applied Biosystems*) enthielt den Fluoreszenzfarbstoff *SYBR Green*, der in die DNS interkaliert. Die Fluoreszenz dieses Farbstoffes wird von der RT-PCR Maschine (*ABI Prism 7000 Sequence Detection System, Applied Biosystems*) nach jedem Zyklus gemessen und gibt so Aufschluss über die vorhandene Menge an DNS. Pro Ansatz wurden 2 µl Oligonukleotide (10 µM), 12,5 µl *SYBR Green Master Mix* und 5,5 µl nukleasefreies H<sub>2</sub>O verwendet. Es wurden 40 Zyklen gefahren. Die Auswertung erfolgte mit der *ABI Prism 7000* Software und *Microsoft Excel*.

Für jedes Experiment wurden Mehrfachbestimmungen durchgeführt, d.h. jeder Ansatz wurde innerhalb eines Laufs dreimal parallel für die Reaktion eingesetzt. Die Rohdaten (CT, Counts) repräsentieren die Anzahl der Zyklen, die bis zum Erreichen eines Schwellenwertes benötigt wurden. Danach wurden alle Werte gemittelt und wie im Handbuch des *ABI Prism 7000 Sequence Detection Systems* beschrieben mit der Actin-Kontrolle normalisiert (dCT). Die erhaltenen Werte wurden weiter mit der Normalkontrolle normalisiert (ddCT). Um die x-fache Änderung der Expression im Verhältnis zur gleich eins gesetzten Kontrolle zu erhalten, wurde dieser Wert (ddCT) in die Funktion  $2^{-x}$  eingesetzt ( $2^{-ddCT}$ ). Die Experimente wurden abhängig von der resultierenden Standardabweichung mehrfach wiederholt, um eine statistische Aussage treffen zu können.

### **3.9 Western-Transfer**

Proteine in SDS-Polyacrylamidgelen wurden durch Elektrotransfer auf eine PVDF- bzw. Nitrozellulose-Membran (*Immobilon-P*) übertragen und immobilisiert (Towbin, 1979). Der Nachweis erfolgt immunochemisch über Farb- oder Chemilumineszenz-Visualisierung (Egger, 1994).

#### **3.9.1 Nass-Transfer (Wet-Blot)**

Die Membran wurde 1 min in Methanol aktiviert, 5 min in ddH<sub>2</sub>O gewässert und für mindestens 5 min in Western-Transferpuffer äquilibriert. Mit Hilfe eines Trägers wurde die Membran zusammen mit dem Gel luftblasenfrei zwischen je drei Lagen Whatman 3MM-Papier feucht in Transferpuffer zusammengebaut. Der Träger wurde dann senkrecht in die mit Transferpuffer gefüllte Kammer so eingesetzt, dass die Membran zur Anode (+) hin orientiert war. Der Transfer der Proteine aus dem Gel auf die Membran erfolgte bei 4 °C für mindestens 4 h mit 300 mA oder bei RT für 7 h bei 20 V. Die angegebenen Werte waren jeweils fest am Netzgerät eingestellt.

#### **3.9.2 Halbtrocken-Transfer (Semidry-Blot)**

Der Semidry-Blot unterscheidet sich hauptsächlich in der eingesetzten Puffermenge vom Wet-Blot. Während beim Wet-Blot etwa 3 l Transferpuffer verwendet wurden, handelte es sich beim Semidry-Blot nur um den in den Filtern aufgesaugten Puffer. Der Aufbau des Blots entsprach dabei dem des Wet-Blots, jedoch in einer trockenen Apparatur. Der Transfer erfolgte bei RT mit 1 mA/cm<sup>2</sup> der Membran für 2 h.

### **3.10 Konzentrationenbestimmung von DNS- und RNS-Lösungen**

Die Konzentration von Nucleinsäuren kann durch photometrische oder elektrophoretische Methoden festgestellt werden. Der photometrische Nachweis ist meist weniger sensitiv, jedoch sehr viel einfacher und schneller. Durch Messung der Absorption einer DNS-Lösung bei 260 nm und 280 nm in einem Spektralphotometer ist Reinheit und Menge zu bestimmen. Die Absorption bei 260 nm ist dabei fast ausschließlich auf die Eigenschaften der aromatischen Basen der Nucleinsäuren zurückzuführen. Dabei entspricht eine Absorption von 1 einer Lösung etwa einer Konzentration von 33 µg/ml einzelsträngiger (ss) DNS, 50 µg/ml doppelsträngiger (ds) DNS bzw. 32 µg/ml RNS (Sambrook et al., 1989). Proteine adsorbieren bei 280 nm, wodurch der Quotient aus 260 nm zu 280 nm ein Maß für die Reinheit der Probe ist. Für DNS und RNS sollte dieser Wert zwischen 1,8 und 2,0 liegen.

### **3.11 Konzentrationsbestimmung von Proteinen**

Für die Konzentrationsbestimmung von Proteinen gibt es eine Vielzahl von Methoden. Die Bestimmung im Rahmen dieser Arbeit erfolgte ausschließlich photometrisch. Eine schnelle aber auch anfällige Methode ist der Bradford-Test von BioRad. Die Bindung von Coomassie Brilliant Blau an Proteine im sauren Milieu verschiebt das Absorptionsmaximum des Farbstoffs (465 nm ohne Protein, 595 nm mit Protein). Die Zunahme der Absorption bei 595 nm ist ein Maß für die Proteinkonzentration der Lösung. Der Bradford-Test ist einer der einfachsten Proteinbestimmungstests. Die käufliche, fertige Stammlösung, bestehend aus Farbstoff, Ethanol und Phosphorsäure wurde zur Probenlösung hinzugegeben und nach 10 min bei Raumtemperatur die Absorption bei 595 nm im Spektralphotometer gemessen. 800 µl ddH<sub>2</sub>O wurden mit 200 µl Bradford-Lösung vermischt und 980 µl davon zu 20 µl der Proteinprobe gegeben. Lediglich eine Eichgerade war für eine genaue Konzentrationsbestimmung nötig. Die Eichgerade wurde mit einem bekannten Proteinstandard (BSA) in unterschiedlichen Konzentrationen erstellt. Die Auswertung erfolgte mit Microsoft Excel.

Eine weitere Methode (2-D Quant Kit, Amersham Biosciences) wurde für Proben verwendet, die in der 2D-Gelelektrophorese eingesetzt wurden. Der Puffer für die isoelektrische Fokussierung enthält große Mengen an Harnstoff und Thioharnstoff, die nicht mit der BCA-Reaktion bzw. dem Bradford-Test kompatibel sind. Das Prinzip des 2-D Quant-Kits von Amersham beruht auf der quantitativen Präzipitation der Proteine. Das Präzipitat wird in einer Lösung resuspendiert, die Kupferionen enthält, welche an die Proteine binden. Gemessen wird die Menge an gebundenen Kupferionen durch Zugabe eines colorimetrischen Reagenz, dessen Absorption umgekehrt proportional zur Proteinkonzentration ist. Das genaue Vorgehen ist dem Handbuch des Herstellers zu entnehmen. Für die Bestimmung der Proteinkonzentration wurden jeweils 5 und 10 µl der Proben verwendet.

### **3.12 Zweidimensionale Gelelektrophorese**

Die 2-D Gelelektrophorese ist eine effektive Methode zur Analyse von komplexen Proteingemischen. Das Proteingemisch wird nach zwei vollkommen unterschiedlichen und voneinander unabhängigen Parametern aufgetrennt. In der ersten Dimension werden die Proteine aufgrund ihrer unterschiedlichen Nettoladungen bzw. der unterschiedlichen isoelektrischen Punkte durch isoelektrische Fokussierung (IEF), in der zweiten Dimension durch SDS-PAGE in vertikalen Gelen entsprechend ihrer molekularen Massen aufgetrennt. Um die 2-D Muster so weit wie möglich zu standardisieren und Einflüsse von dritter Seite so gering wie möglich zu halten, führt man die Trennungen in beiden Dimensionen unter denaturierenden Bedingungen durch.

#### **3.12.1 Isoelektrische Fokussierung der IPG-Streifen**

Der Probenauftrag erfolgte während der Rehydratation der IPG-Streifen (Amersham Biosciences) durch Mischen mit dem Rehydratationspuffer. Im Gegensatz zum direkten Probenauftrag können so größere Mengen an Protein geladen und Präzipitationen am Applikationsort vermieden werden. Die Rehydrierung erfolgte in



Keramik-Streifen-Haltern entsprechend den Angaben des Herstellers. Die Streifen wurden mit der Gelseite auf die Probe gelegt und mit je 700 µl Silikonöl überschichtet. Die Fokussierung erfolgte zeitlich in Abhängigkeit von der Länge der Streifen und dem gewählten pH-Bereich bei 20 °C. Bei Verwendung von 24 cm Streifen wurde eine getrennte Rehydrierung und Fokussierung gewählt. Hierbei werden die Streifen zuerst in einer Immobiline-DryStrip-Reswelling-Kammer (Amersham Biosciences) rehydriert und anschließend in die Keramik-Streifen-Halter überführt, in denen die IEF durchgeführt wird.

### **3.12.2 Equilibrierung der IPG-Streifen**

Die Elektrodenstreifen wurden in Kunststoffröhren mit Equilibrierungspuffer (6M Harnstoff, 30 % Glycerin, 4 % SDS, 75 mM Tris-HCl 8,8, Aqua bidest. ad 200 ml) gelegt. Die Equilibrierung erfolgt in zwei Schritten:

1. Equilibrierungspuffer + 100 mg DTT/10 ml, 15 min
2. Equilibrierungspuffer + 250 mg Iodacetamid/10 ml, 15 min + 3 ng Coomassie Brillant Blau R250

### **3.12.3 Auftrag der IPG-Streifen**

Nach der Polymerisation der Gele und der Equilibrierung der IPG-Streifen wurden diese unter Vermeidung von Luftblasen vorsichtig auf die Gele gelegt. Die Agaroselösung (100 ml SDS Elektrophorese-Puffer, 0,5 g Agarose, einige Körner Bromphenolblau) wurde erhitzt, bis sie vollständig gelöst war. Nach Abkühlung auf etwa 75 °C wurde diese über Streifen und Marker mittels Pipette blasenfrei aufgetragen, um ein Verschieben der IPG Streifen während der Elektrophorese zu verhindern.

### 3.12.4 Analyse der Gele

Im Anschluss an die Elektrophorese und die Silberfärbung wurden die zweidimensionalen Gele der rechnergestützten Auswertung zugeführt. Dazu werden die Gele mit einem handelsüblichen Computer-Scanner eingelesen und mit Hilfe der PDQuest-Software von Bio-Rad analysiert. Heutige Computer sind ausreichend schnell, jedoch sollte man auf einen genügend großen Arbeitsspeicher (1024 MB) achten, um die anfallende Datenmenge während einer Analyse zu bewältigen. Die einzelnen Arbeitsschritte werden mit der PDQuest Version 6.1 ausgeführt.

Die Analyse erfolgt in vier Schritten:

Scan-Prozess → Spot Detektion → Matching & Editing → Datenanalyse

Für den Scan-Prozess wird je nach Größe des Gels ein genau definierter Ausschnitt (12x16 cm bei 11 cm für 1. Dimension) ausgewählt und mit 600 dpi gescannt. Um ein verlustfreies Bild für die spätere Analyse zu erhalten, wird das Gel im *Tiff* Format gespeichert. Die so gespeicherten Bilder werden in PDQuest eingelesen. Das Programm bietet ein Verfahren zur automatischen Erkennung der Proteinspots an; mit Hilfe der Funktion „Spot Detection Wizard“ lassen sich unter Verwendung eines Korrespondenz-Gels benutzerdefinierte Parameter-Sets erstellen, mit denen alle unter gleichen Versuchsbedingungen hergestellte Gele auf einem einheitlichen Level bezüglich des Pre-Processings und der Sensitivität der Spoterkennung bearbeitet werden. Dieser Vorgang erkennt automatisch einen Großteil der Proteinspots. Trotzdem ist eine manuelle Nacharbeitung obligat. Artefakte auf dem Gel, nicht vollständig entfernte horizontale und vertikale Streifen, sehr dicht beieinander liegende oder sehr große Spots werden häufig nicht richtig eingeordnet bzw. nicht erkannt. Während des Matching- & Editing-Vorgangs werden die 2D Gele miteinander verglichen und versucht Proteinmuster auf den jeweiligen Gelen in Einklang zu bringen. Hierzu wird zuerst ein Standardgel erstellt, das als Referenz für die restlichen Gele dient. Ein Matchset in seiner unmodifizierten Form besteht jetzt aus vier Bildern: einem Standard in Gel-Spot-Format, der noch identisch mit einem der Mitglieder des Matchsets ist und den drei Mitgliedern. Jetzt schließt sich der Überarbeitungsschritt an, in dem die bei der automatischen Spot-Detektion

entstandenen Fehler manuell korrigiert werden. Es empfiehlt sich, besonders beim Mitglied, das als Standard fungierte, Sorgfalt walten zu lassen, da der Standard als Referenz dient und später nicht mehr modifizierbar ist. Als nächster Schritt folgt nun das eigentliche Abstimmen (Matchen) der Gele. Dazu wählt man besonders charakteristische Spots aus, die man sowohl auf dem Standard als auch den anderen Mitgliedern mit Hilfe eines Symbols markiert. Diese Orientierungspunkte oder auch Landmarks genannt, dienen dazu, weitere unmarkierte Spots in der Nähe automatisch zur Deckung zu bringen. Die Landmarks sollten möglichst über das ganze Gel verteilt erstellt werden. Falls man auf einem Gel noch auffällige Spots entdeckt (erkennbar an einer Farbkodierung: grün = automatisch erkannt, rot = nicht erkannt), die trotz Vorhandensein in allen Mitgliedern auf diesem nicht erkannt worden sind, kann man sie manuell anpassen. Die Normalisierung der Gele und der jeweiligen Spots erfolgt durch Relativierung der Gesamtintensität aller als gültig definierter Spots beider Gele zueinander.

### **3.12.5 Ausschneiden der Proben**

Ein entscheidender Faktor für die spätere Identifizierung von Proteinspots ist die Reinheit und Menge des ausgeschnittenen Spots. Die gefärbten Spots wurden daher mit ausgezogenen Pasteurpipetten unterschiedlichen Durchmessers ausgestanzt. Je nach Durchmesser des Spots konnte so ein optimaler Bereich zur weiteren Analyse gewonnen werden. Nach jedem Spot wurde die Pipette mit Methanol und dH<sub>2</sub>O gewaschen, um Proteinüberträge zu verhindern.

### **3.12.6 Trypsinverdau**

Im 1D- oder 2D-Gel aufgetrennte Proteine können für die massenspektrometrische Analyse im Gel mit Trypsin verdaut und aus dem Gel eluiert werden. Die ausgestanzten Proben wurden dafür in 0,2 ml PCR-Reaktionsgefäße überführt, die vorher mit einer 24Gx1'' Kanüle im unteren Bereich punktiert wurden. Die PCR-

Reaktionsgefäße wurden dann in 1,5 ml Eppendorf Reaktionsgefäße überführt. Je nach verwendeter Gelfärbung (Silber- oder Coomassie-Färbung) wurde ein adaptiertes Protokoll zur Entfärbung verwendet. Die verwendeten Lösungen werden nach jedem Schritt durch Zentrifugation (350 x g) entfernt.

Silber gefärbte Gelstücke werden 10 min mit 15 µl dH<sub>2</sub>O gewaschen, zweimal je 10 min in 100 µl Lösung C im Dunkeln inkubiert und erneut dreimal 15 min mit 20 µl dH<sub>2</sub>O gewaschen. Lösung C besteht aus einer 1:1 Mischung aus 15 mM K<sub>3</sub>Fe(CN)<sub>6</sub> und 50 mM Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub>. Lösung C bewirkt, dass kolloidales Silber oxidiert und mit Kaliumhexacyanoferrat komplexiert wird. Das Löslichkeitsprodukt der im Allgemeinen schwer löslichen Silbersalze wird im Zuge der Komplexbildung unterschritten.

Coomassie gefärbte Gelstücke werden jeweils dreimal im Wechsel 10 min mit 15 µl einer 1:1 Mischung aus 10 mM NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> : Acetonitril (ACN) und 15 µl dH<sub>2</sub>O gewaschen. Danach werden die Proben in einem gemeinsamen Protokoll prozessiert. 10 min 15 µl NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> gefolgt von 10 min 15 µl 50 % ACN in 5 mM NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>. Anschließend werden die Proben bei 60 °C mit 10 mM DTT in 5 mM NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> für 15 min reduziert. Die nachfolgende Behandlung mit Jodacetamid führt zur Alkylierung von Thiolgruppen, um die erneute Ausbildung von Disulfidbrücken dauerhaft zu verhindern. Die Alkylierung findet in einer 55 mM Jodacetamidlösung 15 min bei RT statt. Da Jodacetamid lichtempfindlich ist, erfolgt die Reaktion im Dunkeln. Danach wird erneut gewaschen und entfärbt. Die Gelstücke werden jeweils dreimal im Wechsel 10 min mit 15 µl NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> und 10 min mit 15 µl einer 1:1 Mischung aus 10 mM NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> : Acetonitril (ACN) gewaschen. Die Proben werden nun in LoBind Reaktionsgefäße (Eppendorf, Hamburg) überführt. Durch die Verwendung eines speziellen Polypropylen-Kunststoffs wird eine erhöhte Proteinrückgewinnung gegenüber normalen Reaktionsgefäßen erreicht und gleichzeitig eine Verunreinigung der Probe durch sonst übliche Silikonbeschichtungen verhindert. Die entfärbten Gelstücke werden nun für 5 min in der „Speed Vac“ getrocknet. Das Volumen schrumpft dabei stark und ermöglicht eine bessere Aufnahme der Trypsinlösung. Es folgt eine Inkubation bei RT über Nacht in 20 µl einer 20 µg/ml Trypsinlösung (Vorgehen gemäß den Herstellerangaben). Die Trypsinspaltung erfolgt C-terminal von Lysin und Arginin und spaltet das Protein in kleinere Peptide nach einem

festgelegten Muster. Am nächsten Morgen wird die Reaktion mit 5 µl 0,1% Trifluoressigsäure (TFA) abgestoppt, die Proben für 10 min in ein Ultraschallbad gestellt und der Überstand abgenommen. Die Gelstücke werden erneut mit 20 µl 2/3 ACN/H<sub>2</sub>O überschichtet und 2 - 3 h unter schütteln inkubiert. Danach werden die Proben nochmals für 10 min in einem Ultraschallbad behandelt. Die Überstände aus beiden Elutionsschritten werden vereinigt und in der „Speed Vac“ auf 10 - 20 µl eingedampft.

### 3.12.7 Mikro-Entsalzung des tryptisch gespaltenen Peptidgemisches

Geringe Flüssigkeitsmengen können mit Zip-Tips entsalzt werden. Dies sind Pipettenspitzen, die eine C<sub>18</sub>-Matrix enthalten, die hydrophobe Bestandteile einer Lösung bindet, während hydrophile Bestandteile in der Flüssigkeit verbleiben. Gebundene Moleküle können anschließend mit einem stark hydrophoben Lösungsmittel wie z.B. Acetonitril eluiert werden. Die Zip-Tips werden vor Verwendung mit 10 µl ACN und 10 µl 50 % Acetonitril/H<sub>2</sub>O äquilibriert und anschließend 2 x mit 10 µl 0,1 % TFA gespült. Die Probe wird durch mehrfaches auf- und abpipettieren an die Matrix gebunden. Nach 3 x Waschen der Spitzen mit je 10 µl 0,1 % TFA werden die Peptide mit 5 µl 70 % ACN in 0,1 % TFA eluiert. 0,5 µl der Proben werden vor dem Aufbringen auf die Maldi-Platte 1:1 mit Maldi-Matrix (α-Cyano-4-hydroxy-Zimtsäure) gemischt und direkt gespottet.

### 3.13 Massenspektrometrie

Die Massenspektrometrie ist eine physikalische Trennmethode, mit der auch in der Proteinanalytik hochauflösende Massenbestimmungen möglich sind. Sie basiert auf dem Prinzip, dass ionisierte Teilchen (Molekülionen, Fragmentionen) im Vakuum auf einer bestimmten Strecke beschleunigt werden und anschließend in einem Magnetfeld entsprechend ihrer Masse unterschiedlich abgelenkt werden. Die Genauigkeit der Massenbestimmungen ist bei einer Auflösung von  $(m/\Delta m) \sim 20$  ppm

sehr hoch. Der allgemeine Aufbau eines Massenspektrometers aus Ionenquelle, Trennstrecke und Detektor ist besonders entsprechend spezieller Anforderungen der Ionisierung der zu untersuchenden Teilchen in der Baueinheit Ionenquelle sehr differenziert. Die Ionisation von Biomolekülen wird bevorzugt mit zwei Methoden durchgeführt: Elektrospray-Ionisierung (ESI) und Matrix-unterstützte Laser-Desorption (MALDI).

Aus den Massenspektren, bei denen die Proteine mit Elektrospray ionisiert werden, erhält man die Molekülmassen; die Erzeugung mehrfach geladener Molekülonen erschwert allerdings die Analyse von Mischungen.

Bei der ESI wird die Probelösung in eine Strecke mit einigen kV Potentialdifferenz gesprüht. Das Lösungsmittel im elektrostatisch geladenen Tröpfchen verdampft im Gasstrom. Das Makromolekül mit mehreren Ladungen  $z$  generiert ein Signal bei niedrigem  $m/z$ . Für Proteine gilt  $m/z = 600 \dots 2000$  auch für 200 kDa-Proteine. Bei der MALDI-Methode geschieht die Ionisation aus einer in eine feste Matrix eingeschlossenen Probe durch gepulste Laserstrahlung und Verdampfung. Es handelt sich um eine sanfte Ionisation (meist) ohne Fragmentation. In der für die eigene Arbeit bevorzugten Tandem-Massenspektrometrie wird die Fragmentierung ionisierter Proteine durch Kollisionen mit einem Neutralgas (CID = collision-induced dissociation) bewirkt. Im Anschluss wird aus dem Molekularionen-Cluster ein einziges monoisotopisches  $C_{12}$ - Ion isoliert und in einer zweiten Kammer analysiert. Für die Proteinanalytik besteht die Notwendigkeit der weitgehenden Vortrennung der zu untersuchenden Proteine, da sonst die Zahl der detektierten Massen und/oder Molekülfragmente so hoch wäre, dass eine Zuordnung zum untersuchten Proteingemisch schwierig wird. Zur Identifizierung der detektierten Massen werden sinnvollerweise bestehende Datenbanken herangezogen. Der Informationsgehalt der vollen MS-Spektren (Vorläuferionenspektren, „precursor ion scan“) besteht in der Massenbestimmung der Ionen, welche in einem zweiten Analytikschritt dann fragmentiert werden. Die MS/MS-Spektren liefern die Massen der Fragmentationen.

### 3.14 X-Gal-Färbung

Bei der untersuchten Promoterfliegenlinie *sug* > LacZ lag der Sugarbabe-promotor für *sug* homozygot auf dem X-Chromosom, und das LacZ-Gen homozygot auf dem zweiten Chromosom vor. Die von dem LacZ-Gen codierte  $\beta$ -Galactosidase hydrolysiert das Substrat X-Gal, es entsteht ein blauer Farbstoff. Die Larven, zweites Instar-Larvenstadium, werden auf Eis in Drosophila Ringer aufpräpariert, in PBT gewaschen und mit 4 % Glutaraldehyd in PBT 10 min fixiert. Danach wird wieder in PBT gewaschen und schrittweise in X-Gal Färbepuffer überführt. Für die Färbereaktion wird 1 ml Färbelösung mit 20  $\mu$ l 10 % X-Gal gemischt, auf 37 °C vorgewärmt und die Larven hinzugegeben. Gefärbt wird je nach Reaktionsgeschwindigkeit bei 20 °C oder bei 37 °C für 15 min bis 1 h. Die Reaktion wird durch Waschen in PBT gestoppt und die gefärbten Larven in 70 % und 100 % Ethanol dehydratisiert. Eingebettet werden die Präparate in Kanada Balsam.

### 3.15 Glycintiterbestimmung in Larven Hämolymphe

Vor dem Ansetzen des Experiments wurden die Larven in einem Zellkulturnetz ausgiebig mit dH<sub>2</sub>O von der Hefe freigewaschen und dann mit einem Pinsel auf eine neue Apfelagarplatte ohne Hefe übertragen. Anschließend wurden circa 200 Larven in ein 0,5 ml PCR-Reaktionsgefäß überführt. Dieses wurde vorher mit einer dünnen Nadel an der Unterseite durchbohrt und eine kleine Menge Watte eingesetzt. Watte und Reaktionsgefäß wurden mit dH<sub>2</sub>O gewaschen und angefeuchtet, um spätere Verluste von Hämolymphe zu verringern. Das 0,5 ml Reaktionsgefäß wurde in ein größeres 1,5 ml Reaktionsgefäß eingeführt, welches vorher mit 5  $\mu$ l dH<sub>2</sub>O gefüllt und an einer Feinwaage gewogen wird. Die Larven wurden vorsichtig mit einer Nadel angestochen, leicht gequetscht und 5 min bei 6 500 rpm und 4 °C zentrifugiert. Anschließend wurde das 1,5 ml Eppi erneut gewogen und aus der Differenz die Menge an Hämolymphe bestimmt. Zur Probenvorbereitung für die ESI-MS-Messung wurden die Proben mit 0,1 M HCl auf 1 ml aufgefüllt. Für die Umsetzung zum Butylester wurden je 100  $\mu$ l verwendet. Nach der Umsetzung erfolgte die Trocknung

der Proben und anschließend die Aufnahme in 1 ml Acetonitril/0,025% TFA (50:50, v/v). Die chromatografische Auftrennung der Proben erfolgte isokratisch (ACN/0,05 % TFA, 30:70, v/v) an einer Multospher120RP18 AQ-5 $\mu$  Säule. Bei einem Fluss von 0,25 ml/min wurden jeweils 20  $\mu$ l der derivatisierten Proben aufgetragen. Die Messungen wurden an einem API 365 Tandem-Massenspektrometer mit Elektrosprayionisierung bei positiver Ionisierung durchgeführt. Für die Identifizierung und Quantifizierung des Glycinbutylesters wurden spezifische MRM-Signale mit  $m/z = 132$  und  $76$  amu bzw.  $m/z = 132$  und  $57$  amu verwendet. Der Quadrupol Q1 war dabei auf einen festen Wert von  $m/z = 132$  eingestellt und ließ nur den Glycinbutylester durch. Die amu (atomic mass unit) Werte geben die resultierenden Fragmente an, die an Q3 detektiert wurden. Der Butylrest hatte dabei eine Masse von  $57$  amu, während der Glycinrest  $76$  amu aufwies. Zur Auswertung wurde das MRM-Signal  $m/z = 132$  und  $76$  amu ausgewählt. Die Quantifizierung erfolgte über eine interne Kalibrierung durch das Glycinisotop (Gly,C13,N15).



## 4 Ergebnisse

Diese Arbeit befasst sich mit zwei Aspekten der nahrungsabhängigen Regulation von Genen und Proteinen. Zum einen baut sie auf Erkenntnisse der Diplomarbeit „Molekulare Analyse des am Fettabbau beteiligten zuckerinduzierten Transkriptionsfaktors *sugarbabe* in *Drosophila melanogaster* (Meigen)“ (Walther, 2003) und den Ergebnissen von Zinke (Zinke, 2002) zur Charakterisierung von *sugarbabe* weiter auf. Zum anderen soll mit Hilfe der zweidimensionalen Gelelektrophorese und der Massenspektrometrie die Identifizierung von nahrungsabhängig regulierten Proteinen ermöglicht werden.

### 4.1 Charakterisierung von *sugarbabe*

*Sug* Überexpressionsexperimente und anschließende Mikroarrays von Zinke zeigten eine Repression mehrerer Lipasen (CG8093, CG6271, CG6277) auf mRNA Basis. Während der oben genannten Diplomarbeit konnte gezeigt werden, dass *sugarbabe* als Transkriptionsfaktor an diese lysosomalen Lipasen *in vitro* binden kann. Durch Generierung einer transgenen Fliege, die den *sugarbabe* Promotor zusammen mit Gal4 exprimiert, sollte eine durch Zucker induzierbare Promotorlinie zur Verfügung stehen. Vorteil dieses Konstrukts wäre eine schnelle Aktivierung des Zielgens durch Fütterung von Zucker. Hierfür wurden 2 Konstrukte kloniert, die unterschiedlich lange Bereiche des *sug* Promotors abdeckten. Während das längere der beiden etwa 1300 bp vor dem ATG Start des Gens abdeckt, überspannt das kleinere etwa 600 bp vor dem Start des Gens (Abbildung 4.1-1). Das durch PCR amplifizierte DNS-Fragment wurde in den P-Element-Vektor pCaSpeR kloniert. Nach Injektion und Entwicklung der Embryonen konnte eine stabile transgene Fliegenlinie etabliert werden, die das Sug-Gal4-Konstrukt enthält.

## Ergebnisse

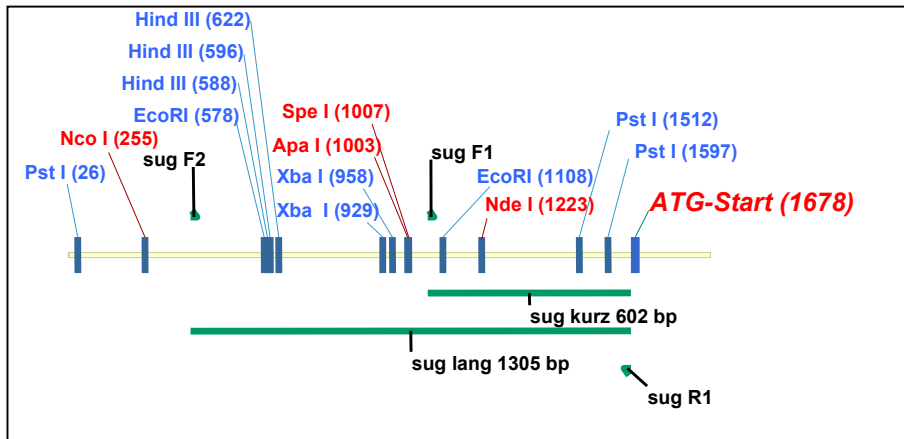


Abbildung 4.1-1: Übersicht der verwendeten Promotorbereiche zur Herstellung einer transgenen Fliegenlinie. Gezeigt sind die verwendeten Primer und deren Position, sowie die für die späteren Klonierungen und Überprüfungen wichtigen Restriktionsenzyme. Blau dargestellte Enzyme sind dabei mehrfach innerhalb der Sequenz vorhanden, während rot gefärbte Enzyme nur einmal innerhalb der dargestellten Sequenz auftreten.

Wichtig für nachfolgende Experimente war es, das Chromosom zu kennen, auf dem die Insertion stattgefunden hatte. Dies wurde durch eine Chromosomenlokalisierung (vgl. Kapitel 3.4) erreicht. Abbildung 4.1-2 zeigt ein solches Kreuzungsschema, nachdem eine Chromosomenlokalisierung erfolgte. Die Lokalisation auf dem X Chromosom wurde durch Rückkreuzung von homozygoten Männchen mit  $w^-$  Weibchen erreicht.

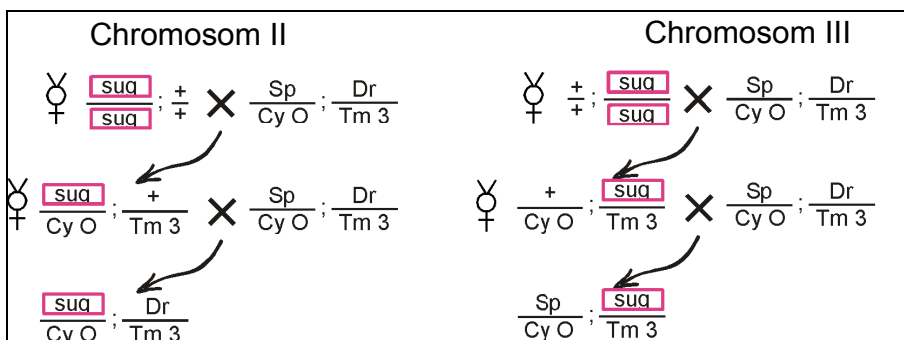


Abbildung 4.1-2: Kreuzungsschema zur Chromosomenlokalisierung von *sug*. Die verwendeten Abkürzungen sind im Text erklärt.

Chromosom I ist aufgrund seiner Größe nur in ganz wenigen Fällen von einer Insertion betroffen und wurde daher nicht weiter beachtet. Bei der hier verwendeten Balancer-Linie war im Gegensatz zum Standardansatz eine gleichzeitige

Identifizierung der Chromosomen II und III möglich. Diese Linie zeichnete sich durch das Vorhandensein der Marker Sp (Sternopleural), Dr (Drop) und Sb (Stubble), sowie die Balancer CyO (Curly of Oyster) und TM3 (Third multiple #3) aus. In der F1 Generation wurde nach Jungfrauen gesucht, die rote Augen und die beiden Marker CyO sowie TM3 besaßen und diese Fliegen erneut mit der Balancer-Linie verpaart. In der daraus entstehenden F2 Generation sollte dann bei einer Lokalisation des Konstrukts auf dem 2. Chromosom der sternopleural Marker (Sp) ausbleiben, während alle anderen Marker in verschiedenen Kombinationen auftreten sollten. Bei einer Lokalisation auf dem 3. Chromosom würde analog der Drop Marker (Dr) fehlen. Wie sich in diesem Versuch zeigte, war *sug* auf dem X Chromosom lokalisiert. Die F2 Generation wies dabei eine zufällige Verteilung der Marker auf. Im Gegensatz dazu zeigten alle F1 Weibchen der Verpaarung mit  $w^-$  Weibchen rote Augen, während die F1 Männchen alle weiße Augen besaßen. Diese Information war für spätere Experimente wichtig. Aufgrund der Lokalisation auf dem X Chromosom waren lediglich die weiblichen Jungfrauen für weitere Verpaarungsexperimente verwendbar. Der nächste Schritt bei der Charakterisierung von *sug* und der Etablierung einer transgenen *sug-driver* Linie war die Identifizierung der Expressionsgewebe.

#### **4.1.1 Lokalisation der Expression innerhalb von *Drosophila melanogaster* Larven**

Die Ergebnisse aus Zinke et al. von 1999, die eine Expression der RNS im Fettkörper, den malphigischen Gefäßen und des Mitteldarms zeigten, konnten auf Proteinebene mit Hilfe von Antikörpern und auch mit der *sug*-Driver-Linie bestätigt werden. Erfolgte bereits nach 1 h eine 15-fache Hochregulation der RNS für *sug* unter Zucker, so konnte erst nach ca. 4 h eine Färbung mit den Antikörpern identifiziert werden. Die Driver-Linie zeigte dagegen erst nach ca. 12 h eine eindeutige Färbung. Eine eingehendere Analyse des verwendeten Konstrukts und Vergleich der C/EBP-Bindestellen zeigte, dass die erste Bindestelle nicht vollständig

im Konstrukt enthalten war. Dies könnte eine mögliche Erklärung für die träge Aktivierung der *sug*-Driver-Linie unter Zucker sein.

### 4.1.2 Beteiligung von *sug* am Insulin-Signalweg

Da *sugarbabe* ausschließlich durch Zucker aktiviert wird, liegt die Annahme nahe, dass *sug* in direktem Kontakt mit dem Insulin-Signalweg steht oder aber ein völlig unabhängiger, neuer Signalweg existieren könnte. Hierfür sollten verschiedene Null-Mutanten des Insulin-Signalweges auf *sugarbabe* Expression unter Zucker getestet werden. Ein großes Problem war dabei, dass viele Null-Mutanten bereits in frühen Larvenstadien letal bzw. keine entsprechenden Fliegenlinien verfügbar waren. Eine Linie, die beide Bedingungen (nicht letal in frühen Larvenstadien und Null-Mutante) erfüllte, war *chico*, das auch als Insulin-Rezeptor-Substrat oder kurz IRS bekannt ist. Bindet Insulin an den Rezeptor (InR), wird dieser aktiviert und setzt eine Signalkette innerhalb der Zelle in Gang, an deren erster Stelle CHICO steht. Das CHICO- oder IRS-Protein ist ein wichtiges Glied in dieser Signalkette. Fehlt es, ist die Signalkette unterbrochen und das Insulinsignal wird von der Zelle nicht wahrgenommen. Ähnliche Phänotypen sind auch bei Diabetes Typ 2 oder Altersdiabetes zu beobachten. Dies ist also ein recht guter Ansatzpunkt, um die Beteiligung von *sug* am Insulin-Signalweg zu untersuchen. Für den Versuch wurden 2 *chico*-Linien verwendet. *Chico*<sup>1</sup> wurde durch die Insertion eines P-Elementes hergestellt, während *chico*<sup>2</sup> durch eine synthetische Deletion mutiert wurde. Da homozygote *chico*- Larven keinen sichtbaren Phänotyp besitzen, musste der vorhandene CyO-Balancer durch einen KrGFP-CyO-Balancer ausgetauscht werden (Casso et al., 2000). Wie in Abbildung 4.1-3 gezeigt, wurden die grün fluoreszierenden Larven gesammelt und als Grundlage für einen neuen Stock verwendet. Die Identifizierung der homozygoten Mutanten wurde nach Verpaarung von Individuen dieses Stocks in einem weiteren Schritt durch Auswahl der nicht fluoreszierenden Larven erreicht. Die so erhaltenen Larven wurden anschließend mittels semiquantitativer RT-PCR (Reverse Transkriptase – PCR) auf deren *chico* Expression getestet. Als Kontrolle dienten Wildtyp-Larven. Die

Eisammlung der beiden verwendeten *chico*-Mutanten erfolgte dabei über einen Zeitraum von 4 h und die RNS Extraktion in einem Alter von 48 h +/- 2 h.

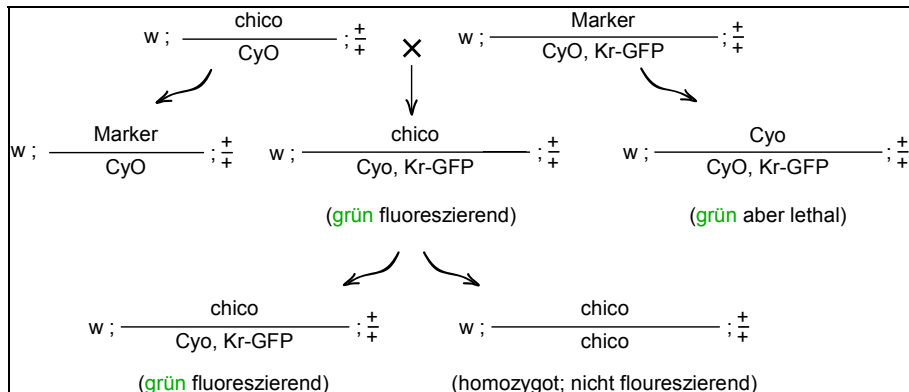


Abbildung 4.1-3: Kreuzungsschema für den Austausch von Balancern.

Wie in Abbildung 4.1-4 A zu sehen ist, zeigten die *chico*-Larven keine Expression des Gens. Die homozygoten Mutanten stellen also tatsächlich Null-Mutanten dar. In weiteren Experimenten wurde die *chico*<sup>1</sup>-Mutante verwendet und deren Einfluss auf die Expression von *sugarbabe* untersucht (Abbildung 4.1-4 B).

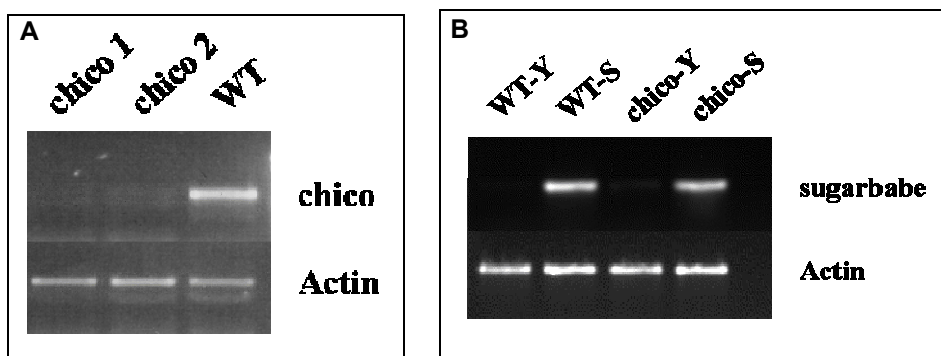


Abbildung 4.1-4: Semi quantitative RT-PCR. (A) *chico* Expression in *chico*-Mutanten und Wildtyp-Larven. (B) Expression von *sugarbabe* in Wildtyp- und *chico*-Larven. Die jeweilige Gruppe wurde entweder mit Hefe (Y) oder mit einer 20 %-igen Zuckerlösung (S) über einen Zeitraum von 4 h gefüttert.

Da in Mikroarrays bereits gezeigt werden konnte, dass *sugarbabe* nach ca. 4 h Zucker ein Maximum der Expression erreichte, wurde dieser Zeitraum als Referenz für die anstehenden Experimente verwendet. Ebenso wurde das Alter der Larven von 48 h beibehalten, um entwicklungspezifische Änderungen zu minimieren. Die RNS

wurde extrahiert und in RT-PCRs das Expressionslevel von *sug* gemessen (Abbildung 4.1-4). Untersucht wurden Wildtyp und homozygote *chico*-Mutanten. Unter Normalbedingungen, also Hefe, konnte keine *sug* RNS nachgewiesen werden. Unter Zucker wird *sug* allerdings, wie schon in Mikroarrays gezeigt, stark induziert. Dies trifft sowohl auf den Wildtyp, wie auf die *chico*-Mutante zu. Eine eindeutige Veränderung der *sug* Expression konnte innerhalb der *chico*-Mutante zu keiner Zeit nachgewiesen werden. Beobachtet man die Mikroarray-Daten bezüglich des Insulin-Rezeptors (InR) unter Hunger und Zucker, so wird deutlich, dass unter Hunger eine 4-fache Hochregulation stattfindet, unter Zucker die RNS-Menge des Insulin-Rezeptors aber unverändert bleibt. Zusammen mit der Tatsache, dass eine Null-Mutation von *chico* keine Veränderung der *sugarbabe*-Transkription hervorruft, lässt darauf schließen, dass *sugarbabe* sehr wahrscheinlich parallel zum Insulin-Signalweg agiert.

### 4.1.3 Beeinflussung der *sug* Expression durch *akh*-Zell-Knockout

Bei Säugetieren wird die Regulation der Blutzuckerhomeostase durch ein enges Zusammenspiel der Antagonisten Glucagon und Insulin erreicht, die in den  $\alpha$ - und  $\beta$ -Zellen der Pankreas exprimiert werden. Das Insekten-Homolog zu Glucagon ist das adipokinetische Hormon (AKH). Dieses Hormon zeigt nicht nur einen Effekt auf den Kohlenhydrat-, sondern auch auf den Lipidmetabolismus, durch den es seinen Namen erhielt. *Akh* wird in den Corpora-cardiaca-Zellen der Ringdrüse exprimiert und steht in engem neuronalen Kontakt zu den Insulin-produzierenden Zellen. Da scheinbar kein Effekt durch Deaktivierung des Insulin-Signalweges auf die *sug*-Expression erfolgte, wurde vermutet, dass *akh* einen Einfluss auf *sug* zeigen könnte. Für eine Untersuchung mussten daher die *akh*-produzierenden Zellen zerstört werden. Dies erfolgte durch die Kreuzung einer *akh*-Gal4-Driver-Linie mit der Apoptoselinie UAS-rpr/hid ( $Akh > RH$ ) (Buch, 2006). Als Kontrolle wurden Wildtyp-Larven und eine Kreuzung der *akh*-Gal4-Driver Linie mit der Reporterlinie UAS-LacZ ( $Akh > Lacz$ ) verwendet. Für eine semiquantitative RT-PCR wurden 72 h alte Larven verwendet, die vor der RNS-Extraktion jeweils für 4 h mit Hefe (Y) oder Zucker (S) gefüttert wurden (Abbildung 4.1-5).

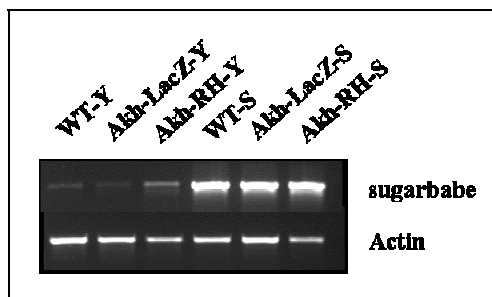


Abbildung 4.1-5: Nahrungsabhängige Expression von *sug* in *akh*-defizienten *Drosophila melanogaster* Larven. Erklärungen zur Beschriftung siehe Text

Überraschend war die Regulation von *sugarbabe* unter normalen Bedingungen (Hefe) in Akh-RH-Larven. Hier scheint eine Induktion stattgefunden zu haben, während unter Zuckergabe keine signifikante Veränderung feststellbar war. Um diese Ergebnisse weiter zu verifizieren, wurde der Versuch mit Hilfe von Realtime RT-PCR wiederholt. Zusätzlich zur Expression von *sug* wurde auch der Transkriptionslevel von *akh* überprüft. Es zeigte sich, dass die Menge an endogener *akh*-mRNS in der zweiten Kontrollgruppe mit Hefe (Akh-LacZ-Y) schon um circa 20 % und in *akh*-defizienten Larven (Akh-RH-Y) um 70 % abnahm (Abbildung 4.1-6). Scheinbar hatte die Driver-Linie bereits selbst einen Einfluss auf *akh*-Expression, so dass eine Absenkung von 20 % bei Akh-LacZ-Y zu beobachten war. Bei *akh* > RH handelte es sich also nicht um eine vollständige Null-Mutante, jedoch ist davon auszugehen, dass die beobachtete Reduzierung des *akh*-Transkripts bereits ausreichen sollte, um etwaige Missregulationen in beteiligten Signalwegen auszulösen.

## Ergebnisse

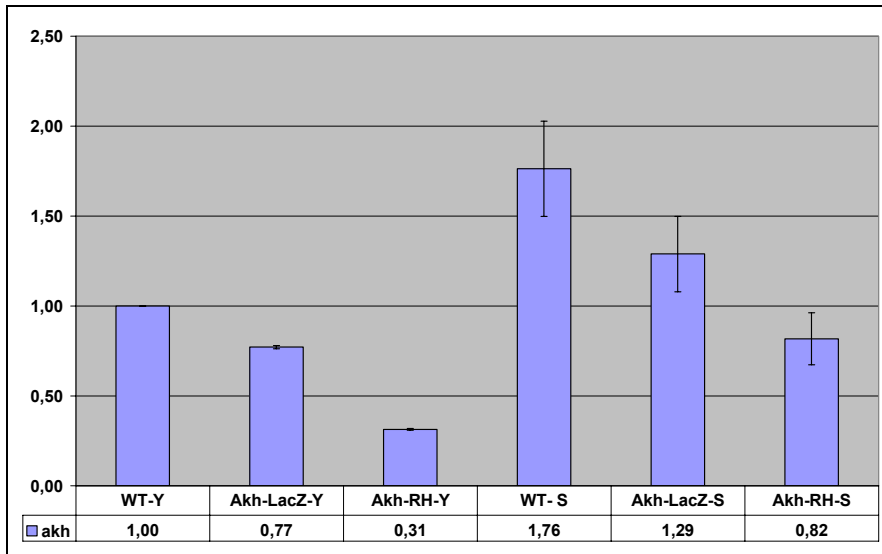


Abbildung 4.1-6: Expressionsunterschiede von *akh* in *akh*-defizienten Larven. Quantifizierung erfolgte mittels Realtime RT-PCR. Als Kontrolle dienten Wildtyp-Larven (WT), welche auf 1 gesetzt wurden.

Unter Zucker zeigte sich ein ähnlicher Verlauf für alle drei Fliegenlinien. Die Absolutwerte waren allerdings im Vergleich zu Hefe gefütterten Larven circa zweifach erhöht (Abbildung 4.1-6).

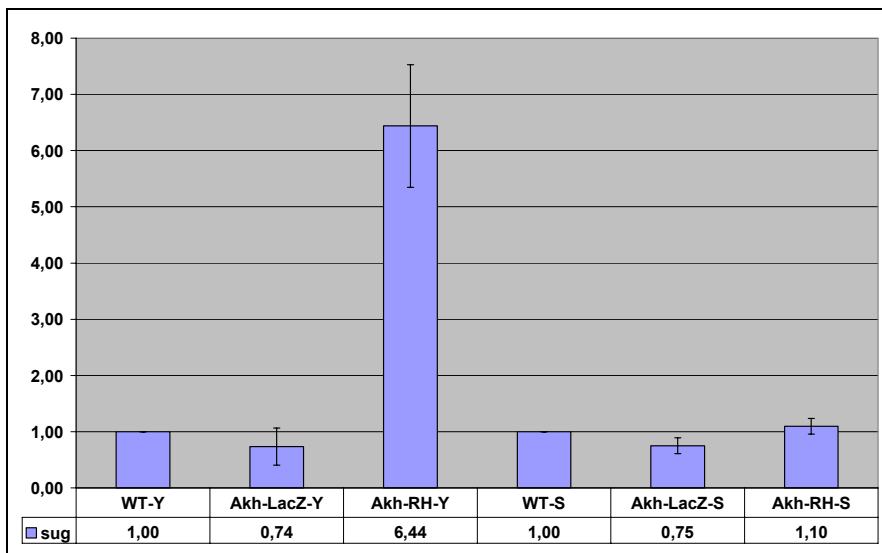


Abbildung 4.1-7: Expressionsunterschiede von *sug* in *akh*-defizienten Larven. Quantifizierung erfolgte mittels Realtime RT-PCR. Als Kontrolle dienten Wildtyp-Larven (WT), welche jeweils auf 1 gesetzt wurden, da die relative Veränderung untersucht werden sollt.



Die Realtime RT-PCR-Daten der Expressionsunterschiede von *sug* in *akh*-defizienten Larven unter Hefe und Zucker konnten die Ergebnisse aus der semiquantitativen RT-PCR bestätigen. Während unter Zucker kein signifikanter Anstieg zu beobachten war, stieg die *sug*-Expression in *akh*-defizienten Larven unter Hefe auf über das 6-fache an (Abbildung 4.1-7).

#### 4.1.4 Beteiligung von C/EBP am *sug* Signalweg

Eine Analyse des Promotorbereichs von *sug* konnte mehrere Bindestellen für C/EBP (CCAAT enhancer binding protein) aufdecken und war Grundlage für die These, dass C/EBP bei der Regulation von *sug* beteiligt sein könnte. Die Positionen der fünf C/EBP Bindestellen sind in Abbildung 4.1-8 gezeigt.

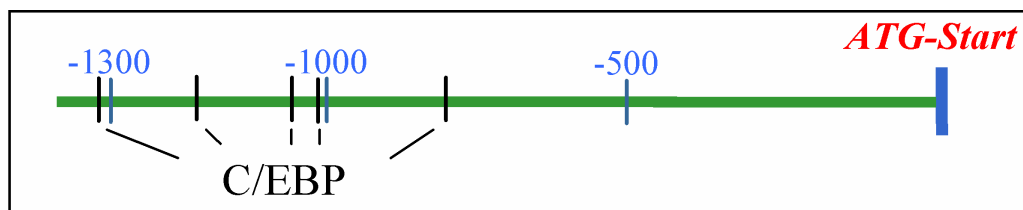


Abbildung 4.1-8: Übersicht über mögliche C/EBP Bindestellen innerhalb des *sug* Promotors

Texeira et al. (unpublizierte Daten) konnte in Mikroarray-Experimenten mit *slbo*-Mutanten eine Fehlregulation von *sug* in Embryonen nachweisen und stärkt die Annahme einer möglichen Beteiligung von *slbo* bei der *sug* Regulation. Im Folgenden soll nun die Beteiligung von *slbo* innerhalb des *sugarbabe* Regelkreises untersucht werden.

## Ergebnisse

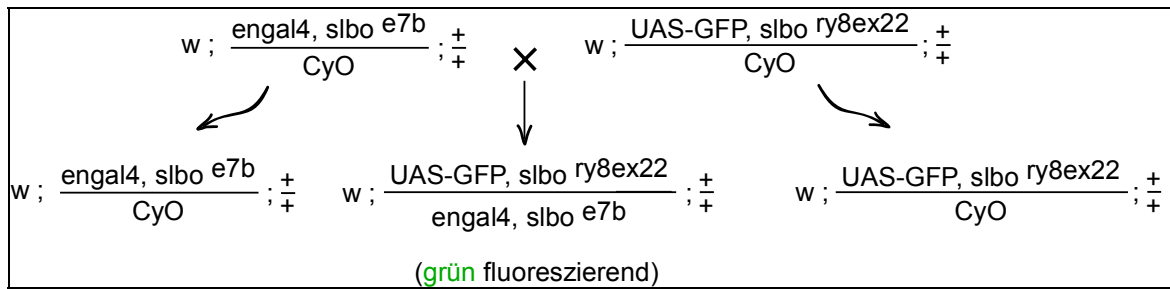


Abbildung 4.1-9: Kreuzungsschema zur Erzeugung von transheterozygoten *slbo* Mutanten. Der Marker ist homozygot letal und wird daher im Schaubild nicht gezeigt.

Abbildung 4.1-9 beschreibt das Kreuzungsschema zur Erzeugung transheterozygoter *slbo*<sup>-/-</sup>-Mutanten. Die Verwendung zweier Fliegenlinien ermöglicht es, relativ einfach transheterozygote Larven zu identifizieren. Sind beide Allele in einer Larve vorhanden, so fluoresziert diese durch Aktivierung des Gal4-UAS-Systems (Brand und Perrimon, 1993). Die Mutanten reagieren sehr empfindlich auf Nipagin, ein Antipilzmittel, das dem normalen Fliegenfutter und den Apfelagarplatten standardmäßig hinzugefügt wird. Dies machte es notwendig die Versuche auf Nipagin-freien Apfelagarplatten durchzuführen. Da ohne Nipagin die Platten innerhalb weniger Stunden anfangen zu schimmeln, wurden sie nach spätestens 24 h gewechselt. Die Sammlung erfolgte über einen Zeitraum von 8 h. Die Larven wurden in einem Alter von 48 h +/- 4 h homogenisiert und die RNS extrahiert und für RT-PCR verwendet. Als Kontrolle wurden Wildtyp-Fliegen und heterozygote *slbo*-Mutanten verwendet.

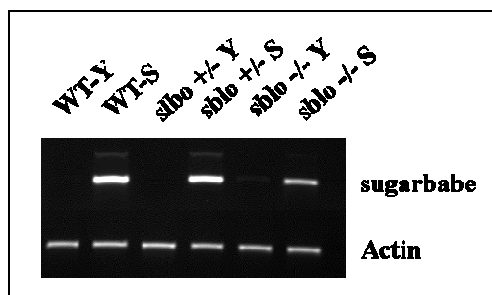


Abbildung 4.1-10: Semi quantitative RT-PCR von *sug*. Expressionsunterschiede von *sugarbabe* in Wildtyp, heterozygoten und transheterozygoten *slbo*-Mutanten. *Actin* diente zur Normalisierung.

Wie sich zeigte, entsprach die *sugarbabe*-Expression in *slbo*<sup>+/</sup> in etwa dem Niveau der Wildtyp-Larven. Bei transheterozygoten Larven verringerte sich das Niveau allerdings auf ca. 60 % des Wildtyps. Da die heterozygoten Larven keinen signifikanten Unterschied zum Wildtyp aufwiesen, wurden weitere Experimente nur noch mit Wildtyp und *slbo*<sup>-/-</sup>-Larven durchgeführt. Zuerst galt es die Daten der semiquantitativen RT-PCR in Realtime RT-PCR-Experimenten zu überprüfen.

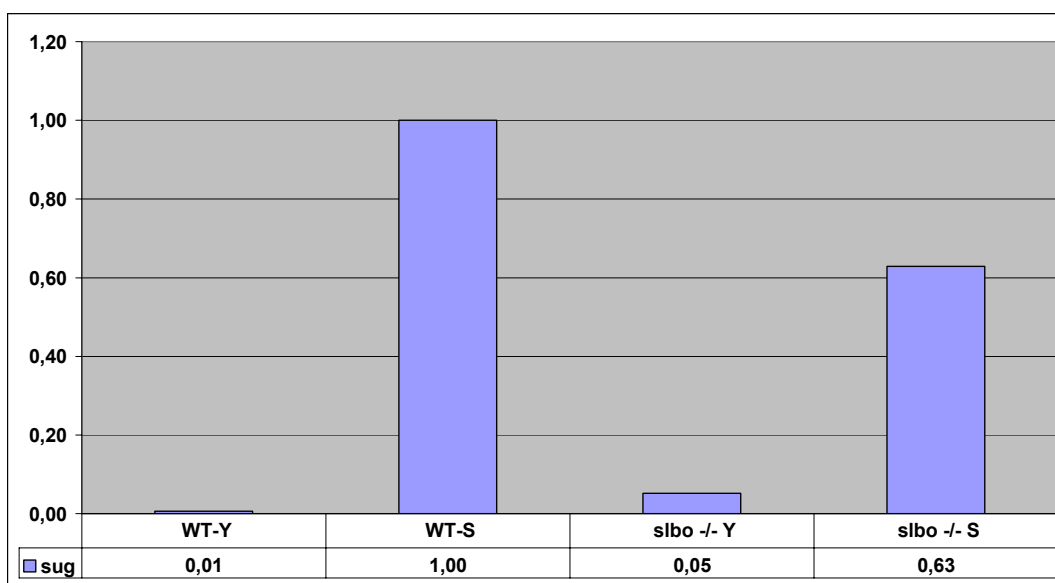


Abbildung 4.1-11: Expressionsunterschiede von *sugarbabe* in Wildtyp und transheterozygoten *slbo*-Mutanten. Quantifizierung von *sug* mittels Realtime RT-PCR. Als Kontrolle dienten zuckergefütterte Wildtyp-Larven (WT-S), welche gleich 1 gesetzt wurden. Da nur eine geringe Expression von *sug* in normalgefütterten Larven vorhanden ist, wurde auf eine Normalisierung mit diesen Werten verzichtet.

Auch hier zeigte sich eine Verringerung der *sug*-Expression um circa 40% in *slbo*<sup>-/-</sup>-Larven. Gleichzeitig zeigte sich eine Erhöhung des Grundlevels von *sug* unter normalen Bedingungen (Hefe) in *slbo*<sup>-/-</sup>-Mutanten (Abbildung 4.1-11). Dies bedeutet, dass *slbo* einen direkten Einfluss auf die *sugarbabe*-Expression hat. Die hier gewonnenen Daten sollten nun in weiteren Experimenten bestätigt und die Kinetik der beobachteten Effekte untersucht werden. Das Gesamtalter der Larven blieb dabei unverändert, der Zeitraum der Zuckerfütterung wurde dagegen von 1 h bis 20 h variiert (Abbildung 4.1-12 und Abbildung 4.1-13). Sieht man sich die Ergebnisse an, fällt auf, dass die Kontrollen in den ersten Zeitpunkten ein, im Vergleich zu den

## Ergebnisse

späteren Werten erhöhtes Level aufweisen. Während bei der Wildtyp-Gruppe nur der erste Wert (1 h) leicht erhöht ist, zeigt sich bei der *slbo*-Mutante ein deutlicher Anstieg der *sug*-Expression bei 1 h und ein leichter Anstieg bei 4 h (Abbildung 4.1-12). Normalisiert man auf WT-Y so ergibt sich eine 7-fache Erhöhung der Expression innerhalb der *slbo*-Mutanten für 1 h und 4 h (Daten nicht gezeigt). Es scheint, als würde *sug* als Folge von Stress durch den Waschvorgang zusätzlich induziert. Je länger Waschvorgang und RNS-Extraktion auseinander liegen, desto schwächer ist die *sug*-Expression unter Hefe. Wildtyp-Larven reagieren weniger stark als die *slbo*-Mutanten auf diesen Stressfaktor.

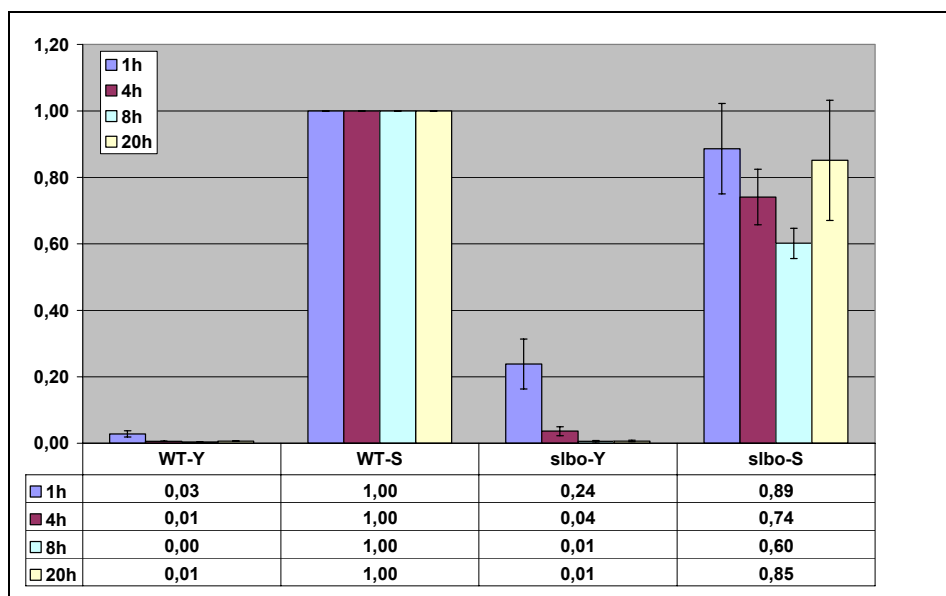


Abbildung 4.1-12: Expressionsunterschiede von *sugarbabe* in Wildtyp und transheterozygoten *slbo*-Mutanten. Quantifizierung von *sug* durch Realtime RT-PCR. Als Kontrolle dienten Wildtyp-Larven, die mit Zucker gefüttert wurden (WT-S), welche gleich 1 gesetzt wurden.

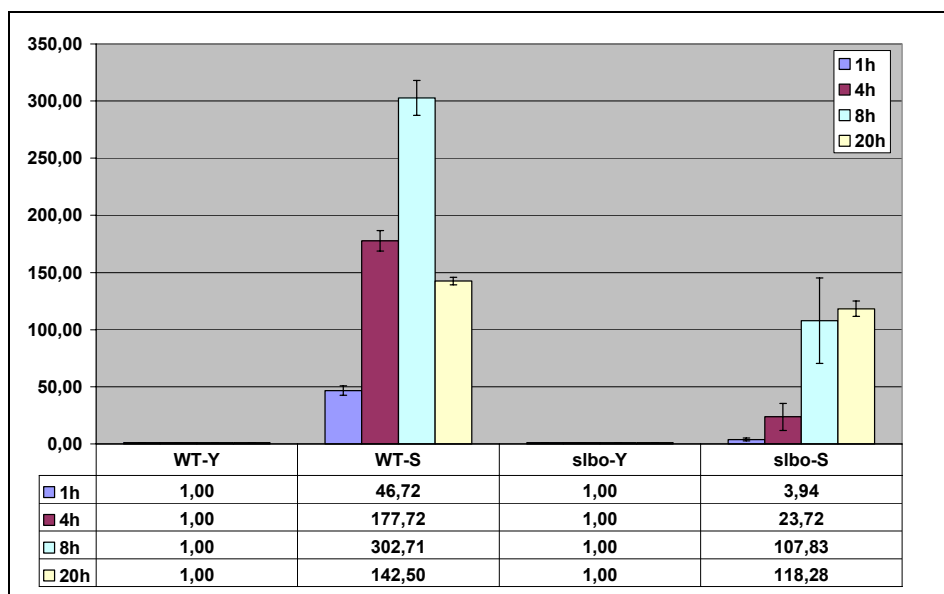


Abbildung 4.1-13: Relative Expressionsänderung von normal- und zuckergefütterten Larven innerhalb der jeweils eigenen Gruppe. Die normalgefütterten Larven der Wildtyp- und der Mutanten-Gruppe werden dabei gleich 1 gesetzt. Weitere Angaben siehe Abbildung 4.1-12.

Überraschenderweise ergibt sich ein völlig anderes Bild, sieht man sich die relative Expressionsänderung innerhalb der jeweiligen Gruppe an (Abbildung 4.1-13). Die Expression steigt im Wildtyp kontinuierlich an und erreicht nach 8 h einen Gipfel, um nach 20 h auf einen circa halb so hohen Wert abzufallen. Ist *slbo* allerdings nicht vorhanden, so zeigt sich ein sehr viel langsamerer Anstieg der *sug*-Expression, der nicht, wie beim Wildtyp, nach 20 h wieder absinkt, sondern kontinuierlich steigt. Die absoluten Werte von Wildtyp und *slbo*-Mutanten nach 20 h liegen relativ nahe beieinander.

Zeitpunkt (Stunden auf Test-Nahrung)	rel. Expressionsänderung		slbo Expression (in % des WT)
	WT	slbo	
1 h	46,70	3,95	8,45
4 h	177,70	23,70	13,39
8 h	302,70	107,80	35,70
20 h	142,50	118,20	83,24

Tabelle 4.1-1: Vergleich der relativen Expressionsänderung zwischen Wildtyp (WT) und *slbo*-Mutanten.

Die Wildtyp-Gruppe zeigt hier noch eine 142-fache Induktion, während die *slbo*-Gruppe eine 118-fache Erhöhung aufweist (Tabelle 4.1-1). Die verlangsamte Kinetik der *sug*-Expression innerhalb der *slbo*-Mutanten wird in Tabelle 4.1-1 noch einmal verdeutlicht. Erreicht die relative Expressionsänderung bei *slbo* nach einer Stunde Zuckerfütterung nur circa 9 % des Wildtyp-Wertes, so steigt dieser kontinuierlich an und erreicht nach 20 h 83 % des Kontrollwertes. Längere Fütterungsexperimente wurden nicht durchgeführt, so dass zum jetzigen Zeitpunkt keine Aussage zum weiteren Verlauf gemacht werden kann.

## 4.2 Proteomik

Neben der Charakterisierung von *sugarbabe* und damit zusammenhängenden Signalwegen, sollte mit dieser Arbeit eine Technik zur globalen Proteomanalyse am Institut etabliert werden. Die dafür am geeignetsten erscheinende Technik war die zweidimensionale Gelelektrophorese. Diese Technik existiert bereits seit 1975, dennoch gibt es bisher nur wenige Arbeitsgruppen, die sich mit dem Proteom der Fruchtfliege *Drosophila melanogaster* befassen. Die Analysen beschränken sich dabei meist auf Identifizierung und Charakterisierung des Proteoms in bestimmten Kompartimenten. Differenzielle Analysen erfolgen nur sehr selten. Obwohl die Technik fortwährend optimiert wurde, sind auch heute noch etliche Probleme von der Probenaufreinigung bis hin zur Identifizierung einzelner Proteine vorhanden.

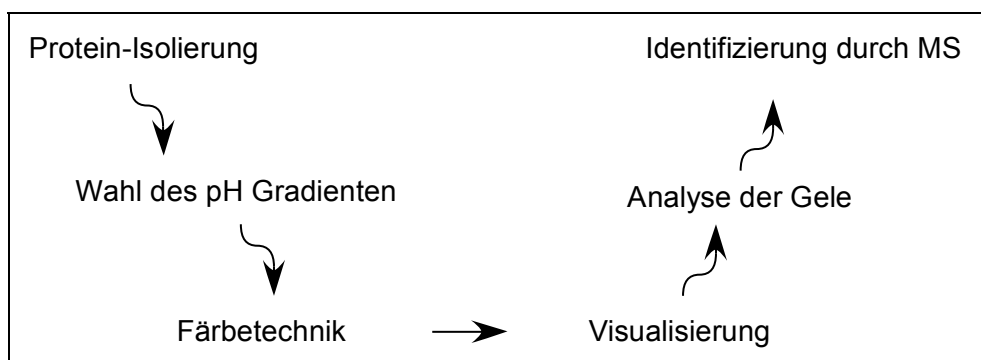


Abbildung 4.2-1: Schlüsselstellen der Proteomik. Die einzelnen Punkte bieten eine Reihe von Alternativen, die sich unter bestimmten Umständen gegenseitig ausschließen oder später folgende Schritte nachhaltig beeinflussen.

### 4.2.1 Probenvorbereitung

Für die Isolierung von Proteinen wurde ein spezieller Puffer verwendet, der für die Isolierung von cytoplasmatischen und mitochondrialen Proteinen aus *Drosophila melanogaster* optimiert wurde. Durch die Verwendung von mehreren zusätzlichen Proteininhibitoren sollte eine Degradation der extrahierten Proben verhindert werden. Ein weiterer wichtiger Schritt war die Aufreinigung der Proben. Während mit dem „2D Cleanup Kit“ aufgereinigte Proben eine ausreichend hohe Spannung bei der

isoelektrischen Fokussierung erreichten, zeigten nicht aufgereinigte Larvenlysate einen zu hohen Widerstand, so dass anstatt der benötigten 8 000 V nur circa 1000 V erreicht wurden. Als Folge der geringen Spannung konnte keine ausreichende Auftrennung in der ersten Dimension erreicht werden. In einem ersten Experiment wurde festgestellt, dass die Wahl der für die Färbung (Silber und Coomassie-Färbung) verwendeten Schalen einen deutlichen Einfluss auf die Anzahl der zu visualisierenden Spots hatte. So wurden zwei unterschiedliche Kunststoff-Schalen in einem parallelen Ansatz verwendet. Die Gele wurden mit gemeinsam angesetzten Lösungen behandelt und in einem parallelen Ansatz entwickelt. Es zeigte sich, dass die Silberfärbungen in Polypropylen (PP)- und Polyvinylchlorid (PVC)-Schalen einen deutlichen Unterschied aufwiesen. Während in PVC-Schalen nur eine geringe Anzahl an Spots zu erkennen waren, konnten in PP-Schalen gefärbten Gelen bis zu 50 % mehr Spots nachgewiesen werden.

Ausgehend von diesem Ergebnis wurden alle weiteren Experimente in speziellen Polypropylen-Schalen durchgeführt. Soweit möglich wurden alle differentiellen Gele (Gele von normal- und zuckergefütterten Larvenextrakten) gemeinsam in einer Schale gefärbt, um mögliche Abweichungen zu minimieren. Der erste Vergleich von normal- mit zuckergefütterten Larven zeigte bereits ein viel versprechendes Spotmuster (Abbildung 4.2-2). Auffallend war die Konzentration der Spots in der Mitte der beiden Gele. Hier befindet sich der physiologische Bereich zwischen pH 5 und pH 8, in dem die meisten löslichen Proteine einer Zelle vorkommen. Da aber bereits in diesem frühen Stadium mit nur wenig sichtbaren Spots (ca. 100 Punkte im Gel der normalgefütterten Larven) einige Spots in den extremen pH-Bereichen unter pH 5 und über pH 8 zu finden waren, wurde für die erste Dimension ein pH-Bereich von 3-10 für spätere Experimente beibehalten, um einen möglichst großen Bereich abzudecken. Der Marker diente als Anhaltspunkt für das Molekulargewicht der jeweiligen Proteine. Sobald die ersten Landmarken identifiziert wurden, konnte auf die Verwendung eines Markers verzichtet werden.



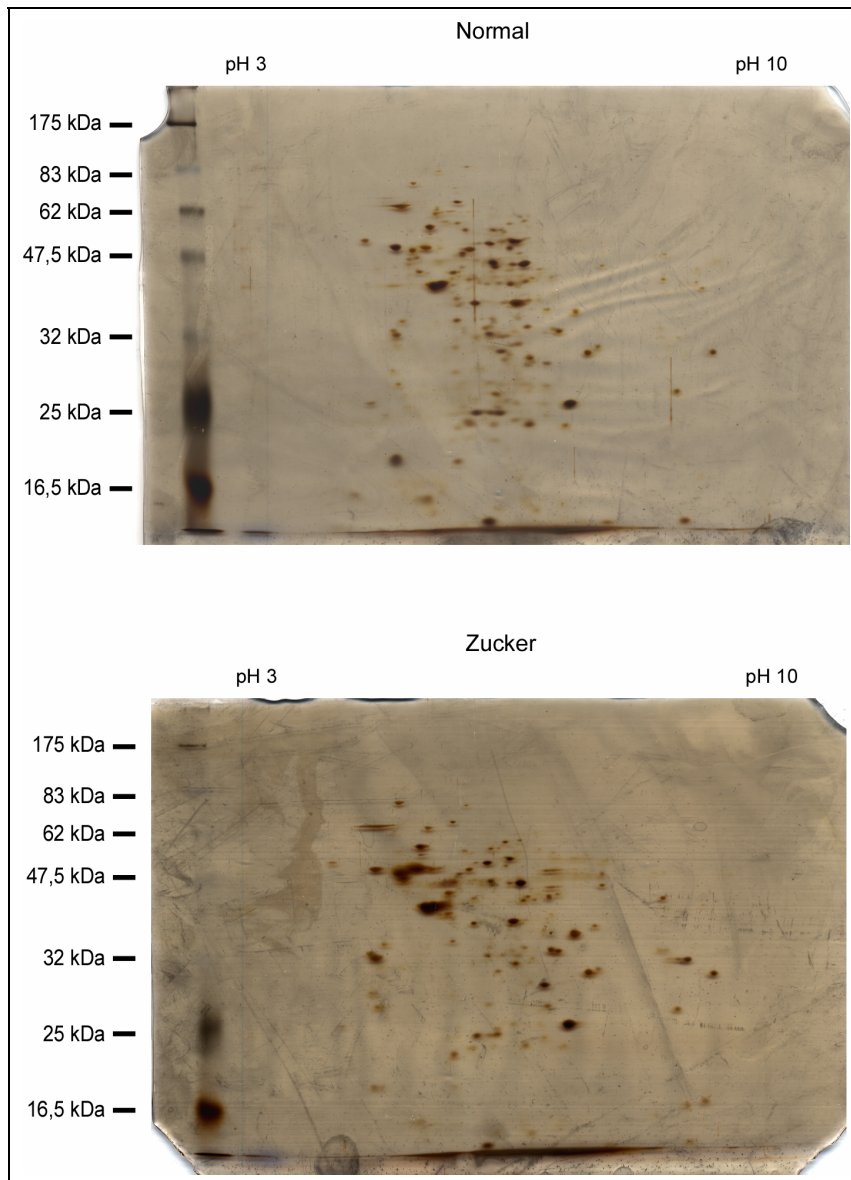


Abbildung 4.2-2: Zweidimensionale Gelmuster differenziell gefütterter Wildtyp Larven. Aufgetragen wurden je 40 µg Gesamtprotein auf einen pH 3–10 Strip. Fokussierung erfolgte mit 15 kVh und Auftrennung auf einem 10 %-igen SDS Gel. Färbung erfolgte durch Silberfärbung. Die Orientierung der Gele ist in allen folgenden Experimenten gleich, so dass auf die Einzeichnung von pH und Molekulargewichtsverlauf verzichtet wird.

#### 4.2.2 Untersuchung differentiell exprimierter Proteine in *Drosophila melanogaster*

Wegen der nur geringen Anzahl an sichtbaren Spots wurde der Versuch wiederholt und die doppelte Menge an Protein eingesetzt. Gleichzeitig wurde noch eine dritte Versuchsgruppe eingeführt. Es sollten die Proteome von normal- (N) und zuckergefütterten (Z) Larven, sowie gehungerte (H) Larven untersucht werden. Ziel war es den experimentellen Aufbau in Anlehnung an die Mikroarray-Experimente von Zinke et al. (Zinke, 2002) für die Proteomanalyse zu benutzen.

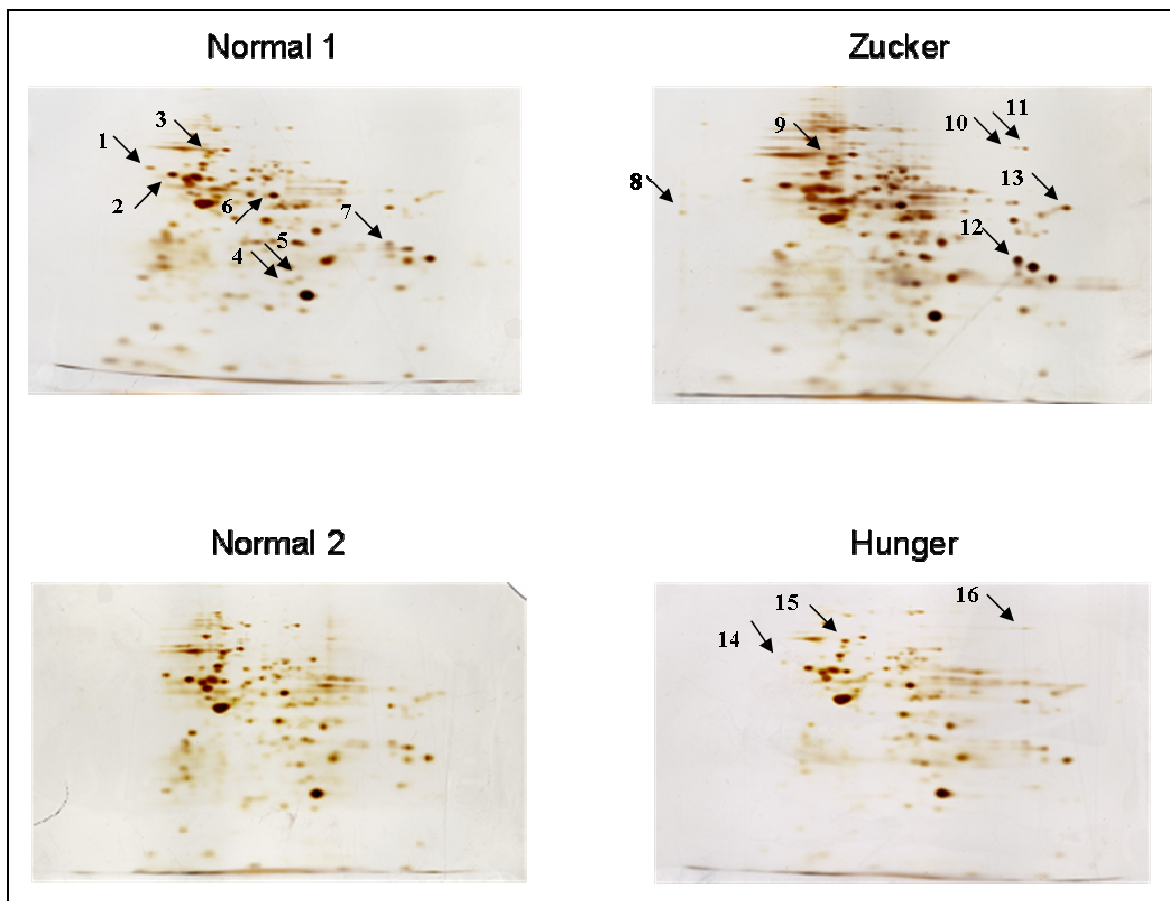


Abbildung 4.2-3: Überblick über verschiedenen 2D Gele. Aufgetragen wurden 80 µg Protein. Strip: pH 3–10. Die Fokussierung erfolgte mit 15 kVh. Auftrennung auf einem 10 %-igen SDS Gel und anschließender Silberfärbung. Die für die Massenspektrometrie ausgeschnittenen Spots sind mit Pfeilen markiert. Die Larven hatten ein Alter von 48 h und wurden für 4 h den jeweiligen Nahrungsbedingungen ausgesetzt.

Um entwicklungspezifische Unterschiede so gering wie möglich zu halten, wurde eine Dauer von 4 h gewählt, da zu diesem Zeitpunkt bereits Veränderungen im Transkriptom erkennbar waren, entwicklungsbedingte Einflüsse aber als gering eingeschätzt werden konnten. Aufgrund der technischen Begebenheiten wurden 2 Gelelektrophoresekammern verwendet. Damit zusammenhängend wurde je ein Kontrollgel (N) pro Kammer mit einem Versuchsgel (Z oder H) zusammen aufgetrennt (Abbildung 4.2-3), um Laufunterschiede, bedingt durch verschiedene Gelelektrophoresekammern, auszugleichen. Beide Gele einer Kammer wurden anschließend gemeinsam gefärbt und entwickelt. Abbildung 4.2-4 zeigt Überlagerungen der einzelnen Gele miteinander. In (A) werden die beiden Kontrollgele miteinander verglichen.

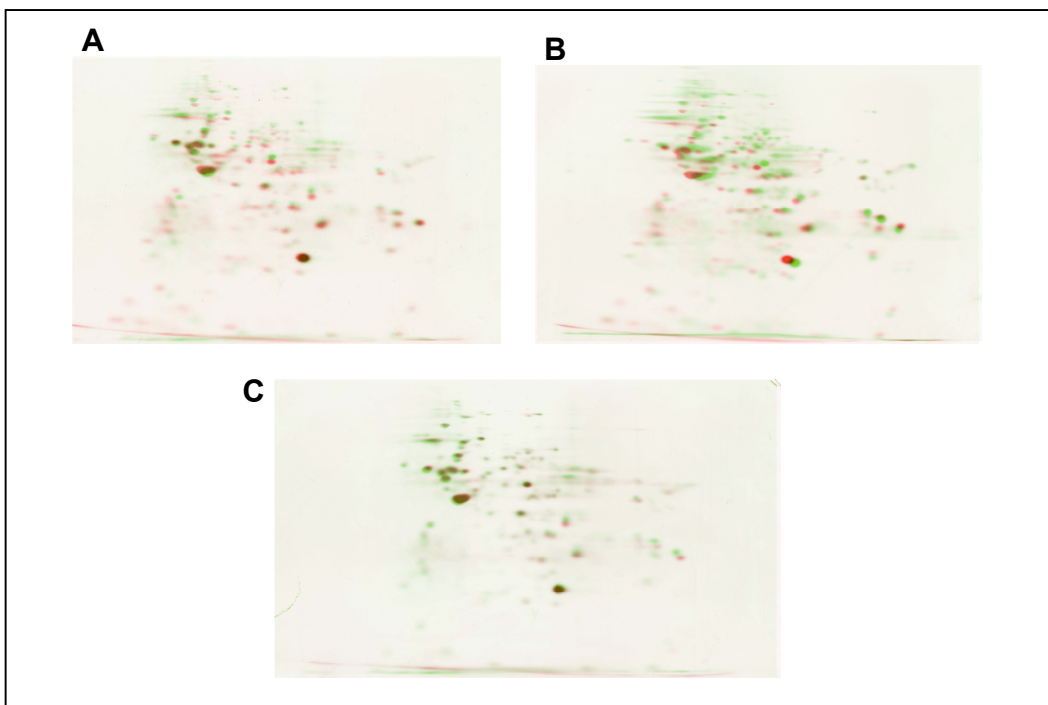


Abbildung 4.2-4: Überlagerungen der zweidimensionalen Gele. (A) Überlagerung von N1 (rot) und N2 (grün). (B) Überlagerung von N1 (rot) und Z (grün). (C) Überlagerung von N2 (grün) und H (rot).

Es war erkennbar, dass durch die Verwendung zweier unterschiedlicher Gele Laufunterschiede innerhalb der Gele auftreten, die zu einer Verschiebung der Proteinmuster führten. Obwohl für beide Gele die gleiche Probe und auch die gleiche

## Ergebnisse

---

Gellösung verwendet wurde, war eine genaue Überlappung der Gele nicht möglich (Abbildung 4.2-4 A). Um dieses Problem zu umgehen, wurde versucht das Matching, also die Überlagerung bzw. Zuordnung der Spots zweier oder mehrerer Gele mithilfe der Software PDQuest der Firma Bio-Rad durchzuführen.

Nach dem Vergleich der Gele miteinander wurden mehrere Spots ausgewählt und für eine anschließende massenspektrometrische Bestimmung ausgeschnitten. Die MALDI-TOF Messungen wurden am 4700 Proteomics Analyzer (Applied Biosystems, Framingham, MA) durchgeführt.

Protein-Spot	Identifiziertes Protein	Gel	Bemerkung
1	Calreticulin	N	passend zu 8 und 14
2	PDI	N	Protein Disulfid Isomerase
3	Vha 68-2	N	passend zu 9 und 15
4	--	N	zu geringe Proteinmenge
5	Porin	N	
6	Enolase	N	
7	GAPDH I	N	passend zu 12
8	Calreticulin	Z	passend zu 1 und 14
9	Vha 68-2	Z	passend zu 3 und 15
10	--	Z	zu geringe Proteinmenge
11	--	Z	zu geringe Proteinmenge
12	GAPDH I	Z	passend zu 7
13	EF 1 $\alpha$ -48D	Z	stark reguliert unter Zucker
14	Calreticulin	H	passend zu 1 und 8
15	Vha 68-2	H	passend zu 3 und 9
16	menschliches Keratin	H	Verunreinigung beim Trypsinverdau

Tabelle 4.2-1: Mit Massenspektrometrie identifizierte Proteine. Die Spotnummern beziehen sich auf Abbildung 4.2-3

Die Resultate dieser Analyse sind in Tabelle 4.2-1 zusammengefasst. Zu diesem Zeitpunkt war noch keine Software zur automatischen Proteinidentifizierung vorhanden, so dass die Bestimmung manuell über die im World Wide Web zugängliche Software Mascot (<http://www.matrixscience.com/>) erfolgte. Eine Analyse mit MALDI-ToF-ToF war mit diesem Interface nicht möglich.

Die Ergebnisse zeigten, dass ein Matching der Gele möglich war. Die ausgeschnittenen Spots der jeweiligen Gele konnten in den meisten Fällen als identische Proteine identifiziert werden (vgl. Spot 1, 8, 14 und 3, 9, 15). Spot 16 zeigte zudem eines der Probleme, die beim nicht automatischen und nicht robotergestützten Prozessieren der Proben auftreten konnten. Die Verunreinigung durch geringe Mengen an menschlicher Haut oder Haaren, wie sie zum Beispiel in Staub vorkommt, reichte aus, um das eigentliche Signal des Proteins zu überdecken, so dass eine eindeutige Identifizierung unmöglich wurde. Eine sehr starke Regulation zeigte Spot 13, der als Elongationsfaktor 1- $\alpha$ -48D identifiziert werden konnte. Elongationsfaktoren nehmen Einfluss auf die Prozessierung von Proteinen und können so die Regulation bestimmter Proteine auf Translationsebene steuern. Eine solche Regulation könnte daher mit Hilfe von Mikroarrays nicht detektiert werden. Dies zeigt die Fähigkeiten dieses Ansatzes zur Gewinnung neuer bisher unbekannter Daten.

Ein Problem, das in diesem Experiment auffiel, war die bereits angesprochene ungleichmäßige Entwicklung der Gele durch die verwendete Silberfärbung. Alle drei Gele wurden mit der gleichen Menge Protein geladen und gleichzeitig gefärbt. Die Spotmuster zeigten allerdings starke Unterschiede in der Gesamtfärbung sowie im Hintergrund.

### **4.2.3 Proteomuntersuchung IPC defizienter Fliegen**

Die Zerstörung der Insulin-produzierenden Zellen (IPC) der Fliegen wurden mit Hilfe einer Kreuzung von InsP3-Gal4 und einer Apoptose-induzierenden Linie (UAS-rpr/hid) erreicht (InsP3 > rpr/hid) (Buch, 2006). InsP3 bezeichnet dabei ein Konstrukt, das die Promotorregion von *dilp3* enthält. *Dilp3* ist eines von insgesamt 7 *Drosophila*

Insulin-like peptides (Dilp), die Homologe der Vertebraten Insulin Rezeptor Substrate (IRS) sind. Ein Vorteil des InsP3-Konstruktes war die erst im 3. Instar ansteigende Expression. Die IPC wurden dadurch erst im späten 3. Instar zerstört, wodurch eine normale Larvalentwicklung möglich war und gleichzeitig entwicklungsspezifische Einflüsse verringert wurden. Als Kontrolle diente die Kreuzung mit einer UAS-LacZ-Linie (InsP3 > LacZ). Für die Versuche wurden ausschließlich weibliche Tiere verwendet. Die späte Zerstörung der IPC sollte es ermöglichen, Hinweise über deren Funktion im adulten Tier zu erhalten. Neben phänotypischen Beobachtungen wurde auch eine genomweite Analyse IPC-defizienter Fliegen mit Hilfe von Mikroarrays durchgeführt (Buch, 2006). Die erhaltenen Daten aus diesem Versuch zeigten, dass lediglich sechs Gene mehr als dreifach positiv oder negativ reguliert waren. Da es sich bei Insulin um eine als wichtig einzustufende Komponente des Energiemetabolismus handelt, war dieses Ergebnis sehr überraschend, da mit einer sehr viel stärkeren und umfangreicheren Reaktion gerechnet wurde. Ausgehend von diesen Daten wurde vermutet, dass der erwartete Effekt möglicherweise auf Proteomebene erfolgen könnte. Es wurden adulte Fliegen der beiden Kreuzungen verwendet, deren Proteine extrahiert und in gleichen Mengen für 2D Gele eingesetzt.

### **4.2.3.1 Proteinregulation in IPC defizienten Fliegen**

In einem ersten Versuch wurden die Proteine auf 11 cm Streifen mit pH 3-10 und anschließend gemäß ihrem Molekulargewicht aufgetrennt. Die Gele wurden mit Silberfärbung visualisiert und mit Hilfe der Software PDQuest ausgewertet. Auch hier zeigte sich erneut eine unterschiedlich starke Färbung beider Gele und machte eine eindeutige Quantifizierung schwierig. Insgesamt wurden im Anschluss an die Analyse 45 Spots ausgeschnitten, die entweder eine Regulation zeigten, als Landmarken dienen sollten oder ein interessantes Muster bildeten (Aconitase Spots (1, 2, 3, 24) Abbildung 4.2-5). Abbildung 4.2-5 gibt einen Überblick über die ausgeschnittenen Spots und deren Positionen innerhalb der Gele, während Tabelle 4.2-2 die Ergebnisse der massenspektrometrischen Analyse zusammenfasst. Die Identifizierung erfolgte mittels der Software GPS Explorer 3.0 der Firma Applied

Biosystems. Dabei wurde eine kombinierte MS- und MS-MS-Analyse durchgeführt. Nach der MALDI-ToF-Messung wurden die fünf stärksten Peptide für Tandem-Massenspektrometrie automatisch ausgewählt und erneut gemessen. Die Ergebnisse beider Messungen wurden anschließend zur Identifizierung herangezogen. Da die MS-MS-Messungen der eigentlichen Analyse vorangingen, konnte es vorkommen, dass keine für die Identifizierung relevanten Signale mittels MS-MS gemessen wurden. Der resultierende MS-MS Score ist dabei kleiner 90% und wurde in den folgenden Tabellen nicht weiter beachtet. Auf eine anschließende manuelle Nachmessung wurde in der Regel verzichtet. Eine genauere Beschreibung und eine Übersicht über verwendete Einstellungen der jeweiligen Modi sind im Anhang aufgeführt und erklärt.

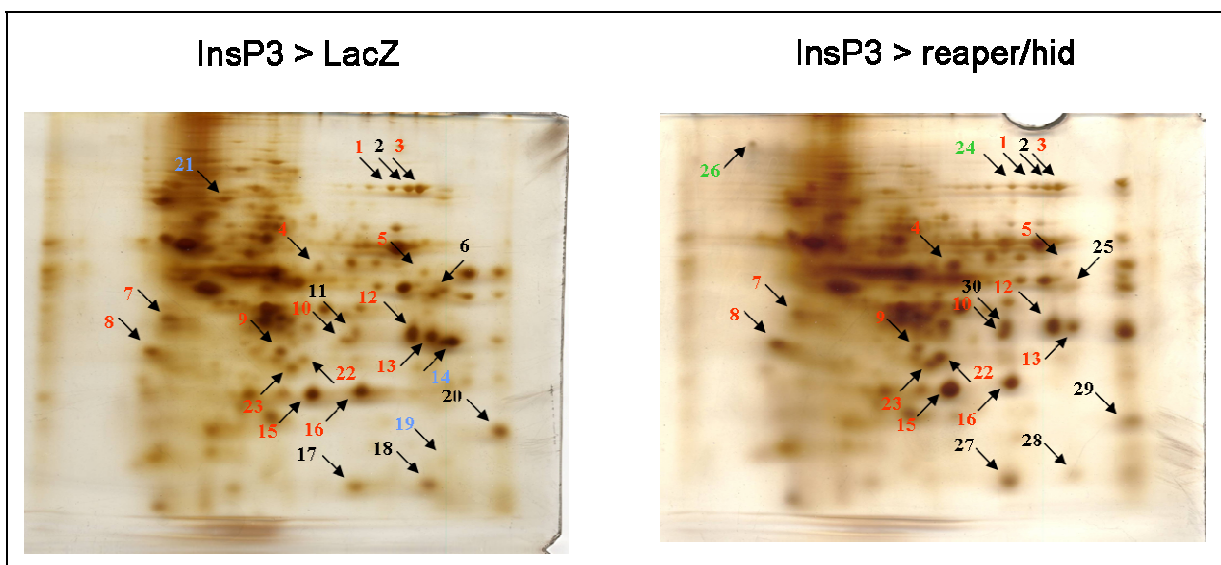


Abbildung 4.2-5: Silbergefärbte 2D Gele. Aufgetragen wurden 250 µg Protein. Die für die Massenspektrometrie ausgewählten Spots sind durch nummerierte Pfeile markiert. Die roten Zahlen repräsentieren die Spots, die auf beiden Gelen erkennbar sind und identische Proteine enthalten. Schwarze Zahlen stehen für Proteine, die gematched, aber als unterschiedliche Proteine identifiziert wurden. Proteine, die nur auf einem der beiden Gele gefunden werden konnten, sind blau (LacZ) oder grün (reaper/hid).

Auffallend war, dass nur wenige Spots identifiziert werden konnten, die nur auf einem von beiden Gelen zu finden waren oder eine starke Regulation aufwiesen. Dazu zählten die Spots 4, 13 und 14 (s. Tabelle 4.2-2). Spot 4 (Phosphoglycerate Kinase (PgK)) zeigte in IPC defizienten Fliegen einen starken Anstieg des Proteinlevels. Es

## Ergebnisse

handelte sich dabei um ein Protein, das 1,3-Bisphosphoglycerat in 3-Phosphoglycerat umwandelt und damit ATP aus ADP bildet. Dieser Schritt ist als einziger Schritt in der Glycolyse, bei dem ATP beteiligt ist, reversibel.

Spot	Protein Name	Protein MW [kDa]	PI	Anzahl Peptide	Score	Score (%)	MS-MS Score (%)
1	CG9244 - Mitochondrial aconitase	86,20	8,49	25	156,0	100,0	
2	Keratin, type II cytoskeletal 1 [human]	66,20	8,16	18	95,0	100,0	
3	CG9244 - Mitochondrial aconitase	86,20	8,49	16	64,0	98,8	
4	CG3127 - phosphoglycerate kinase	44,24	7,01	12	61,5	96,7	
5	CG3989-PA - ade5	47,71	8,31	16	100,0	100,0	
6	CG3881-PA, isoform A	38,12	8,94	12	69,0	99,4	
7	CG14792-PB, isoform B, stubarista	30,27	4,76	10	70,0	99,5	
8	CG8938-PA, isoform A, Glutathione S-transferase S1	27,65	4,57	11	130,0	100,0	99,8
9	-- keine eindeutige Identifizierung						
10	CG9914 - Enoyl-CoA hydratase (RH68464p)	34,94	7,63	12	85,0	100,0	
11	CG9916 - Cyclophilin 1 (SD01793p)	18,07 (?)	8,43	6	79,6	99,9	97,5
12	CG12055-PA, GAPDH I	35,50	8,26	18	200,0	100,0	96,3
13	CG8893-PA - GAPDH II (phosphorylating)	35,53	8,75	11	101,0	100,0	91,1
14	CG7998-PA - L-Malat Dehydrogenase activity	35,52	9,2	13	148,0	100,0	99,2
15	CG32954-PH, isoform H, alcohol dehydrogenase	27,83	6,9	15	138,0	100,0	
16	CG32954 Chain B, Alcohol Dehydrogenase	27,73	7,71	9	68,7	99,4	
17	-- keine eindeutige Identifizierung						
18	Keratin 10 [Homo sapiens]	59,02	5,09	16	87,2	99,7	
19	CG4696-PA, muscle protein 20	20,29	8,76	10	70,3	99,6	
20	Keratin 10 [Homo sapiens]	59,02	5,09	17	97,1	100,0	
21	CG8542-PA - hsc70-5	74,25	6,02	24	149,0	100,0	
22	CG6647-PB, isoform B - porin	30,53	6,44	19	180,0	100,0	
23	CG1721-PA - phosphoglycerat mutase	28,61	6,41	11	70,3	99,6	
24	CG9244 - Mitochondrial aconitase	86,20	8,49	15	55,6	87,2	
25	CG4233-PA - Glutamate oxaloacetate transaminase 2	43,95	8,60	12	61,5	96,7	
26	-- keine eindeutige Identifizierung						
27	CG2210 - awd (RH27794p)	17,22	7,82	7	48,9	40,1	
28	similar to DROME Cyp1 [Drosophila yakuba]	16,78	6,89	7	54,8	84,6	
29	CG4307-PA - Oscp	22,4	9,64	11	81,9	99,97	
30	CG12055 - GAPDH I	35,5	8,26	12	83,4	99,98	

Tabelle 4.2-2: Übersicht über ausgeschnittene und identifizierte Proteinspots der zweidimensionalen Gele aus Abbildung 4.2-5. PI: Isoelektrischer Punkt des identifizierten Proteins. Anzahl Peptide: Anzahl der Peptide, die mit Fragmenten der Datenbank übereinstimmen und zur Identifizierung benutzt wurden. Score: Mascot Score; Wert der angibt, ob eine zufällige Übereinstimmung vorliegt. Werte über 60 werden als nicht mehr zufällig angesehen. Ab 80 ist von einer 100 %igen Identifizierung auszugehen. Score (%) und MS-MS Score (%): Konfidenzintervall; Werte größer als 95 % werden als signifikant angesehen.



Spot 13 (GAPDH II) ist ebenfalls in der Glycolyse beteiligt und zeigte ein geringeres Proteinlevel in IPC defizienten Fliegen. Genauere Angaben zu Regulationsmechanismen oder einer möglichen Abhängigkeit von PgK und GAPDH II zu Insulin sind derzeit nicht publiziert. Es konnte daher keine Aussage getroffen werden, inwiefern eine mögliche Regulation von PgK oder GAPDH II durch Insulin erfolgen könnte.

Interessant war Spot 14, der nur bei InsP3 > LacZ Fliegen zu sehen war. Es handelte sich dabei um ein Protein, das bisher nur wenig untersucht wurde und zu dem nur wenige Daten vorhanden waren. Aufgrund von Sequenzhomologien wurde eine L-Malat-Dehydrogenase-Aktivität und eine Beteiligung am Malatmetabolismus und am Trikarbonsäurezyklus abgeleitet. Diese Daten machten CG7998 zu einem potentiellen Kandidaten für weitere Untersuchungen, da es sich um ein Protein handelte, das Bestandteil einer der wichtigsten Drehscheiben des Zuckerstoffwechsels, dem Trikarbonsäurezyklus, war. Nach einer genaueren Analyse der Gele zeigte sich allerdings, dass sich in der ersten Dimension des InsP3 > reaper/hid Gels im basischen Bereich von pH 9-10 eine Lücke bildete, die eine Auftrennung der Proteine in dieser Region verhinderte. Somit konnte nicht eindeutig geklärt werden, ob CG7998 bei InsP3 > reaper/hid tatsächlich reprimiert wurde. Die hier gefundenen Proteine waren alle nicht auffällig in der von Buch durchgeführten Genomanalyse. Das Auffinden von Regulationen auf Proteinebene könnte zusätzliche Daten liefern. Die Regulation von Transkripten erfolgt oftmals nicht in Korrelation zur Proteinregulation, so dass Unterschiede zwischen Genom- und Proteomdaten häufig festgestellt werden.

Von insgesamt 45 ausgeschnittenen Spots konnten 42 Proben einem spezifischen Protein zugeordnet werden. Zieht man die weniger signifikanten Proben und diese mit scheinbar unpassendem Molekulargewicht (z.B. Spot 11) ab, bleiben 40 Proteine übrig, die mit einem Konfidenzintervall von über 95 % identifiziert werden konnten. 89 % aller ausgeschnittenen Proteine wurden als eindeutig identifiziert eingestuft. Ein weiterer wichtiger Faktor, der mit diesem Experiment recht gut untersucht werden konnte, war das Zuordnen einzelner Spots auf unterschiedlichen Gelen (Matching). Es wurden je Gel 18 Spots ausgewählt und ausgeschnitten, die laut PDQuest

zueinander gehörten. Von diesen 18 Proben konnte bei 14 dasselbe Protein identifiziert werden. Dies bedeutete, dass bei 78 % die Zuordnung und Identifizierung erfolgreich war. Kontaminationen durch Keratin verhinderten die Zuordnung weiterer Spots. Die große Anzahl an Proben, die bei einem solchen Ansatz erforderlich sind und das Auftreten von Keratin in mindestens 3 Proben war Anlass, das bestehende Protokoll des Trypsinverdaus zu überdenken und nach Möglichkeiten zu suchen, eine schnellere Prozessierung zu erreichen und gleichzeitig die Kontamination durch Fremdproteine zu verringern.

### **4.2.3.2 Optimierung des Trypsinverdaus und Verringerung der Fremdkontamination**

Die Erfahrungen, des vorangegangenen Experimentes, führten zu weiteren Verbesserungen des Trypsinverdaus, die im Folgenden kurz erläutert werden sollen. Ziel der Verbesserungen war es, die Kontamination durch Keratin zu verringern. Gleichzeitig sollte eine Möglichkeit gefunden werden, den zeitintensiven Verdau im Hochdurchsatzverfahren zu etablieren.

Im Standardprotokoll des Trypsinverdaus erfolgte der Pufferwechsel durch einfaches pipettieren. Steigt die Anzahl der Proben auf über 20 an, so verdoppelte dieses Vorgehen die Dauer des Protokolls und somit auch gleichzeitig die Möglichkeit einer Kontamination. Für einen schnellen Pufferaustausch standen mehrere Möglichkeiten zur Verfügung:

#### 1) Die Verwendung von Vakuumpumpen in Verbindung mit Filtereinheiten

Wurden die Puffer mit Hilfe von Vakuumpumpen abgezogen, so führte die zusätzlich angesaugte Luft zu einer Erhöhung des Kontaminationsgrades. Gleichzeitig konnte festgestellt werden, dass durch Adhäsions- und Kohäsionskräfte oftmals ein kleiner Rest Puffer in der Filtereinheit zurück blieb.

#### 2) Verschiedene Zentrifugationstechniken

Auch hier zeigten die Filtereinheiten ähnliche Effekte. Ersetzte man den Filter durch Watte oder Stahlwolle, erhöhte sich erneut die Gefahr einer

Fremdkontamination durch die eingeführten Materialien. Eine schnelle, einfache und billige Methode wurde durch die Verwendung eines mit einer dünnen Kanüle gelochten 0,5 ml PCR-Reaktionsgefäßes erreicht. Die vorher zu Problemen führenden Kapillar-, Adhäsions- und Kohäsionskräfte verhinderten in diesem Fall das Auslaufen der Puffer durch das im Reaktionsgefäß existierende Loch. Durch Zentrifugation konnte so ein schneller Austausch erfolgen (vgl. Kap. 3.12.6). Da oftmals Verunreinigungen durch häufiges Öffnen und Schließen der Reaktionsgefäße entstehen, wurde darauf weitgehend verzichtet. Eine Abdeckung der Proben sollte allerdings trotzdem in Erwägung gezogen werden um Verunreinigung durch Staub zu verringern. Bei einer großen Anzahl von Proben kann dieses System sehr leicht auch auf 96-well Platten erweitert werden und ermöglicht so einen Hochdurchsatz-Verdau.

#### **4.2.3.3 Vergleich der Silber- und Coomassie Brillant Blau Färbung bei zweidimensionaler Gelelektrophorese**

Die Silberfärbung ermöglichte die Visualisierung und Identifizierung einer Vielzahl von Proteinspots, erschwert aber eine effektive Quantifizierung. Ziel dieses Experiments war es die Unterschiede zwischen Silber- und Coomassie Brillant Blau (CBB)-Färbungen genauer zu untersuchen. Die Proben wurden in der ersten Dimension auf 24 cm pH 3-10 Streifen fokussiert und anschließend über eine Distanz von 22 cm nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt.

Durch die Vergrößerung der ersten und zweiten Dimension konnte eine verbesserte Auflösung erreicht werden, d.h. die räumliche Trennung der einzelnen Proteinspots wurde erhöht. Die nötigen Geräte wurden mir freundlicherweise für diesen Versuch von der Abteilung Umweltmikrobiologie des Instituts für Technische Chemie Bereich Wasser- und Geotechnologie (ITC-WGT) des Forschungszentrum Karlsruhe zur Verfügung gestellt. Da die Silberfärbung empfindlicher ist als die Coomassie Brillant Blau-Färbung, wurden für diese Gele 250 µg Protein aufgetragen, während für CBB 350 µg Protein verwendet wurde. Abbildung 4.2-6 zeigte sehr deutlich die Vor- und Nachteile beider Färbemethoden. Die Coomassie Brillant Blau-Färbung war sehr gut

reproduzierbar und zeigte nur geringe Anzeichen von horizontalen und vertikalen Streifen, die eine Identifizierung der Proteinpunkte zusätzlich erschweren. Im Vergleich zur Silberfärbung waren allerdings immer noch deutlich weniger Spots zu identifizieren. PDQuest konnte ca. 950 Spots auf einem silbergefärbten Gel und ca. 700 Spots auf einem Coomassie gefärbten Gel detektieren.

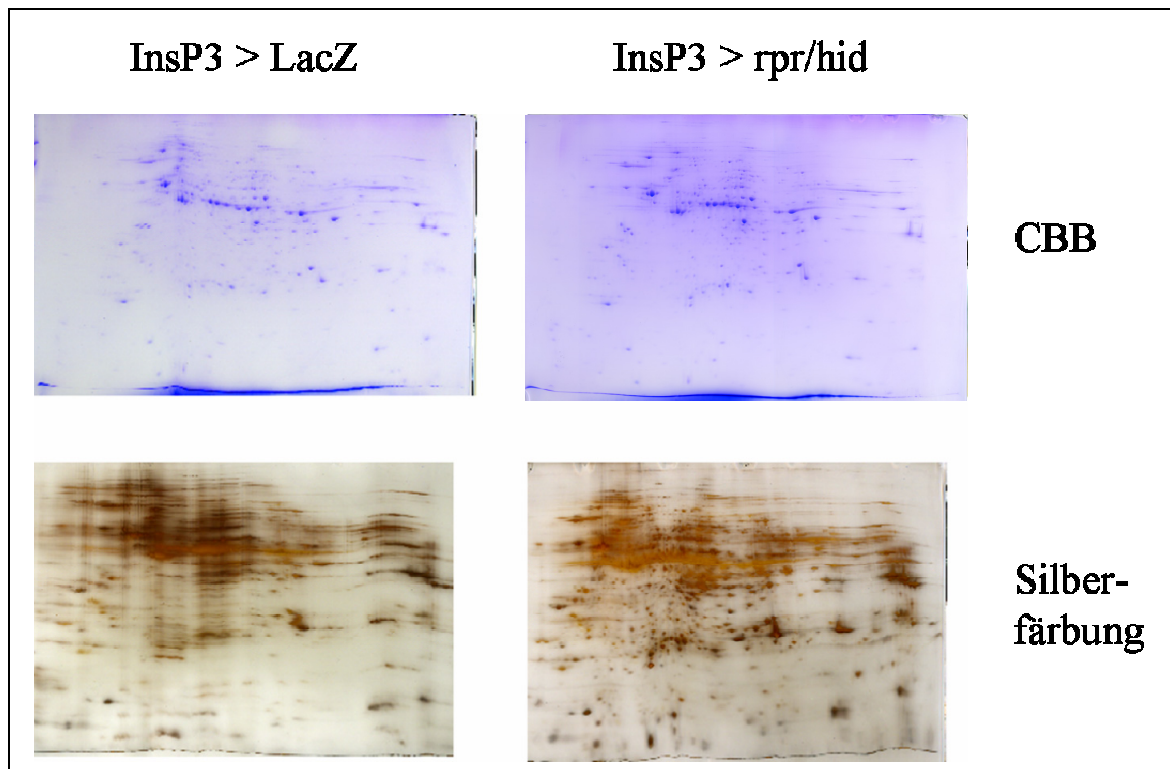


Abbildung 4.2-6: Vergleich verschiedener Färbetechniken. Die Proben wurden mit 24 cm Streifen in der ersten Dimension und 22 cm in der zweiten Dimension aufgetrennt. Visualisierung erfolgte mit Coomassie Brilliant Blau- und Silberfärbung. Die Lysate wurden aus 5 Tage alten adulten *Drosophila* Fliegen extrahiert, aufgereinigt und aufgetragen. Die Fokussierung erfolgte mit 86 kVh. Die erste Dimension verläuft von links (pH 3) nach rechts (pH 10). Die zweite Dimension von oben nach unten mit abnehmendem Molekulargewicht.

Theoretisch ist die Silberfärbung um Faktor 100 sensitiver. In diesem Fall wird der Faktor allerdings durch mehrere Bedingungen verringert. Zum einen verringert die Streifenbildung die Detektion zusätzlicher Spots. Zum anderen musste das Färbeprotokoll angepasst werden, um massenspektrometrisch kompatibel zu sein. Dadurch wurde die Silberfärbung noch einmal um Faktor 10 insensitiver. Die Reproduzierbarkeit war neben der Möglichkeit der Spotidentifizierung eine der

wichtigsten Faktoren, die eine erfolgreiche Analyse des Proteoms voraussetzte. Beim Vergleich der beiden silbergefärbten Gele miteinander wurde der größte Nachteil dieser Färbung deutlich. Beide Gele wurden parallel mit gleichen Lösungen gegossen, aufgetrennt und anschließend gefärbt. Die Unterschiede im Spotmuster waren allerdings beträchtlich und machten eine Zuordnung korrespondierender Spots in der anschließenden Analyse nur bedingt möglich. Gleichzeitig war durch die unterschiedlich starke Färbung eine Quantifizierung schwierig. Wurden dieselben Proben mit CBB gefärbt, so zeigte sich ein homogeneres Erscheinungsbild. Farbeintensität und Muster der Spots waren in beiden Gelen nahezu identisch, so dass korrespondierende Spots einfach zugeordnet und anschließend quantifiziert werden konnten. Die Anzahl der Spots war geringer als bei Verwendung der Silberfärbung, die Vorteile und Einfachheit der Handhabung überwogen diesen Nachteil allerdings bei Weitem. Die Analyse der Gele wurde daher mit Coomassie Brilliant Blau gefärbten Gelen durchgeführt und für anschließende Experimente CBB verwendet.

#### **4.2.3.4 Analyse der Coomassie gefärbten InsP3-Gele**

Die in Kapitel 4.2.3.3 beschriebenen Coomassie gefärbten Gele sollten nun näher untersucht werden. Die Analyse erfolgte computergestützt mit Hilfe des Programms PDQuest der Firma Applied Biosystems. Nach Identifizierung der jeweiligen Spots und Normalisierung erfolgte eine Quantifizierung aller Spots. Die Normalisierung geschah durch Abgleichung der Gesamtintensität aller zulässigen und identifizierten Spots eines Gels. Theoretisch war dieser Normalisierungsschritt auch bei silbergefärbten Gelen möglich. Durch den meist stark auftretenden Hintergrund und die schnelle Sättigung von Spots sind die Daten eines solchen Gels aber nur schwer zu interpretieren. Die Sättigung führte dazu, dass der Spots silbrig wurde und daher heller erschien. Die eigentliche Intensität (Grauwert des jeweiligen Spots) wurde so vom Programm fehlinterpretiert. Die Software machte es möglich, so genannte „Spotsets“ zu erstellen, d.h. es wurden Spots angezeigt und farblich hervorgehoben, die einem bestimmten Kriterium entsprachen. Standardmäßig wurde nach Spots

gesucht, die mehr als 2-fach reguliert waren. Die automatische Spoterkennung der verfügbaren Programme führte sehr häufig zu Artefakten und falsch-positiven Spots, die in einem anschließenden, manuellen Bearbeitungsschritt korrigiert werden mussten. Nach Ausschluss dieser Artefakte und falsch-positiven Spots zeigten sich keine signifikant regulierten Spots mehr. Dies war sehr überraschend, da angenommen wurde, dass eine Missregulation von Insulin einen drastischen Effekt auf Genom und Proteom haben würde. Allerdings decken sich die Ergebnisse der Proteom- mit denen der Genomanalyse und stärken so zusätzlich die bereits vorhandenen Daten. Letztendlich scheint die Ablation der IPC's keinen starken Einfluss auf den Organismus zu haben. Obwohl keine Spots signifikant reguliert waren, sollte untersucht werden, ob durch die Verwendung von CBB das Spotmatching oder die Spotidentifizierung durch massenspektrometrische Analyse beeinträchtigt wird. Aus diesem Grund wurden insgesamt 48 Spots ausgeschnitten und untersucht. Die Software konnte dabei 44 der 48 Spots einander zuordnen. Abbildung 4.2-7 gibt einen Überblick über korrelierende, ausgeschnittene und identifizierte Spots beider Gele, deren Analyse in Tabelle 4.2-3 zusammengefasst wurde.

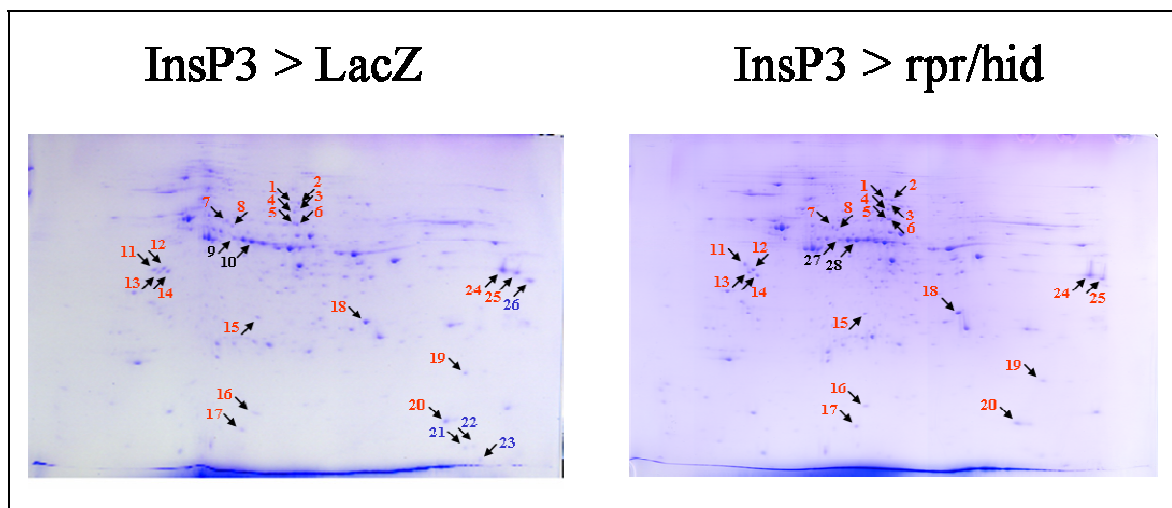


Abbildung 4.2-7: Coomassie gefärbte zweidimensionale Gele von InsP3 > LacZ und InsP3 > reaper/hid Fliegen. Die für die Massenspektrometrie ausgewählten Spots sind durch nummerierte Pfeile markiert. Die roten Zahlen repräsentieren Spots, die auf beiden Gelen erkennbar sind und identische Proteine enthalten. Schwarze Zahlen stehen für Proteine, die gematched, aber als unterschiedliche Proteine identifiziert wurden. Proteine, die nur auf einem der beiden Gele gefunden werden konnten, sind blau (LacZ) oder grün (reaper/hid).

Spot	Protein Name	Protein MW [kDa]	PI	Anzahl Peptide	Score	Score (%)	MS-MS Score (%)
1	CG17246-PC - Scs-fp (phosphorylating)	72,80	6,65	22	159,0	100,0	
2	CG17246-PC - Scs-fp	72,80	6,65	23	176,0	100,0	
3	CG5165-PA - Phosphoglucomutase	61,10	6,58	19	138,0	100,0	
4	CG10120-PA - malic enzyme	64,50	6,08	27	248,0	100,0	
5	CG2151-PA - Thioredoxin reductase-1	53,70	5,93	22	201,0	100,0	
6	CG7430-PA	53,30	6,41	22	200,0	100,0	97,3
7	CG5178-PA - Actin 88F	42,07	5,29	15	124,0	100,0	
8	CG4422-PA - GDI, GDP dissociation inhibitor	50,20	5,51	24	211,0	100,0	
9	CG2985-PA - yolk protein 1	48,70	7,19(?)	20	184,0	100,0	
10	CG2985-PA - yolk protein 1	48,70	7,19(?)	21	203,0	100,0	
11	CG4898-PJ - Tropomyosin 1	32,7	4,7	24	216,0	100,0	99,8
12	CG4843-PB - Tropomyosin 2	32,90	4,74	22	176,0	100,0	92,6
13	CG4843-PC - Tropomyosin 2	33,10	4,77	25	217,0	100,0	99,1
14	CG14792-PB - stubarista	30,2	4,76	11	89,0	99,9	87,7
15	CG1088-PA - Vha26, Vacuolar H <sup>+</sup> -ATPase subunit E	26,10	5,92	19	185,0	100,0	85,5
16	CG11793-PA - Sod, Superoxide dismutase	15,20	5,68	7	61,7	96,9	
17	GA10880 - homologue to ribosomal protein S12	14,80	6,56	7	63,2	97,8	
18	CG6647-PB - porin	30,50	7,79	22	240,0	100,0	99,9
19	CG2852-PA	22,18	8,69	15	143,0	100,0	
20	CG2210-PA - awd, abnormal wing discs	17,20	7,82	7	57,9	92,4	
21	CG3560-PA	13,60	7,82	13	114,0	100,0	
22	-- keine eindeutige Identifizierung	30,53	6,44	19	180,0	100,0	
23	CG11001-PA - FK506-binding protein	18,33	9,03	8	71,0	99,6	
24	CG12055-PA - GAPDH I	35,50	8,26	18	189,0	100,0	96,3
25	CG8893-PA - GAPDH II	35,53	8,75	17	157,0	100,0	
26	CG7998-PA - L-Malat Dehydrogenase activity	35,52	9,2	17	162	100	
27	CG2985-PA - yolk protein 1	48,70	7,19(?)	19	172,0	100	
28	CG2985-PA - yolk protein 1	48,70	7,19(?)	21	202	100	

Tabelle 4.2-3: Übersicht über ausgeschnittene und identifizierte Proteinspots der zweidimensionalen Gele aus Abbildung 4.2-7. PI: Isoelektrischer Punkt des identifizierten Proteins. Anzahl Peptide: Anzahl der Peptide, die mit Fragmenten der Datenbank übereinstimmen und zur Identifizierung benutzt wurden. Score: Mascot Score; Wert der angibt, ob eine zufällige Übereinstimmung vorliegt. Werte über 60 werden als nicht mehr zufällig angesehen. Ab 80 ist von einer 100 %igen Identifizierung auszugehen. Score (%) und MS-MS Score (%): Konfidenzintervall; Werte größer als 95 % werden als signifikant angesehen. Werte kleiner als 85 % wurden nicht eingetragen.

Von 48 Spots konnten 44 eindeutig identifiziert werden. Dies entsprach einer Erfolgsrate von 91 %. Dabei ist allerdings auffallend, dass bei mehreren Proben dasselbe Protein identifiziert wurde (Proben 9, 10, 27, 28) bei denen der angegebene isoelektrische Punkt weit vom realen Wert abwich. Ausgehend vom Gel sollte dieser bei ca. 5,5 liegen, wurde aber für das entsprechende Protein laut Datenbank mit 7,19

angegeben. Eine Fehlidentifikation konnte aufgrund der hohen Score bei allen vier Proben ausgeschlossen werden. Die Verschiebung der isoelektrischen Punkte musste also durch posttranslationale Modifikationen der Proteine hervorgerufen worden sein. Nahm man diese 4 Proteine in die Berechnung der Matching-Effizienz mit auf, so konnten von 44 korrelierenden Spots 42 eindeutig identifiziert und 21 Proteinen zugeordnet werden. Dies entspricht einer Effizienz von 95 %.

Damit konnte gezeigt werden, dass Coomassie gefärbte Gele eine fast ähnlich hohe Sensitivität wie silbergefärbte Gele aufwiesen. Sie sind sehr gut reproduzierbar und in Korrelation zu bringen. Spots mit gleichem Proteingehalt weisen bei Coomassie-Färbungen in der Regel eine vergleichbare Intensität auf und ermöglichen zusammen mit einer gleichmäßigen Färbung des Gesamtgels die Quantifizierung der Spots.

#### **4.2.4 Proteomanalyse von differenziell gefütterten *Drosophila melanogaster* Larven**

Nach anfänglichen Schwierigkeiten und Problemen, die durch die Verwendung der Silberfärbung und durch fehlende Ausrüstung bei der Analyse von differenziell gefütterten Larven auftraten, sollte dieser Ansatz erneut untersucht werden. Die Verwendung von Coomassie Brilliant Blau R250 als Farbstoff sollte eine Quantifizierung der Proteine durch die Software PDQuest ermöglichen und durch die Verwendung der Analysesoftware GPS Explorer 3.0 eine automatisierte und spezifische Identifizierung der ausgeschnittenen Proteine durch Kombination der Daten aus MALDI-ToF und Tandem-MS erreicht werden. Zusätzlich war es möglich, gleich große Gelstücke auszuschneiden und diese im Hochdurchsatzverfahren mit Trypsin zu verdauen. Damit waren nun die Voraussetzungen geschaffen, differenziell exprimierte Proteine verschieden gefütterter Larven zu identifizieren. Die Daten der ersten Versuche mit differenziell gefütterten Larven zeigten kaum Veränderungen des Proteoms bei einer vierstündigen Zuckergabe. Aus den bereits gewonnenen Mikroarray-Daten war bekannt, dass eine verlängerte Zuckernahrung eine stärkere Reaktion hervorruft. Die Zahl der regulierten Gene stieg dabei von 176 nach 4 h auf 437 nach 12 h an. Ein solcher Effekt sollte sich sehr wahrscheinlich auch im Proteom



bemerkbar machen. Die Dauer der Zuckerfütterung wurde für die Proteomanalyse daher auf 16 h erhöht. Das Alter der Larven blieb dabei weiterhin bei 48 h. Die für die großen 2D Gele (24 cm IEF) benötigten Gerätschaften waren zu diesem Zeitpunkt nicht verfügbar, so dass auf eine kleinere erste Dimension (11 cm IEF) zurückgegriffen werden musste. Die Auflösung verringerte sich dadurch merklich. Abbildung 4.2-8 gibt einen Überblick über korrelierende, ausgeschnittene und identifizierte Spots, die in Tabelle 4.2-4 zusammengefasst sind.

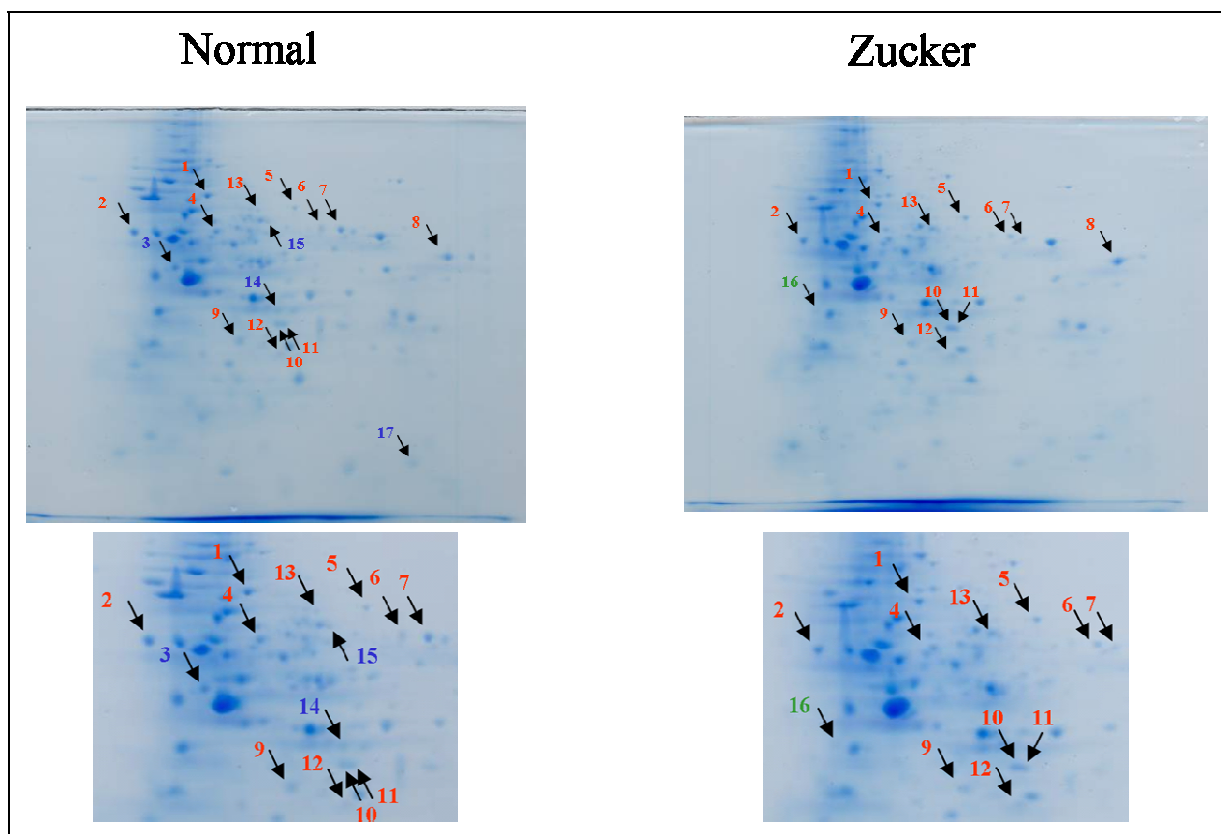


Abbildung 4.2-8: Referenzgele der Coomassie gefärbten zweidimensionalen Gele von normal- und zucker gefütterten Larven. Gezeigt sind Gesamtgelübersicht und eine Vergrößerung des zentralen Bereichs. Die für die Massenspektrometrie ausgewählten Spots sind durch numerierte Pfeile markiert. Die roten Zahlen repräsentieren Spots, die auf beiden Gelen erkennbar sind und identische Proteine enthalten. Schwarze Zahlen stehen für Proteine, die gematcht, aber als unterschiedliche Proteine identifiziert wurden. Proteine, die nur auf einem der beiden Gelen gefunden werden, konnten sind blau (Normal) oder grün (Zucker).

## Ergebnisse

Spot	Protein Name	Protein MW [kDa]	PI	Anzahl Peptide	Score	Score (%)	MS-MS Score (%)
1	CG9468-PA-1	115,38	5,25	26	277	100,00	
2	CG9429-PA - Calreticulin	47,12	4,4	17	129	100,00	
3	CG9468-PA-2	115,38(?)	5,25	16	127	100,00	
4	CG8983-PA - ERp60	55,68	5,62	19	139	100,00	
5	CG8036-PC	68,67	6,66	29	245	100,00	79,8
6	CG5320-PA - Gdh, Glutamate dehydrogenase	62,79	8,26	20	118	100,00	
7	CG5320-PF - Gdh, Glutamate dehydrogenase	61,34	8,44	23	158	100,00	
8	CG8280-PA - EF-1- $\alpha$ 48D	50,56	9,14	12	80	99,96	
9	CG1803-PB - Regucalcin	33,68	6,02	16	147	100,00	84,8
10	CG5177-PA	31,29	6,63	17	119	100,00	
11	CG10160-PA - Ecdysone-inducible gene L3	35,80	6,6	12	83	100,00	
12	CG1721-PA - Pglym78, Phosphoglyceratmutase	28,61	6,41	10	83	99,9811	
13	CG10120-PA - malic enzyme	85,23	6,82	28	214	100,00	98,7
14	CG11654-PA - Adenosylhomocysteinase at 13	47,90	5,82	13	91	100	
15	CG6309-PA (CG31075-PA)	52,86	6,22	19	153	100	
16	CG10287-PA - Gasp	29,37(?)	4,73	12	90	100,00	
17	CG4696-PA, muscle protein 20	20,26	8,76	13	134	100,00	

Tabelle 4.2-4: Übersicht über ausgeschnittene und identifizierte Proteinspots der zweidimensionalen Gele aus Abbildung 4.2-8. Beschreibung siehe Tabelle 4.2-3

Die Analyse der Gele und die anschließende Identifizierung der Proteinspots zeigte, dass mehrere Proteine unter Zucker reguliert wurden. Dieser Effekt konnte in einer Wiederholung für die meisten Proteine bestätigt werden. Von insgesamt 14 Proteinen, die aufgrund einer visuellen Überprüfung der Gele eine Regulation vermuten ließen, zeigten 9 Proteine eine mehr als 2-fache Induzierung oder Reprimierung. Dabei enthalten waren auch Proben, die nur auf einem von beiden Gelen detektiert werden konnten. Auffallend war bei der Überprüfung der Daten, dass eine Akkumulation von regulierten Proteinen in bestimmten Stoffwechselwegen zu beobachten war (vgl. Tabelle 4.2-5). Von 9 signifikant regulierten Proteinen konnten 4 zum Zuckerstoffwechsel, 2 zum Proteinstoffwechsel und 1 Protein zu beiden Stoffwechselwegen zugeordnet werden. Bei den von Zinke et al. durchgeführten Mikroarray Experimenten konnte ebenfalls eine Häufung in diesen beiden Stoffwechselwegen beobachtet werden (Zinke, 2002).

Protein	Score	Mikroarray Daten		2D Gele	Funktion und beteiligte Stoffwechselwege
		4h	12h		
CG4696-PA, muscle protein 20	134	nc	2	S	Zelladhäsion; Muskel-kontraktion; -entwicklung
CG9468-PA-2	277	-4	-9	N	Kohlenhydratmetabolismus, lysosomale $\alpha$ -Manosidase
CG8280-PA - EF-1- $\alpha$ 48D	81	nc	1,1	6,13	Proteinbiosynthese; Transkriptions-regulation, -elongation
CG1721-PA - Pglym78	60	nc	nc	4,90	Glycolyse
CG10287-PA - Gasp	91	nc	-1,7	4,06	Chitinmetabolismus
CG1803-PB - Regucalcin	147	nc	nc	2,55	Kalziumabhängige Signalübertragung
CG10160-PA – ImpL3	61	-3	nc	2,16	Glykolyse, Trikarbonsäurezyklus-intermediär-Stoffwechsel
CG5177-PA	119	nc	nc	1,84	Disaccharid Stoffwechsel, Trehalose Biosynthese
CG8036-PC	204	2,00	3,1	1,38	Pentosephosphatweg
CG10120-PA - malic enzyme	178	2,3	1,3	1,27	Malat Stoffwechsel, Trikarbonsäurezyklus
CG11654-PA - Ahcy13	91	nc	-1,4	1,21	C1-Stoffwechsel; Purinbasenstoffwechsel
CG8983-PA – Erp60	139	-3,70	-7,4	-1,11	Elektronentransport, Protein-faltung und Modifizierung
CG6309-PA (CG31075-PA)	153	-5,3	-17,9	-2,46	Aminosäure und Pyruvat Stoffwechsel
CG5320-PF – Gdh	118	nc	nc	-3,20	Glutaminsäure Katabolismus

Tabelle 4.2-5: Liste regulierter Proteine aus Abbildung 4.2-8. S: Proteinspot nur im Zuckergel detektiert. N: Proteinspot nur im Normalgel detektiert. Mit roten Zahlen markierte Proteine sind nicht signifikant (weniger als 2-fach) reguliert. Die Farbkodierung zeigt die Zugehörigkeit der Proteine zu Zuckerstoffwechsel (grün) bzw. Proteinstoffwechsel (blau) an. nc: keine Regulation

Ein Vergleich der Genomdaten mit den Proteomdaten zeigte, dass in einigen Fällen die Regulation vergleichbar war (CG9468, CG6309). Oftmals war zu beobachten, dass keine Regulation innerhalb des Transkriptoms festgestellt werden konnte, die Proteine aber sehr wohl reguliert wurden (CG8280, CG 10287, CG5320). Die Stärke der Proteinregulation ist im Vergleich mit den Mikroarray-Daten, die Maximalwerte von bis zu 45-facher Änderung der Transkription erreichten, mit maximal 6-facher Induktion nur gering.

Eine Interpretation der vorhandenen Daten ist derzeit relativ schwer. Da nur wenige Daten existieren, kann keine direkte Aussage über beteiligte Signalwege getroffen werden. So sind erste Hinweise und mögliche Kandidaten vorhanden, diese müssen aber in weiteren Experimenten durch zusätzliche Ergebnisse gestützt werden.

Die Massenspektrometrie ist dabei ein wichtiger Helfer und ermöglicht erst die genaue Identifizierung beteiligter und interessanter Proteine. Neben der Identifizierung von Proteinen kann die Massenspektrometrie auch helfen, Veränderungen von Metaboliten zu untersuchen und aufzuspüren. Nachdem die

Massenspektrometrie am Institut etabliert wurde, sollten nun auch Metabolomik-Analysen durchgeführt werden.

### 4.2.5 Glycinbestimmung in *pumpless* Larven

Die *ppl* Mutante wurde bei einer Suche nach Larven mit Fressdefekten isoliert (Zinke et al., 1999). Die Mutante betrifft ein Gen, das ein Homolog zu einer Untereinheit des Glycin-Spaltsystems von Vertebraten ist. Dieses Enzym ist verantwortlich für den Abbau von freiem Glycin. Die Larven zeigen circa 36 h nach Eiablage die ersten Anzeichen des Phänotyps. Die Nahrung wird nicht mehr geschluckt und akkumuliert im Pharynx. Gleichzeitig beginnen die Larven das Futter zu verlassen und umherzuwandern. Es wurde angenommen, dass durch die Mutation eine Anreicherung von Glycin in der Hämolymphe entstand und somit zur Ausbildung des Phänotyps führte. Eine Fütterung mit hohen Dosen Glycin führte ebenfalls zur Ausbildung des Phänotyps und einer dosisabhängigen Verzögerung der Verpuppung (Zinke et al, 1999). Aufgrund dieser Daten wurde die Hypothese aufgestellt, dass es ein Aminosäure-abhängiges Signal aus dem Fettkörper gibt, welches dem Gehirn das Beenden der Nahrungsaufnahme übermittelt.

Zur Verifizierung der Annahme, dass *pumpless* zu einem Anstieg von Glycin in der Hämolymphe führt, sollte mit Hilfe der Massenspektrometrie der Hämolymphe-Glycingehalt von Wildtyp und *pumpless* Mutanten gemessen werden. Es wurden Hämolympheproben von 36 h und 48 h alten Larven entnommen und mit Elektrospray-Ionisations-Massenspektrometrie (ESI-MS) untersucht. Als interner Standard wurde den Proben vor der Messung ein Glycinisotop (Gly-C13,N15) zugesetzt, das parallel gemessen wurde und zur Normalisierung diente. Die eigentliche Normalisierung des Aminosäuregehalts erfolgte über die Messung mehrerer Aminosäuren und der daraus resultierenden Gesamtaminosäuremenge. Verglichen wurden neben Glycin, Alanin, Arginin, Histidin und Prolin. Gemessen wurde an einem API365 von Applied Biosystems, das vom ITC-WGT des Forschungszentrums Karlsruhe zur Verfügung gestellt wurde. Die Messungen wurden

von Dipl. Ing. Michael Nusser durchgeführt, der mir bei diesem Projekt freundlicherweise behilflich war.

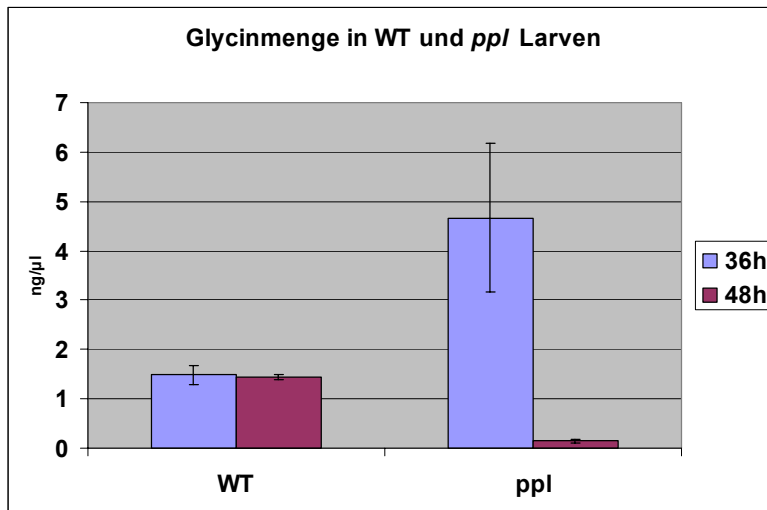


Abbildung 4.2-9: Kinetik des Glycintiters in Wildtyp und *ppl* Larven

Abbildung 4.2-9 macht deutlich, dass tatsächlich ein Effekt auf den Glycintiter durch die Mutation von *pumpless* auftritt. Im Alter von 36 h, also zum Zeitpunkt, zu dem die ersten Phänotypen auftauchten, stieg der Glycingehalt in der Hämolymphe um ca. das 5-fache an. Dies könnte also tatsächlich der Auslöser für das Wanderverhalten und den beobachteten Fressdefekt sein. Überraschend war allerdings das fast vollständige Verschwinden von Glycin im Alter von 48 h.

## 5 Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurde ein System etabliert, das die proteomweite Analyse von Expressionsänderungen in der Fruchtfliege *Drosophila melanogaster* ermöglicht. Dazu war es nötig, neue Techniken einzuführen und zu optimieren. Ziel war es, mit Hilfe von zweidimensionaler Gelelektrophorese und Massenspektrometrie die Proteome unterschiedlich gefütterter Larven zu untersuchen und zu vergleichen. Die erhaltenen Daten sollten anschließend mit bereits vorhandenen Mikroarray-Daten verglichen und auf Korrelationen überprüft werden. Die Proteinanalyse ist eine seit mehreren Jahrzehnten existierende und weit verbreitete Technik, deren Analysemethoden kontinuierlich verbessert und neue Technologien entwickelt wurden. Trotzdem haben diese Techniken Limits, welche die Beantwortung vieler Fragestellungen weiterhin erschweren (Abschnitt 5.5).

In den Mikroarray-Analysen von Zinke et al. (Zinke, 2002) wurde gezeigt, dass *sugarbabe* nach einer Stunde das am stärksten regulierte Gen war. Es war daher interessant herauszufinden, welche Faktoren auf *sug* wirken und eine so starke Reaktion hervorrufen. Ausgehend von unterschiedlichen Nahrungsbedingungen wird eine Signalkaskade aktiviert, die zur Expression von *sugarbabe* führt. Als wahrscheinlichster Auslöser dieser Kaskade gelten hohe Kohlenhydratkonzentrationen in der Nahrung.

In Frage kommen folgende Signalwege:

- 1) Insulinsignalweg (ISW)
- 2) Ein vom ISW unabhängiger Signalweg
- 3) Ein mit dem ISW verknüpfter Signalweg

In dieser Arbeit konnten erste Hinweise auf mögliche Signalwege und beteiligte Komponenten erarbeitet werden. Bis zur endgültigen Aufklärung aller beteiligter Elemente wird aber noch einige Zeit vergehen.

## 5.1 Regulation von *sug* durch Komponenten des Insulin-Signalweges

Eine der Aufgaben von Insulin und dessen Signalkaskade ist die Anpassung des Metabolismus an unterschiedliche Nahrungsbedingungen. Bei *sugarbabe* handelt es sich um einen Transkriptionsfaktor, der in Abhängigkeit von Zucker stark reguliert wird. Ein direkter Zusammenhang zwischen Insulin-Signalweg und *sugarbabe*-Regulation wäre sehr gut denkbar. Im Rahmen dieser Arbeit sollte der Insulin-Signalweg an einer möglichst frühen Stelle innerhalb der Signalkaskade unterbrochen und die Expression von *sug* untersucht werden.

Es konnte bewiesen werden, dass *chico*-Mutanten keinen Einfluss auf die Regulation von *sug* zeigten. Wurde den Larven Zucker gefüttert, blieb das Expressionslevel unverändert hoch. CHICO ist direkt mit dem Insulinrezeptor (InR) verknüpft und vermittelt die Aktivierung durch Insulin an die folgende Signalkaskade. Es scheint daher unwahrscheinlich, dass eine direkte Verbindung zwischen Insulin-Signalweg und *sugarbabe*-Signalweg existiert. Eine später im ISW abzweigende Signalkaskade kann derzeit aber nicht komplett ausgeschlossen werden, da bisher noch zu wenige Komponenten des ISW untersucht wurden. Problematisch ist, dass viele Mutanten des Insulin-Signalweges im homozygoten Zustand frühzeitig letal sind und im heterozygoten Zustand ein nur gering vermindertes Expressionslevel des jeweiligen Gens aufweisen. Der Signalweg wird meist als lineare Kaskade dargestellt, die an vielen Stellen Abzweigungen zu anderen Signalwegen besitzt. Es ist allerdings nicht auszuschließen, dass ein „Shuttle-System“ das Signal des InR an Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI3K) weiterleitet und CHICO somit umgeht. Später in der Kaskade liegende Gene könnten so immer noch eine Wirkung auf *sugarbabe* haben. Die schnelle Induktion der *sug*-Transkription durch Zucker ist allerdings ein Argument gegen eine Regulation durch später in der Signalkaskade gelegenen Komponenten. Vermutlich wird *sug* durch einen vom Insulin-Signalweg abgekoppelten aber verwandten Signalweg reguliert. Ein Kandidat für die Regulation von *sugarbabe* war *slbo*.

## 5.2 *akh* Expression bei zuckergefütterten Larven

Wie in Abbildung 4.1-6 bereits gezeigt, erfolgte unter Zucker ein Anstieg der *akh*-Expression. Dieses Ergebnis ist sehr überraschend. Als funktionelles Homolog zum Säugetier-Glucagon (Van der Horst, 2003) sollte es nur bei einer Hypoglykämie oder proteinreicher Nahrung ausgeschüttet werden, um den Glucosegehalt des Blutes oder der Hämolymphe zu erhöhen. Durch zuckerreiche Nahrung sollte eine solche Situation allerdings nicht auftreten, so dass diese Kinetik erst einmal widersprüchlich erscheint. Eine mögliche Erklärung wäre eine korrelierte Reaktion durch ein starkes Ansteigen der *dilp*-Expression, die durch die Ausschüttung hoher Mengen an Insulin nach einer gewissen Zeit zu einer Hypoglykämie-ähnlichen Situation führen kann. Als Folge würde die *akh*-Expression ebenfalls induziert.

## 5.3 *akh* als negativer Regulator der *sugarbabe* Expression?

In Kapitel 4.1.3 wurde bereits beschrieben, dass es sich bei *akh* um ein blutzuckererhöhendes Hormon handelt. Die *akh*-ausschüttenden Zellen der Corpora-cardiaca stehen in engem Kontakt zu den Insulin-produzierenden Zellen und regulieren so gemeinsam den Hämolymphezuckerspiegel. Abbildung 4.1-7 zeigt, dass unter Zucker keine Missregulation von *sugarbabe* durch die Zerstörung der *akh*-produzierenden Zellen erfolgt. In Hefe gefütterten *akh*-defizienten Larven ist die *sugarbabe*-Expression allerdings 6-fach erhöht im Vergleich zum Wildtyp. Dies bedeutet, dass *akh* unter normalen Bedingungen (Hefe) einen negativen Effekt auf *sugarbabe* ausübt. Durch die Zerstörung der *akh* Zellen wird dieser Block aufgehoben und die *sug* Expression erhöht sich. Die Funktion von *akh* ist die Erhöhung des Lipid- und Trehalosegehalts der Hämolymphe, sollten diese durch energieverbrauchende Prozesse zu stark absinken (Orchard, 1987). In *Locusta migratoria* konnten zwei adipokinetische Hormone isoliert werden, die je eine der beiden oben beschriebenen Funktionen übernahmen. In *Drosophila* konnte bisher nur ein AKH Protein identifiziert werden, jedoch scheint es wahrscheinlicher, dass auch hier zwei verschiedene Proteine vorhanden sind. Als Homolog zu Glucagon sollte eine niedrige Glucosekonzentration in der Hämolymphe zur Aktivierung von *akh* und damit zu



einem Abbau von Lipiden und Glycogen im Fettkörper führen. Gleichzeitig blockt *akh* die *sugarbabe*-Expression. Die Reprimierung von *sug* bewirkt eine erhöhte Aktivität der durch *sug* reprimierten Lipasen, wodurch zusätzliche Triacylglyceride über die Darmwand aufgenommen werden können. Unter Zucker wird *akh* gehemmt und der Block von *sug* aufgehoben. Die große Menge an verfügbarem Zucker macht die Aufnahme und Verwertung von Lipiden bzw. deren Abbau im Fettkörper überflüssig. Die Stärke der beobachteten Veränderung der *sug* Expression in *akh*-defizienten Larven zeigt, dass *akh* nicht allein für die Regulation verantwortlich sein kann.

#### 5.4 *Slbo* ist an der Regulation von *sug* beteiligt

Die C/EBP-Transkriptionsfaktor-Familie gehört zu einer Klasse von DNS-Bindungsproteinen mit Namen bZIP-Proteine (Vinson et al., 1989). Diese Proteine sind durch ihre basische Leuzinzipper-Struktur und der danebenliegenden DNS-Bindungsregion, beides am C-Terminus des Proteins, charakterisiert (Abbildung 5.4-1).

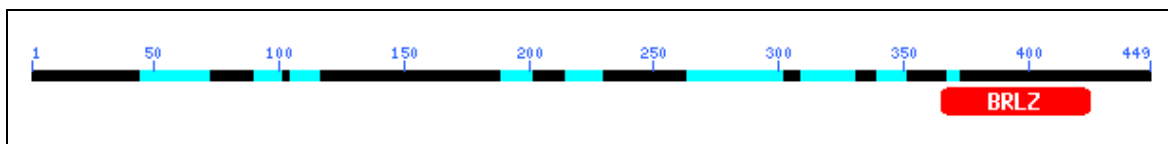


Abbildung 5.4-1: Konservierte Domänen von CG4354 (*slbo*). Gezeigt ist die gesamte Länge des Proteins von 449 Aminosäuren. Die identifizierten Domänen sind rot unterlegt. Die Sequenzdatenbanksuche wurde mit NCBI Blast durchgeführt. BRLZ = basic region leucine zipper (Basische Region Leuzinzipper)

Die Transaktivierung der Genexpression erfolgt durch Bindung an das cis-Element, die CCAAT-Sequenz (Wedel et al., 1995). Die Familie der C/EBP-Transkriptionsfaktoren besteht aus insgesamt sechs Mitgliedern. Dazu zählen C/EBP  $\alpha$  (C/EBP), C/EBP  $\beta$  (NF-IL6), C/EBP  $\gamma$  (Ig-EBP), C/EBP  $\sigma$  (NF-IL-6 b), C/EBP  $\varepsilon$  (CRP-1) und C/EBP  $\xi$  (CHOP) (Vinson et al., 1993). Die Zielgene der C/EBP-Familienmitglieder sind sehr mannigfaltig und in eine Vielzahl verschiedener Prozesse involviert. So sind zum Beispiel Gene im Metabolismus, Zellzyklus, Wachstumskontrolle (Wang, 2001), Hämatopoese, Lipogenese, Immunsystem und

bei Krebs beteiligt (Vinson et al., 1993). Das *Drosophila*-Homolog der C/EBP-Familie ist *slbo* (Slow Border Cells) und wurde 1992 von Montell (Montell, 1992) erstmals beschrieben. Die höchste Homologie weist dabei C/EBP  $\alpha$  auf. Die Leuzinzipper-Struktur der Säugetiere ist weniger konserviert als die basischen Regionen. Während die Leuzinzipper-Domäne von *slbo* nur eine Identität von 26 % zum Säugetier C/EBP aufweist, sind 76 % der basischen Region identisch (Fassler, 2002). Vertebraten C/EBP bindet die jeweilige DNS-Sequenz mit einer circa 20 Aminosäure langen basischen Region. Der Leuzinzipper ist für die Dimerisierung verantwortlich, zeigt aber bei SLBO nur eine geringe Homologie zum Säugetier C/EBP. Es ist zu vermuten, dass entweder keine Dimerisierung von SLBO stattfindet oder andere Proteine binden, als dies bei C/EBP der Fall ist. Im N-terminalen Bereich fällt eine Strecke von 23 Glutaminen auf, die durch eine opa (CAG/A)-Wiederholung codiert wird (Montell, 1992). Es wird angenommen, dass Glutaminwiederholungen eine Möglichkeit darstellen essentielle Transkriptionsfaktoren zusammenzuführen, die entfernt voneinander an der DNS binden. Da die Expression von *sugarbabe* durch den Knock-out von *slbo* nicht vollständig reprimiert wird und gleichzeitig immer noch eine Aktivierung der Transkription durch Zucker erfolgt (118-fache Induktion unter Zucker nach 20 h), ist davon auszugehen, dass zusätzliche Transkriptionsfaktoren oder Proteine an der Regulation beteiligt sind. Denkbar wäre in diesem Zusammenhang ein Komplex aus mehreren Proteinen, die zusammen mit SLBO zur Aktivierung von *sug* führen.

Eine Kooperation von SLBO mit weiteren Proteinen, die zur Aktivierung der Transkription von Zielgenen führt, konnte durch Liu (Liu, 2001) gezeigt werden. Ein möglicher Partner von SLBO könnte JING, ein Zinkfinger Protein sein. Vergleichbare Phänotypen lassen vermuten, dass beide Proteine in einem gemeinsamen Signalweg agieren. *jing* konnte als Zielgen von SLBO identifiziert werden. Ergebnisse der Homologen AEBP2 (JING) und C/EBP (SLBO) in der Maus zeigten, dass beide Proteine an das gleiche Enhancer-Element des Adipozyt P2 Gens (He et al., 1999) binden konnten. Es ist davon auszugehen, dass ähnliche Parallelen auch in *Drosophila* existieren, so dass eine Interaktion von SLBO und JING zur Aktivierung bestimmter Zielgene, wie *sugarbabe* angenommen werden kann.

Sicher ist zurzeit, dass *akh* unter normalen Bedingungen *sug* reprimiert, für die Aktivierung durch Zucker aber nicht zwingend notwendig ist. SLBO ist seinerseits bei der Induktion durch kohlenhydratreiche Nahrung beteiligt, aber nicht allein für die starke Expression von *sug* verantwortlich. Daher sind zusätzliche Faktoren und Signalwege sehr wahrscheinlich involviert. Diese Regelmechanismen aufzuklären, wird ein wichtiger Schritt zu einem umfangreichen Verständnis der zuckerinduzierten Aktivierung von *sugarbabe* sein. Abbildung 5.4-2 zeigt eine mögliche Regulation von *sug* in Abhängigkeit der Hämolymphe-Zuckerkonzentration unter Einbeziehung der gewonnenen *akh*- und *slbo*-Daten (Kapitel 5.3 und 5.4).

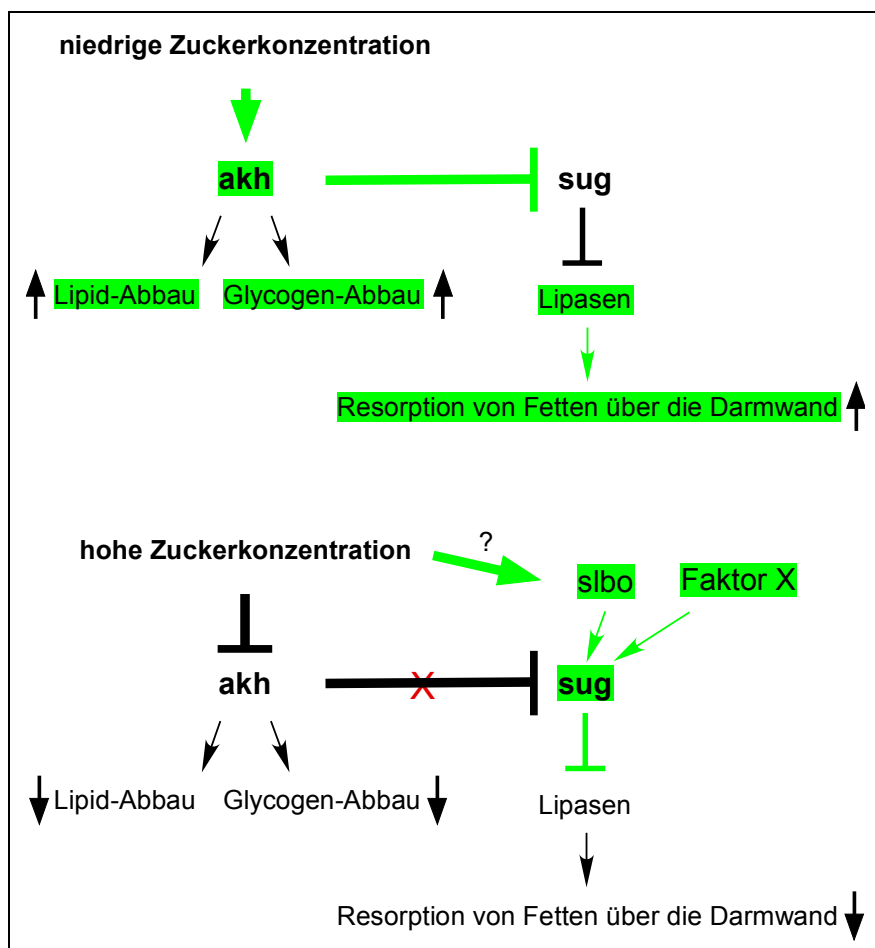


Abbildung 5.4-2: Modell der mit *sug* in Verbindung stehenden Signalwege. Beschreibung siehe Text. Grün eingezeichnete Elemente stehen für aktive Komponenten. Das Fragezeichen beschreibt eine Abhängigkeit von *slbo* und hoher Zuckerkonzentration. Ein direkter Einfluss konnte bisher nicht gezeigt werden.

## 5.5 Einschränkungen der Proteomik

### 5.5.1 Die Sensitivität

Ein noch nicht gelöstes Problem stellt die Detektion und Identifizierung von Proteinen dar, die in sehr geringen Konzentrationen vorliegen.

Bei hochkomplexen Organismen, wie zum Beispiel *Drosophila melanogaster*, wird die Bestimmung bestimmter Proteine noch durch die Tatsache erschwert, dass tausende verschiedene Zelltypen mit unterschiedlichen Proteomen vorhanden sind. Die Identifizierung eines schwach exprimierten Proteins aus einer kleinen Population von Zellen ist nur mit großem Arbeitsaufwand zu bewerkstelligen. Man geht davon aus, dass die derzeit erreichbare Empfindlichkeit von massenspektrometrischen Techniken (MALDI-ToF: fmol) die Identifizierung von Proteinen erst ab einer Kopienzahl von mindestens  $10^4$  Kopien pro Zelle erlaubt.

Studien konnten zeigen, dass sich der Unterschied zwischen hoch exprimierten Proteinen und schwach exprimierten Proteinen über 8-12 Größenordnungen erstrecken kann (Anderson, 1998) (Corthals, 2000). So beträgt zum Beispiel der Konzentrationsunterschied zwischen Albumin und Glukagon im humanen Serum 9 Größenordnungen (Corthals, 2000). Vergleichbare Studien bei *Drosophila melanogaster* fehlen. Die meisten bisher veröffentlichten Publikationen beschreiben lediglich das Proteom verschiedener Kompartimente oder Organe, ohne auf die Quantität der identifizierten Proteine genauer einzugehen. Es kann aber davon ausgegangen werden, dass ähnliche Verhältnisse von stark und schwach exprimierten Proteinen auch in *Drosophila* vorliegen dürften. Eine Reihe von Studien in anderen Organismen hat gezeigt, dass bisher vor allem Proteine, die in höheren Konzentrationen vorliegen, in 2D-Gelen gefunden und identifiziert wurden. So wurden beispielsweise beim Hefe-Proteom-Projekt vor allem Proteine identifiziert, die als stark exprimiert galten (Gygi, 1999). Für über die Hälfte der 6 000 Hefe-Gene, die als weniger stark exprimiert galten, konnten die Proteine jedoch noch nicht nachgewiesen werden (Corthals, 2000).

### 5.5.2 Die Visualisierung – ein Flaschenhals der 2D basierten Proteomanalyse

Die Massenspektrometrie besitzt mittlerweile die Fähigkeit, Proteine auch noch im fmol Bereich zu detektieren. Allerdings ist diese Sensitivität nur in den wenigsten Fällen wirklich zwingend notwendig. Vielmehr beschränkt bereits die Visualisierung der Spots auf einem Gel die Identifikation weniger stark exprimierter Proteine durch die Sensitivität der Färbung. Für Proteomanalysen ist die Silberfärbung eine weit verbreitete Technik, da diese eine Nachweisgrenze von  $1 \text{ ng/mm}^2$  besitzt. Im Vergleich liegt die Grenze bei Coomassie Brilliant Blau R250 bei etwa  $100 \text{ ng} - 1 \text{ } \mu\text{g/mm}^2$ . Selbst die Silberfärbung liegt mit  $1 \text{ ng}$  noch weiter über der Detektionsgrenze aktueller MALDI-ToF-Geräte und verhindert so das Ausschöpfen des vollen Potentials. Es wird daher seit Jahren versucht, Methoden zu entwickeln, die nicht mehr auf 2D Gelen basieren bzw. die Detektion schwach exprimierter Proteine zu verbessern.

1997 wurde erstmals die zweidimensionale differenzielle Gelelektrophorese (2D-DIGE) (Unlu, 1997) beschrieben. Durch die Kopplung von Fluoreszenzfarbstoffen an die Proteine erreichte diese Technik eine Detektionsgrenze von  $0,5 - 2 \text{ ng/mm}^2$  bei einem linearen Arbeitsbereich von bis zu 6 Größenordnungen. Durch das Koppeln von verschiedenen Farbstoffen an unterschiedliche Proteinproben, anschließender gemeinsamer Auftrennung und Visualisierung konnten zudem Laufunterschiede, wie sie beim Lauf zweier Gele häufig auftreten, völlig eliminiert werden. Die in dieser Arbeit aufgetretenen Probleme (Sensitivität der Färbung, Matching der Gele und Quantifizierbarkeit der Spots) wären mit dieser Technik fast vollständig gelöst. Nachteil dieser Technik ist der hohe Anschaffungspreis für die Reagenzien und des benötigten Fluoreszenzscanners.

Einige Arbeitsgruppen arbeiten derzeit an einer Auftrennungsmethode, die komplett auf 2D Gele verzichtet. Bei diesen so genannten gelfreien Systemen erfolgt die Auftrennung über Flüssigkeitschromatographie und anschließender massenspektrometrischer Analyse. Zwar können dadurch die Limitationen der

gelbasierten Auftrennung umgangen werden, die Technik steht aber noch am Anfang und ist nicht vollständig ausgereift.

### **5.6 Der experimentelle Aufwand**

Der Aufwand, quantitative Proteomstudien durchzuführen, ist im Vergleich zu differentiellen mRNS-Studien immens. Wegen der begrenzten Proteinmenge, die auf ein Gel aufgetragen werden kann, und der Empfindlichkeit, mit der man Proteine identifizieren kann, sind für gründliche Studien Vorfraktionierungen, der zu analysierenden Proteingemische, sowie die Durchführung mehrerer isoelektrischer Fokussierungen mit überlappenden pH-Bereichen unerlässlich. Hierfür sind zusätzliche Geräte und Ausrüstung nötig, die oftmals sehr teuer und für kleinere Labors unerschwinglich sind. Da bisher weder die Durchführung der 2D-Gelelektrophorese selbst, noch die computergestützte differentielle Analyse der äußerst komplexen Proteinmuster voll automatisierbar sind, benötigen solche Analysen viel Zeit und sind äußerst kostenintensiv. Wünschenswert wäre daher eine Technologie, die es ermöglicht, differentielle Proteomstudien ähnlich effizient wie die auf RNS- oder DNS-Chips basierenden differentiellen mRNS-Analysen durchzuführen.

### **5.7 Proteomik und RNS basierende Technologien**

Die fehlende Möglichkeit, vorab determinierte Proteine gezielt im Gel zu identifizieren, ist eine weitere Einschränkung der zweidimensionalen Gelelektrophorese und der auf Massenspektrometrie beruhenden Identifizierung von 2D-Spots. Da selbst anhand der vollständigen Proteinsequenz das Laufverhalten eines Proteins im 2D-Gel nicht exakt vorhergesagt werden kann bzw. posttranslationale Modifikationen eine teils deutliche Verschiebung eines Proteins herbeiführen, muss erst eine Vielzahl von in Frage kommenden Spots ausgeschnitten und identifiziert werden. Dies ist ein sehr zeitaufwendiger und teurer Prozess. Bei kleinen Gelen mit geringer Trennstrecke in

den jeweiligen Dimensionen kann zudem eine Überlagerung durch ein Protein mit ähnlichem Laufverhalten die Identifizierung zusätzlich erschweren.

Aus diesem Mangel an direkter Adressierbarkeit folgt, dass es mittels klassischer proteomanalytischer Verfahren nicht ohne weiteres möglich ist, Ergebnisse differentieller mRNA-Analysen auf Proteom-Ebene zu überprüfen. Dies ist ein besonderes Dilemma, da differentielle mRNA-Analysen zwar sehr effektiv und viel schneller als differentielle Proteomanalysen durchzuführen sind, aber deren Ergebnisse nicht grundsätzlich auf die Proteinebene übertragen werden können (Anderson, 1997) (Gygi, 1999). So konnte bereits mehrfach gezeigt werden, dass die Korrelation zwischen mRNA Menge und tatsächlich exprimiertem Protein in bis zu 40 % der Fälle nicht vorhanden ist (Ideker et al., 2001). Abbildung 5.7-1 beschreibt ein weiteres Problem beim Vergleich von mRNA- und Proteomanalysen.

Bei einer Transkriptomanalyse mit Hilfe von Mikroarrays können derzeit mit den in unserem Labor hergestellten Chips circa 7 000 der insgesamt 18 000 Transkripte der Fruchtfliege *Drosophila melanogaster* detektiert werden. Dies entspricht einer Abdeckung von 40 %.

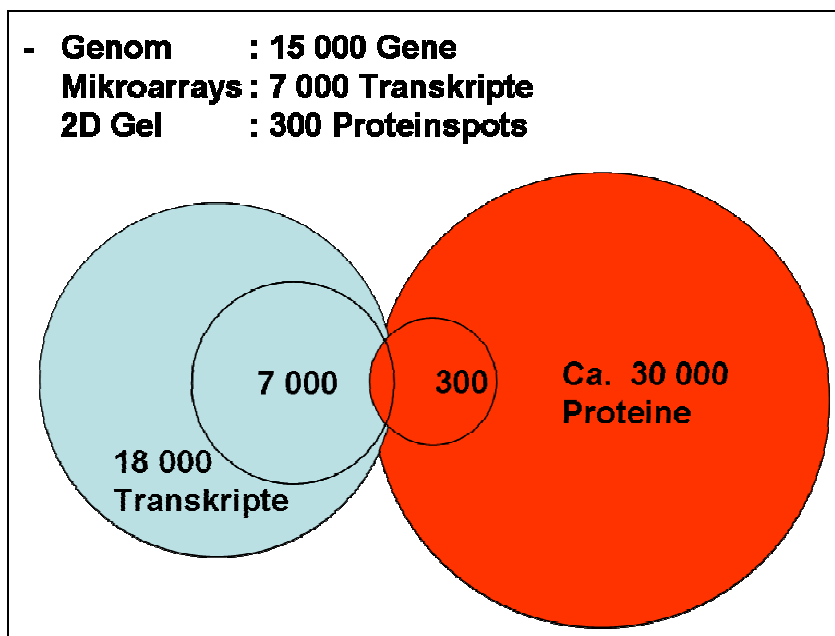


Abbildung 5.7-1: Limitierungen der verwendeten Analysemethoden

Geht man bei der Proteomanalyse von geschätzten 30 000 Proteinen in einer Zelle aus (manche Angaben gehen von bis zu 200 000 aus) so erreicht ein Coomassie gefärbtes Gel mit rund 300 detektierbaren Proteinspots gerade einmal eine Abdeckung von 1 %. Durch Verwendung von Fluoreszenzfarbstoffen könnte dieser Wert auf maximal 5 % gesteigert werden. Da, wie bereits erwähnt, circa 40 % der Proteine abweichend zu deren Transkripten exprimiert werden, ist ein direkter Vergleich und die Evaluierung der Mikroarray-Daten mit Hilfe von 2D-Gelelektrophorese nur schwer durchführbar. Vielmehr kann davon ausgegangen werden, dass die mit Hilfe von 2D und Massenspektrometrie gewonnenen Daten zusätzliche Informationen liefern, als bestehende zu verifizieren.

### **5.8 Validierung von Proteomdaten**

Die Validierung neuer Techniken ist besonders wichtig, bevor man den mit ihnen gewonnenen Daten Vertrauen schenken kann. Zahlreiche komplexe Technologien sind in den vergangenen Jahren für die Proteomanalytik entwickelt worden. Die meisten Untersuchungen basieren aber nach wie vor auf der Kombination von zweidimensionaler Gelelektrophorese zur Darstellung der Proteinmuster und Massenspektrometrie zur Identifizierung der Einzelkomponenten. Damit aber die Proteomik die in sie gesetzten Erwartungen erfüllen kann, bedarf es standardisierter Hochdurchsatzverfahren, die reproduzierbare, validierte Ergebnisse liefern. Die Vergleichbarkeit der in verschiedenen Labors mit unterschiedlichen Geräten gewonnenen Daten ist bisher kaum gegeben. In einer experimentellen Studie aus der Arbeitstagung 2005 „Mikromethoden in der Proteinchemie“ hatten die maßgeblichen Gerätehersteller von Massenspektrometern definierte, vorgegebene Proben mit 2D-Gelelektrophorese und MS analysiert. Keine der Analysen war vollständig und die Übereinstimmung der präsentierten Ergebnisse war bestürzend gering. Die Schnittmenge lag zwischen zwei guten Resultaten bei nur wenigen Prozent. Dies zeigt die auch heute noch existierende Problematik der Validierung von Proteomdaten. Während bei Mikroarrays die Daten durch RT – PCR relativ schnell und einfach zu überprüfen sind, existieren für die Überprüfung von



Proteinexpressionsänderungen keine effektiven Methoden. Einzig mit immunhistochemischen Methoden kann eine Kontrolle erfolgen. Dies wird aber durch die Verfügbarkeit von Antikörpern stark eingeschränkt und kann nur erfolgen, wenn das identifizierte Protein bereits charakterisiert und Antikörper verfügbar sind.

### **5.9 Vergleich von Daten der Proteom- und mRNS-Analyse differenziell gefütterter Larven**

Wie in Kapitel 4.2.4 gezeigt, konnten bereits mit diesem System zusätzliche Daten zur mRNS-Analyse generiert werden. Viele der identifizierten Proteine wiesen eine, zu den Mikroarray-Daten abweichende Regulation auf. Die dabei beobachteten Unterschiede von Transkriptom- und Proteomregulation machen deutlich, wie wichtig ein gemeinsamer Ansatz beider Techniken ist, um erfolgreich eine umfangreiche Analyse nahrungsabhängiger Effekte auf einen Organismus zu erhalten. Gerade die von den Transkriptomdaten abweichenden Ergebnisse geben zusätzliche Informationen über mögliche Regulations- und Steuermechanismen. Als Beispiel soll hier kurz auf CG8280 eingegangen werden. Das Gen zeigte keinerlei Veränderungen auf Transkriptionsebene. Das Protein wurde aber 6-fach hochreguliert und spielt für die Proteinbiosynthese selbst eine wichtige Rolle. Derzeit ist nicht eindeutig geklärt, ob die Hochregulation von CG8280-PA eine Aktivierung oder Deaktivierung bedeutet. Proteine werden häufig durch Phosphorylierung und anderen posttranslationalen Modifikationen in eine aktive oder inaktive Form überführt.

Durch die Aktivierung bzw. Deaktivierung eines Elongationsfaktors könnte beispielsweise die Translation weiterer Proteine reguliert werden. Es scheint daher sehr wahrscheinlich, dass hier eine nahrungsabhängige Regulation auf Proteinebene vorliegt, die unabhängig vom Transkriptom erfolgt und in Mikroarray-Experimenten nicht erkennbar ist. Die Regulation von EF-1 $\alpha$ -48D erfolgt nur unter Zucker, nicht aber unter Hunger. (vgl. Abbildung 4.2-3). Dies bedeutet, dass nicht das Fehlen von Nahrungsbestandteilen, wie zum Beispiel Aminosäuren zu einer Regulation von CG8280 führt, sondern spezifisch ein durch Zuckerfütterung hervorgerufener Effekt auftritt. Ein im Zusammenhang mit Insulin stehendes Protein dTOR (*Drosophila*

Target of Rapamycin) reguliert ebenfalls in einer nahrungsabhängigen Weise die Translation verschiedener Proteine. Unter normalen Futterbedingungen ist dTOR aktiv und führt zu einer Inhibierung von Thor. Dieses Protein kontrolliert seinerseits die Initiation der Translation und bewirkt durch Bindung an den Initiationsfaktor delF4E zu einer Inhibierung der Translationsmaschinerie.

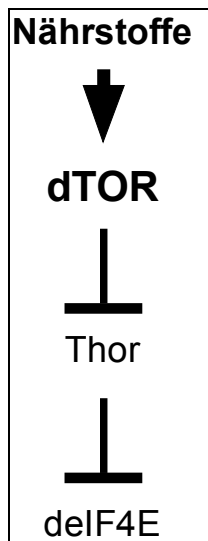


Abbildung 5.9-1: Stimulation der Translationsinitiierung durch dTOR

Die negative Regulation von Thor bewirkt die Stimulation der Ribosomenbiogenese und Initiation der Translation (vgl. Abbildung 5.9-1). Durch Nahrungsknappheit, insbesondere durch Aminosäureknappheit (Hara, 1998), wird der Block von Thor aufgehoben und delF4E geblockt. Der Tor-Signalweg ist eine aminosäureabhängige Steuerung der Translation und steht in engem Kontakt zum Insulin-Signalweg. Die Regulation von EF-1 $\alpha$ -48D könnte ebenfalls in Zusammenhang mit dem Insulin-Signalweg stehen, ist aber im Vergleich zum Tor-Signalweg zuckerabhängig. Unklar ist derzeit noch der Induktionsmechanismus von EF-1 $\alpha$ -48D. Die Tatsache, dass G8280 nicht transkriptionell reguliert wird aber eine zuckerspezifische Proteinexpression zeigt, macht dieses Gen/Protein zu einem interessanten Kandidaten für weitere Untersuchungen. Die Aufklärung von beteiligten Komponenten des Signalweges und die Identifizierung von Zielgenen oder -proteinen sind für ein Verständnis dieser Regulation essentiell.

### 5.10 *pumpless* hat einen Einfluss auf den Glycintiter der Hämolymphe

Die Mutation in *pumpless*-Mutanten betrifft ein Gen, dessen Protein für die H-Untereinheit des Glycinspaltsystems (GCSH) kodiert (Abbildung 5.10-1). Zinke (Zinke, 1999) konnte zeigen, dass das Füttern von hohen Aminosäurekonzentrationen an Wildtyp-Larven den *pumpless*-Fressdefekt kopieren konnte und dass es dabei zu einer Konzentrations-abhängigen Verzögerung der Verpuppung kam. Versuch 4.2.5 konnte zeigen, dass tatsächlich ein Anstieg der Glycinkonzentration gemeinsam mit der Ausbildung des Phänotyps zu beobachten war.

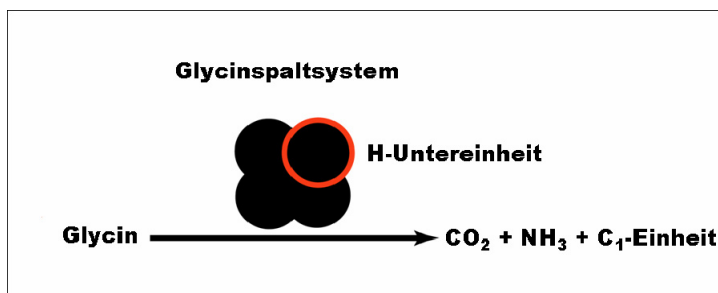


Abbildung 5.10-1: Abbau von Glycin mit Hilfe des Glycinspaltsystems.

Der gemessene Anstieg des Glycintiters in der Hämolymphe von *Drosophila melanogaster* Larven bestätigt daher die Hypothese, die 1999 von Zinke aufgestellt wurde (Zinke, 1999). Nach weiteren 12 h fällt die Konzentration von Glycin allerdings drastisch ab. Dieser Abfall des Glycinlevels könnte als Kompensationsreaktion gedeutet werden. Dies würde allerdings bedeuten, dass es neben dem Glycinspaltsystem weitere Möglichkeiten gibt, Glycin abzubauen bzw. den Gehalt in der Hämolymphe zu senken. Auch eine Einlagerung von Glycin in bestimmte Gewebe, wie dem Fettkörper, wäre denkbar und würde eine Verringerung des Glycingehalts innerhalb der Hämolymphe bewirken. Da die Larven nach 48 h, trotz eines niedrigen Glycinlevels, nicht wieder ins Futter zurückkehren, scheint ein direkter Zusammenhang des Wanderverhaltens mit einem Aminosäure-abhängigen Signal des Fettkörpers eher unwahrscheinlich. Der Versuch bewies, dass tatsächlich eine

Glycinakkumulierung in *pumpless* Mutanten kurz nach dem Auftauchen der ersten Phänotypen stattfindet, dieser Effekt aber nach weiteren 12 h wieder verschwindet und sich ins Gegenteil umkehrt. Somit konnte zwar eine Frage beantwortet werden, gleichzeitig warf dieses Experiment erneut neue Fragen auf, die es in weiteren Versuchen zu klären gilt.

### 5.11 Ausblick

Diese Arbeit zeigt, dass es möglich ist, auch in einem kleinen Labor Techniken, wie die zweidimensionale Gelelektrophorese und die Identifizierung von Proteinen mittels Massenspektrometrie oder die Messung von Metaboliten, wie am Beispiel der *pumpless*-Mutanten und Glycin gezeigt, zu etablieren und Antworten auf biologisch relevante Fragen zu erhalten. Durch Verbesserungen in der Auflösung und der Sensitivität sollten Gele mit bis zu 1 500 Spots möglich sein. Durch Vorfraktionierung könnte dieser Wert noch einmal um Faktor 5-10 erhöht werden, so dass letztendlich bis zu 15 000 Spots detektiert werden könnten. Eine Möglichkeit der Komplexität von Proteinproben zu begegnen, wäre die Konzentration auf bestimmte Proteinspezies. So wäre es denkbar, lediglich phosphorylierte oder glycosylierte Proteine zu untersuchen. Eine Auftrennung über geeignete Säulen würde im Vorfeld die Komplexität stark verringern. Die Massenspektrometrie kann zudem zusätzlich, unabhängig von 2D-Gelelektrophorese, für eine Vielzahl von Experimenten benutzt werden, in denen es darum geht, Proteine schnell und zuverlässig zu identifizieren. Die bisher erzielten Ergebnisse im Bereich der differentiellen Genomanalyse sind vielversprechend und lassen auf zusätzliche Daten und Einblicke in die komplexen Netzwerke von Proteinregulationen und Signalwegen hoffen.

## 6 Anhang

Die Einstellungen am Massenspektrometer sind essentiell für die Generierung brauchbarer Spektren. Auf den folgenden Abbildungen sollen die erfolgten Anpassungen kurz erläutert werden.

### 6.1 Einstellungen für MS-Messungen

#### 6.1.1 Akquisition

Die Akquisition beinhaltet Geräteparameter beim Laserbeschuss, wie Beschussmuster und Intensität. In der Regel werden für Kalibrierungsspektren und Probenspektren unterschiedliche Intensitäten eingestellt. Innerhalb des Instrumentenreiter (Abbildung 6.1-0-1 A) werden Massenbereich (Mass Range) und Massentuning für die Messung eingestellt. Die Masse wird dabei in Dalton (Da) angegeben. Durch die Einstellung „Focus Mass“ werden spezielle Geräteparameter auf diesen Wert optimiert. Normalerweise wird hier der Mittelwert des Massenbereichs gewählt.

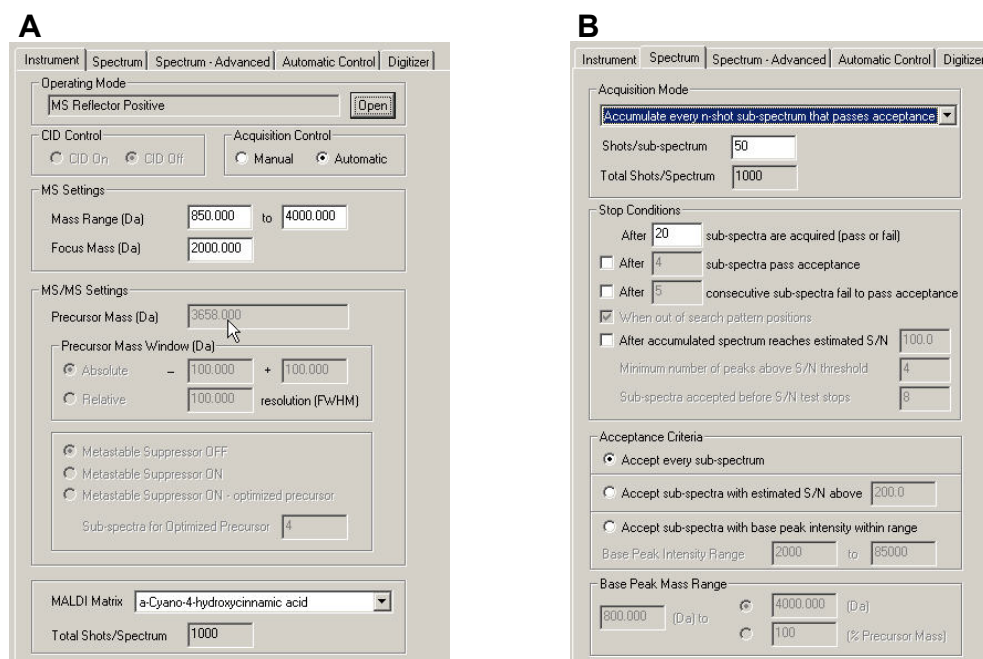


Abbildung 6.1-0-1: Einstellungen am Applied Biosystems 4700 Proteomics Analyzer (A) „Instrument“ (B) „Spectrum“

Der Reiter „Spectrum“ beinhaltet Einstellungen zum Akkumulieren von Spektren. Durch Akkumulieren kann unter Umständen das Signal/Hintergrund (S/N)-Verhältnis verbessert werden. Über zusätzliche Optionen ist es möglich, nur bestimmte Spektren mit einem vorher eingestellten S/N-Verhältnis für die spätere Analyse zuzulassen.

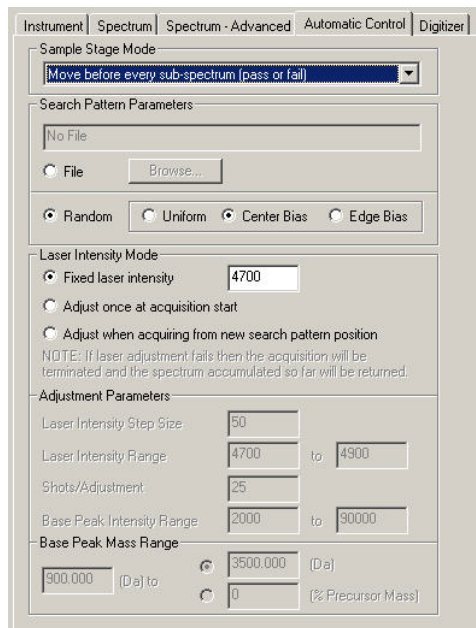


Abbildung 6.1-0-2: Einstellungen am Applied Biosystems 4700 Proteomics Analyzer „Spectrum-Advanced“

Der Reiter „Automatic Control“ steuert den Laserbeschuss (Abbildung 6.1-0-2). Hier können Beschussmuster und Laserintensität eingestellt werden. Das Muster wird über „Search Pattern Parameters“ eingestellt.

Uniform: gleichmäßiger Beschuss über den ganzen Spot

Center Bias: Beschuss nur in der Mitte des Spots

Edge Bias: Beschuss nur am Rand des Spots

Für Kalibrierungspots:

„Center Bias“ und eine Laserintensität von 4 700.

Dieser Wert kann aber je nach Spektrum zwischen 4 500 und 4 800 variiert werden.

Für Probenspots:

„Center Bias“ und eine Laserintensität von 5 200

Dieser Wert kann aber je nach Spektrum zwischen 5 000 und 5 300 variiert werden.

## 6.1.2 Aufbereitung

Das „Processing“ ist für die Spektrenerstellung wichtig. Hier wird festgelegt, welche Kriterien ein Signal braucht, um als solcher ausgegeben zu werden (Abbildung 6.1-3 A), oder wie das Spektrum kalibriert werden soll (Abbildung 6.1-3 B). Bei „Raw Filtering / Peak Detection“ werden alle Grundeinstellungen beibehalten.

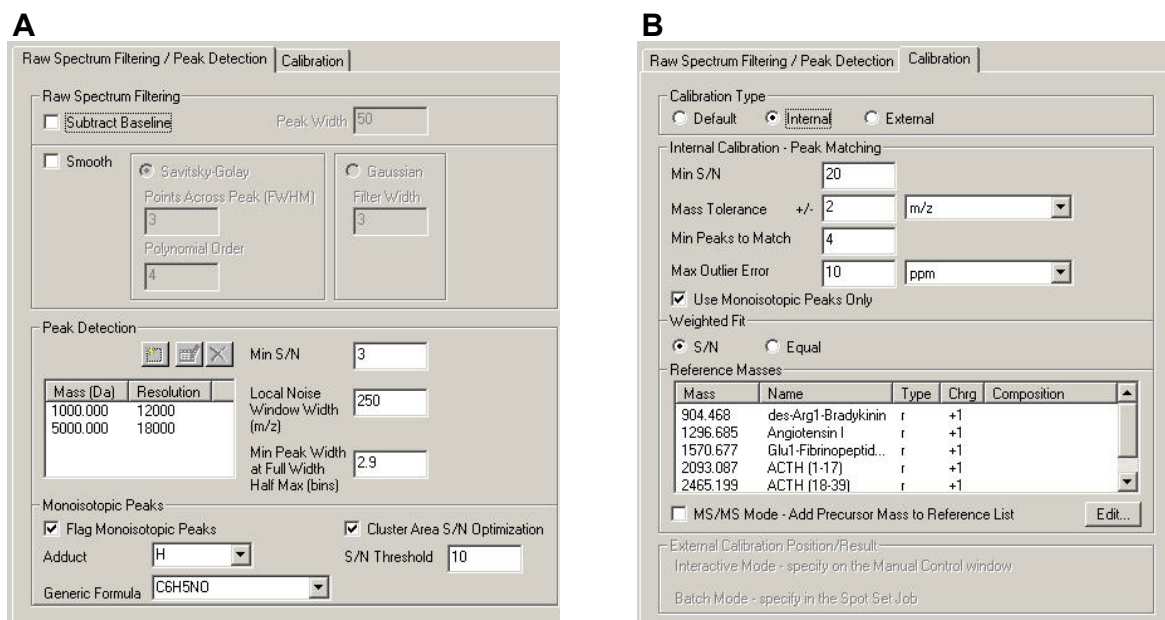


Abbildung 6.1-0-3: Einstellungen am Applied Biosystems 4700 Proteomics Analyzer "Processing Method" (A) Signal Detektion (B) Kalibrierung

Bei der Kalibrierung muss zwischen Proben- und Kalibrierungsspots unterschieden werden.

Für Kalibrierungsspots:

„Calibration Type“ auf „Internal“ und unter „Min Peaks to Match“ 4 einstellen. Dadurch werden die gemessenen Massen mit den Referenzwerten des Kalibrierungsmixes abgeglichen.

Der Mix besteht aus den folgenden fünf Peptiden und deren monoisotopischen Massen:

des-Arg1-Bradykinin (904.468 Da)      Angiotensin I (1296.685 Da)

Glu1-Fibrinopeptide B (1570.677 Da)    ACTH (1-17) (2093.087 Da)

ACTH (18-39) (2465.199 Da)          ACTH (7-38) (3657.929 Da)

Für Probenspots:

„Calibration Type“ auf „External“.

Dadurch werden alle Messungen mit dem internen Standard abgeglichen.

## 6.2 Einstellungen für MS-MS-Messungen

Werden Messungen im MS-MS-Modus durchgeführt müssen separate Akquisitions-, „Processing“-Methoden innerhalb der Interpretations-Methoden erstellt werden.

### 6.2.1 Interpretation

Die Interpretationsmethoden enthält Angaben für die Auswahl der später mit MS-MS zu messenden Signale (Abbildung 6.2-1). „S/N Filter“ gibt an wie stark sich ein Signal vom Hintergrund abheben muss, um als tatsächliches Signal gewertet zu werden.

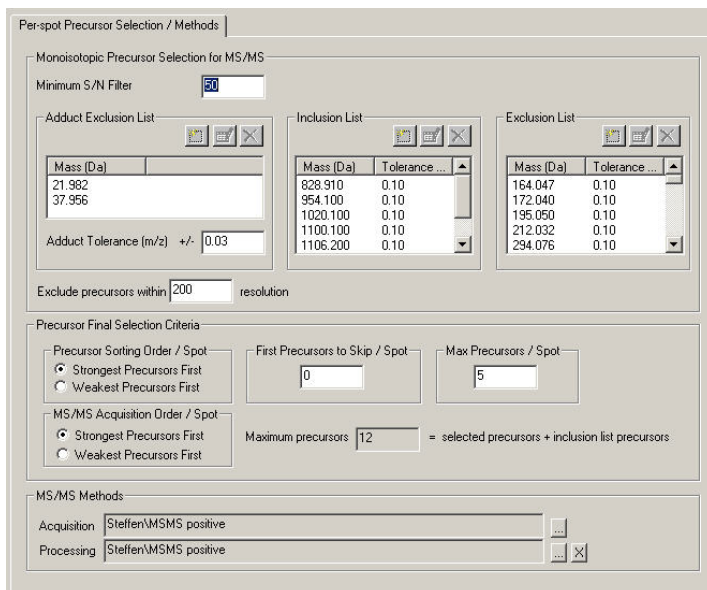


Abbildung 6.2-0-1: Einstellungen am Applied Biosystems 4700 Proteomics Analyzer „Interpretation“



Die „Inclusion List“ enthält Massen, die bei Vorhandensein explizit für MS-MS herangezogen werden sollen. Im Gegensatz dazu werden Signal der „Exclusion List“ ignoriert. Hier können unerwünschte, dominante Signale eingetragen werden. „Max Precursors / Spot“ gibt an, wieviele Signale pro Spot mit MS-MS gemessen werden. Unter „MS/MS Methods“ werden die jeweiligen Akquisitions- und Aufbereitungs-Methoden angegeben.

## 6.2.2 Akquisition und Aufbereitung

Einstellungen wie Massenbereich und optimierte Masse wurden bereits für das MS-Experiment definiert und müssen für MS-MS-Messungen nicht erneut eingestellt werden. „CID Control“ wird auf „off“ und „Aquisition Control“ auf „automatic“ eingestellt (Abbildung 6.2-2 A). Die Laserintensität wird auf 5 700 erhöht (Abbildung 6.2-2 B).

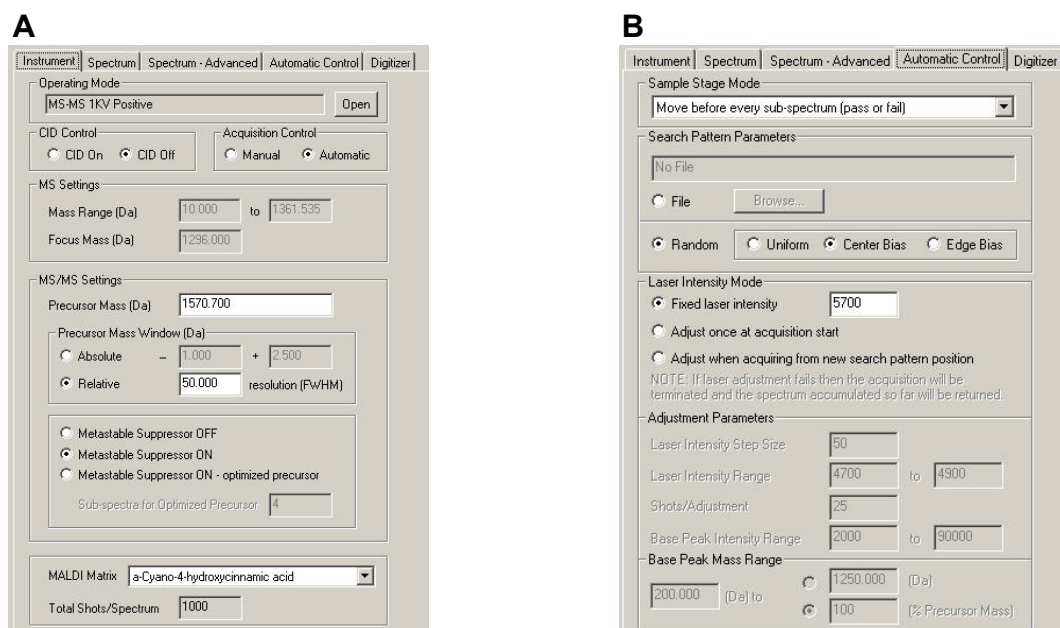


Abbildung 6.2-2: Einstellungen am Applied Biosystems 4700 Proteomics Analyzer (A) „Instrument“ (B) „Automatic Control“

Innerhalb der „Processing“-Methode wurde im Reiter „Calibration“ der „Calibration Type“ auf „Default“ gestellt.



## 7 Literaturverzeichnis:

**ADAMS, M. D.**, Celniker, S. E., Holt, R. A., Evans, C. A., Gocayne, J. D., Amanatides, P. G., Scherer, S. E., Li, P. W., Hoskins, R. A., Galle, R. F., et al. (2000). The genome sequence of *Drosophila melanogaster*. *Science*, **287**, 2185–2195.

**AEBERSOLD, R. H.** et al. (1986). Electroblotting onto activated glass. High efficiency preparation of proteins from analytical sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gels for direct sequence analysis. *J Biol Chem*, **261**(9), 4229-4238.

**ANDERSON, L.**, Seilhamer, J. (1997). A comparison of selected mRNA and protein abundances in human liver. *Electrophoresis*, **18**(3-4), 533-537.

**ANDERSON, N. L.**, Anderson, N. G. (1998). Proteome and proteomics: new technologies, new concepts, and new words. *Electrophoresis*, **19**(11), 1853-1861.

**ANDERSON, N. L.**, Matheson, A. D., Steiner, S. (2000). Proteomics: applications in basic and applied biology [Review]. *Current Opinion in Biotechnology*, **11**, 408- 412.

**APWEILER, R.**, Hermjakob, H., Sharon, N. (1999). On the frequency of protein glycosylation, as deduced from analysis of the SWISS-PROT database. *Biochim Biophys Acta*, **1473**(1), 4-8.

**BAGGERMAN, G.**, Cerstiaens, A., De Loof, A., Schoofs, L. (2002). Peptidomics of the Larval *Drosophila melanogaster* Central Nervous System. *J Biol Chem*, **277**(43), 40368-40374.

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

**BEADLE, G. W.**, Tatum, E. L. (1941). Genetic Control of Biochemical Reactions in *Neurospora*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **27**, 499-506.

**BEAVIS, R. C.**, Chait, B. T. (1989). Cinnamic acid derivatives as matrices for ultraviolet laser desorption mass spectrometry of proteins. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, **3**(12), 432-435.

**BEAVIS, R. C.**, Chaudhary, T., Chait, B. T. (1992).  $\alpha$ -Cyano-4-hydroxycinnamic Acid as a Matrix for Matrix-Assisted Laser Desorption Mass Spectrometry. *Organic Mass Spectrometry*, **27**, 156-158.

**BENZER, S.** (1955). Fine Structure Of A Genetic Region In Bacteriophage. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **41**(6), 344-354.

- BERGGREN, K.** et al. (2000). Background-free, high sensitivity staining of proteins in one- and two- dimensional sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gels using a luminescent ruthenium complex. *Electrophoresis*, **21**(12), 2509-2521.
- BIRNBOIM, H. C.**, Doly, J. (1979). A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucl Acid Res*, **7**, 1513-1523.
- BJELLQVIST, B.** et al. (1982). Isoelectric focusing in immobilized pH gradients: principle, methodology and some applications. *J Biochem Biophys Methods*, **6**(4), 317-339.
- BJELLQVIST, B.** et al. (1993). Micropreparative two-dimensional electrophoresis allowing the separation of samples containing milligram amounts of proteins. *Electrophoresis*, **14**(12), 1375-1378.
- BRADFORD, M.** (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, **72**, 248-254.
- BRAND, A.**, Perrimon, N. (1993). Targeted gene expression as a means of altering cell fates and generating dominant phenotypes. *Development*, **118**, 401–415.
- BROGIOLO, W.**, Stocker, H., Ikeya, T., Rintelen, F., Fernandez, R., Hafen, E. (2001). An evolutionarily conserved function of the *Drosophila* insulin receptor and insulin-like peptides in growth control. *Curr Biol*, **11**, 213-221.
- BUCH, S.** (2006). Die Signaltransduktionswirkung von Insulin in der adulten *Drosophila melanogaster*. Dissertation Universität Karlsruhe.
- CASSO, D.**, Ramirez-Weber, F., Kornberg, T. B. (2000). GFP-tagged balancer chromosomes for *Drosophila melanogaster*. *Mech Dev*, **91**, 451-454.
- CORTHALS, G. L.**, Wasinger, V. C., Hochstrasser, D. F., Sanchez, J. C. (2000). The dynamic range of protein expression: A challenge for proteomic research [Review]. *Electrophoresis*, **21**, 1104-1115.
- DAGERT, M.**, Ehrlich, S. D. (1979). Prolonged incubation in calcium chloride improves the competence of *Escherichia coli* cells. *Gene*, **6**(1), 23-28.
- DERISI, J.L.**, Iyer, V. R., Brown, P. O. (1997). Exploring the metabolic and genetic control of gene expression on a genomic scale. *Science*, **278**(5338), 680-686.
- EDMAN, P.** (1950). Method of the determination of the amino acid sequence in peptides. *Acta Chem Scand*, **4**, 277-282.
- EDMAN, P.**, Begg, B. (1967). A protein sequenator. *Eur J Biochem*, **1**(1), 80-91.
- EGGER, D.**, Bienz, K. (1994). Protein (western) blotting. *Mol Biotechnol*, **1**(3), 289-305.

- FASSLER, J.**, Landsman, D., Acharya, A., Moll, J. R., Bonovich, M., Vinson, C. R. (2002). B-ZIP Proteins Encoded by the *Drosophila* Genome: Evaluation of Potential Dimerization Partners. *Genome Res*, **12**(8), 1190-1200.
- FENN, J. B.** et al. (1989). Electrospray ionization for mass spectrometry of large biomolecules. *Science*, **246**(4926), 64-71.
- GAROFALO, R. S.** (2002). Genetic analysis of insulin signaling in *Drosophila*. *Trends Endocrinol. Metab*, **13**(4), 156-162.
- GARROLD, A. E.** (1923). *Inborn Errors of Metabolism*. 2. Frowde, H. (Herausg.) Oxford University Press London
- GEMS, D.**, Partridge, L. (2001). Insulin/IGF signalling and ageing: seeing the bigger picture. *Curr Opin Genet Dev*, **11**, 287-292.
- GRAVELEY, B. R.** (2001). Alternative splicing: increasing diversity in the proteomic world [Review]. *Trends in Genetics*, **17**, 100-107.
- GRAVELEY, B. R.** (2005). Mutually exclusive splicing of the insect Dscam pre-mRNA directed by competing intronic RNA secondary structures. *Cell*, **123**(1), 65-73.
- GYGI, S.P.** (1999). Correlation between protein and mRNA abundance in yeast. *Mol Cell Biol*, **19**(3), 1720-1730.
- HAMM, A.** (2005). Untersuchung nahrungsinduzierter Änderungen des Expressionsprofils der Maus (*Mus musculus*). Dissertation Universität Karlsruhe.
- HANAHAN, D.** (1983). Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J Mol Biol*, **166**, 557-580.
- HARA, K.**, Yonezawa, K., Weng, Q. P., Kozlowski, M. T., Belham, C., Avruch, J. (1998). Amino acid sufficiency and mTOR regulate p70 S6 kinase and eIF-4E BP1 through a common effector mechanism [published erratum appears in *J Biol Chem*, **273**, 22160]. *J Biol Chem*, **273**, 14484-14494.
- HE, G. P.**, Kim, S. and Ro, H. S. (1999). Cloning and characterization of a novel zinc finger transcriptional repressor. A direct role of the zinc finger motif in repression. *J Biol Chem*, **274**, 14678-14684.
- HENZEL, W. J.** et al. (1993). Identifying proteins from two-dimensional gels by molecular mass searching of peptide fragments in protein sequence databases. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **90**(11), 5011-5015.
- HEWICK, R. M.** et al. (1981). A gas-liquid solid phase peptide and protein sequenator. *J Biol Chem*, **256**(15), 7990-7997.

- HODGES, P. E.**, Payne, W. E. and Garrels, J. I. (1998). The Yeast Protein Database (YPD): a curated proteome database for *Saccharomyces cerevisiae*. *Nucleic Acids Res*, **26**(1), 68-72.
- HUTH-FEHRE, T.**, Gosine, J. N., Wu, K. J., Becker, C. H. (1992). Matrix-assisted laser desorption Mass spectrometry of oligodeoxythymidylic acids. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, **6**(3), 209-213.
- IDEKER T.**, Thorsson V., Ranish J. A., Christmas R., Buhler J., Eng J. K., Bumgarner R., Goodlett D. R., Aebersold R., Hood L. (2001). Integrated genomic and proteomic analysis of a systematically perturbed metabolic network. *Science*, 292, 929-934.
- INTERNATIONAL HUMAN GENOME SEQUENCING CONSORTIUM** (2004). Finishing the euchromatic sequence of the human genome. *Nature*, **431**(7011), 931-945.
- ISSAQ, H.J.** (2001). The role of separation science in proteomics research [Review]. *Electrophoresis*, **22**, 3629-3638.
- JACOBS, G. H.** (1992). Determination of the base recognition positions of zinc fingers from sequence analysis. *The EMBO Journal*, **11**(12), 4507-4517.
- KARAS, M.**, Hillenkamp, F. (1988). Laser desorption ionization of proteins with molecular masses exceeding 10,000 daltons. *Anal Chem*, **60**(20), 2299-2301.
- KATZENBERGER, J.** (2004). Etablierung eines Systems zur genomweiten Analyse nahrungsabhängig regulierter Gene in der Fruchtfliege *Drosophila melanogaster*. Dissertation Universität Karlsruhe
- KIMURA, K. D.**, Tissenbaum, H. A., Liu, Y., Ruvkun, G. (1997). Daf-2, an insulin receptor-like gene that regulates longevity and diapause in *Caenorhabditis elegans*. *Science*, **277**(5328), 942-946.
- KLOSE, J.** (1975). Protein mapping by combined isoelectric focusing and electrophoresis of mouse tissues. A novel approach to testing for induced point mutations in mammals. *Humangenetik*, **26**(3), 231-243.
- KUSSMANN, M.**, Nordhoff, E., Rahbeknielsen, H., Haebel, S., Rossellarsen, M., Jakobsen, L., Gobom, J., Mirgorodskaya, E., Krollkristensen, A., Palm, L., Roepstorff, P. (1997). Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization mass spectrometry sample preparation techniques designed for various peptide and protein analytes. *Journal of Mass Spectrometry*, **32**, 593-601.
- LANE, M. A.**, Ingram, D. K., Roth, G. S. (1999). Nutritional modulation of aging in nonhuman primates. *J Nutr Health Aging*, **3**(2), 69-76.
- LEEVERS, S. J.** (2001). Growth Control: invertebrates insulin surprises! *Curr Biol*, **11**(6), 209-212.

- LEHNER, C.** (1999). The beauty of small flies. *Nat Cell Biol*, **1**, E119-E130.
- LIU, Y., Montell, D. J.** (2001). *jing*: a downstream target of *slbo* required for developmental control of border cell migration. *Development*, **128**, 321-330.
- LOTTSPREICH, F.** (1998). *Bioanalytik*. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg.
- LOTTSPREICH, F.** (1999). Proteome analysis: A pathway to the functional analysis of proteins [Review]. *Angewandte Chemie International Ed. in English*, **38**, 2477-2492.
- MANABE, T.** (2000). Combination of electrophoretic techniques for comprehensive analysis of complex protein systems [Review]. *Electrophoresis*, **21**, 1116-1122.
- MANDEL, M., Higa, A.** (1970). Calcium-dependent bacteriophage DNA infection. *J Mol Biol*, **53**(1), 159-162.
- MCCULLOCH, D., Gems, D.** (2003). Body size, insulin/IGF signaling and aging in the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Exp Gerontol*, **38**(1-2), 129-136.
- METZGER, J. W.** et al. (1994). Electrospray mass spectrometry and tandem mass spectrometry of synthetic multicomponent peptide mixtures: determination of composition and purity. *Anal Biochem*, **219**(2), 261-77.
- MONTELL, D. J., Rorth, P., Spradling, A. C.** (1992). Slow border cells, a locus required for a developmentally regulated cell migration during oogenesis, encodes *Drosophila C/EBP*. *Cell*, **71**, 51-62.
- MULLIS, K., Faloona F, Scharf S, Saiki R, Horn G, Erlich H.** (1986). Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*, **51**, Pt 1, 263-273.
- MYERS, E. W., Sutton, G. G., Delcher, A. L., Dew, I. M., Fasulo, D. P., Flanigan, M. J., Kravitz, S. A., Mobarry, C. M., Reinert, K. H., Remington, K. A., et al.** (2000). A whole-genome assembly of *Drosophila*. *Science*, **287**, 2196–2203.
- O'DONOVAN, C., Apweiler, R., Bairoch, A.** (2001). The human proteomics initiative (HPI). *Trends Biotechnol*, **19**(5), 178-181.
- O'FARRELL, P. H.** (1975). High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. *J Biol Chem*, **250**(10), 4007-4021.
- ORCHARD, I.** (1987). Review: Adipokinetic Hormones- an update. *J Insect Physiol*, **3** (3), 451-463.
- PATTON, W. F.** (2000). A thousand points of light: The application of fluorescence detection technologies to two-dimensional gel electrophoresis and proteomics [Review]. *Electrophoresis*, **21**, 1123-1144.

**PATTON, W. F.**, Beechem, J. M. (2002). Rainbow's end: the quest for multiplexed fluorescence quantitative analysis in proteomics [Review]. *Current Opinion in Chemical Biology*, **6**, 63-69.

**PAULING, L.**, Itano, H. A., Singer, S. J., Wells, I. C. (1949). Sickle cell anemia: a molecular disease. *Science*, **110**, 543-548.

**PRZYBYLSKI, M.**, Glocker, M. O. (1996). Elektrospray Massenspektrometrie von Biomakromolekülkomplexen mit nichtkovalenten Wechselwirkungen - neue analytische Perspektiven für supramolekulare Chemie und molekulare Erkennungsprozesse (*review*). *Angewandte Chemie*, **108**, 879-899.

**QUADRONI, M.**, James, P. (1999). Proteomics and automation. *Electrophoresis*, **20**(4-5), 664-677.

**ROTH, G. S.**, Ingram, D. K., Lane, M. A., (2000). Effects of reduced energy intake on the biology of aging: the primate model. *J Clin Nutr*, **54**(3), 15-20.

**RUVKUN, G.**, Hobart, O. (1998). Ablation of insulin-producing neurons in flies: growth and diabetic phenotypes. *Science*, **296**(5570), 1118-1120.

**SAMBROOK, J.**, Fritsch, E.F. and Maniatis, T. (1989). *Molecular cloning: A laboratory manual*. Cold Spring Harbor, New York, Cold Spring Harbor Laboratory Press.

**SANGER F.**, Tuppy H. (1951). The amino-acid sequence in the phenylalanyl chain of insulin. I. The identification of lower peptides from partial hydrolysates. *Biochem J*, **49**(4), 463-81.

**SCHLEGEL, H. G.** (1992). *Allgemeine Mikrobiologie*, 7. Auflage, G. Thieme Verlag, Stuttgart.

**SCHOOFS, L.**, Baggerman, G. (2003). Peptidomics in *Drosophila melanogaster*. *Brief Funct Genomic Proteomic*, **2**(2), 114-120.

**SMITH, H. O.**, Wilcox, K. W. (1970). A restriction enzyme from *Hemophilus influenzae I*. Purification and general properties. *J Mol Biol*, **51**, 379-391.

**SIUZDAK, G.** (1994). The emergence of mass spectrometry in biochemical research. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **91**(24), 11290-11297. Review. Erratum In: *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1995, **92**(2), 646.

**TANAKA, K.**, Waki, H., Ido, Y., Akita, S., Yoshida, Y., Yoshida, T. (1988). Protein and Polymer Analysis up to m/z 100000 by Laser Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, **2**, 151-153.



- TOWBIN, H.**, Staehlin T., Gordan J. (1976). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **76**, 4350-4354.
- UNLU M.**, Morgan M. E., Minden J. S. (1997). Difference gel electrophoresis: a single gel method for detecting changes in protein extracts. *Electrophoresis*, **18**(11), 2071-2077.
- VANBOGELEN, R. A.** et al. (1997). *Escherichia coli* proteome analysis using the gene-protein database. *Electrophoresis*, **18**(8), 1243-1251.
- VAN DER HORST, D. J.** (2003). Insect adipokinetic hormones: release and integration of flight energy metabolism. *Comp Biochem Phys*, **136**, 217-226.
- VENTER, J. C.** et al. (2001). The Sequence of the Human Genome. *Science*, **291**(5507), 1304-1351.
- VERTES, A.**, Irinyi, G., Gijbels, R. (1993). Hydrodynamic model of matrix-assisted laser desorption mass spectrometry. *Analytical Chemistry*, **65**, 2389-2393.
- VIERSTRAETE, E.**, Cerstiaens, A., Baggerman, G., Van den Bergh, G., De Loof, A., Schoofs, L. (2003). Proteomics in *Drosophila melanogaster*: first 2D database of larval hemolymph proteins. *Biochem Biophys Res Commun*, **304**(4), 831-838.
- VINSON, C. R.**, Sigler, P. B., McKnight, S. L. (1989). Scissorsgrip model for recognition by a family of leucine zipper proteins. *Science*, **246**(4932), 911-916.
- VINSON, C. R.**, Hai, T., Boyd, S. M. (1993). Dimerization specificity of the leucine zipper-containing bZIP motif on DNA binding: prediction and rational design. *Genes Dev*, **7**, 1047-1058.
- WANG, H.**, Iakova, P., Wilde, M., Welm, A., Goode, T., Roesler, W. J., Timchenko, N. A. (2001). C/EBP alpha arrests cell proliferation through direct inhibition of Cdk2 and Cdk4. *Mol Cell*, **8**(4), 817-828.
- WEDEL, A.**, Ziegler-Heitbrock, H. W. (1995). The C/EBP family of transcription factors. *Immunobiology*, (Band 193), Nr. 2-4, 171-185.
- WILDGRUBER, R.** et al. (2000). Towards higher resolution: two-dimensional electrophoresis of *Saccharomyces cerevisiae* proteins using overlapping narrow immobilized pH gradients. *Electrophoresis*, **21**(13), 2610-2616.
- WILKINS, M. R.** et al. (1996). Progress with proteome projects: why all proteins expressed by a genome should be identified and how to do it. *Biotechnol Genet Eng Rev*, **13**, 19-50.
- WILM, M.**, Mann, M. (1994). Electrospray and Taylor- Cone theory, Dole's beam of macromolecules at last? *Int J Mass Spectrom Ion Process*, **136**, 167-180.

**WILM, M.**, Neubauer, G., Mann, M. (1996). Parent ion scans of unseparated peptide mixtures. *Anal Chem*, **68**(3), 527-33.

**WOLTERS, D. A.**, Washburn, M. P., Yates, J. R. (2001). An automated Multidimensional protein identification technology for shotgun proteomics. *Anal Chem*, **73**(23), 5683-5690.

**YATES, J. R.** et al. (1993). Peptide mass maps: a highly informative approach to protein identification. *Anal Biochem*, **214**(2), 397-408.

**YENUSH, L.**, Fernandez, R., Myers, M. G. Jr., Grammer, T. C., Sun, X. J., Blenis, J., Pierce, J. H., Schlessinger, J., White, M. F. (1996). The *Drosophila* insulin receptor activates multiple signaling pathways but requires insulin receptor substrate proteins for DNA synthesis. *Mol Cell Biol*, **16**(5), 2509-2517.

**ZINKE, I.**, Kirchner, C., Chao, L. C., Tetzlaff, M. T., Pankratz, M. J. (1999). Suppression of food intake and growth by amino acids in *Drosophila*: the role of pumpless, a fat body expressed gene with homology to vertebrate glycine cleavage system. *Development*, **126**(23), 5275-5284.

**ZINKE, I.**, Schütz, C., Katzenberger, J., Bauer, M., Pankratz, M. (2002). Nutrient control of gene expression in *Drosophila*: microarray analysis of starvation and sugar-dependent response. *The EMBO Journal*, **21**(22), 6162-6173.