

***enoki mushroom*, ein  
Histon-Acetyltransferase-  
Homolog, ist an der  
Regulation von Nahrungs-  
aufnahme und Wachstum in  
*Drosophila melanogaster*  
(Meigen) beteiligt**

I. Zinke

Institut für Toxikologie und Genetik



Forschungszentrum Karlsruhe

in der Helmholtz-Gemeinschaft

Wissenschaftliche Berichte

FZKA 6856

*enoki mushroom*,  
ein Histon-Acetyltransferase-Homolog,  
ist an der Regulation von Nahrungsaufnahme und  
Wachstum in *Drosophila melanogaster* (Meigen) beteiligt

Ingo Zinke

Institut für Toxikologie und Genetik

von der Fakultät für Bio- und Geowissenschaften  
der Universität Karlsruhe genehmigte Dissertation

Forschungszentrum Karlsruhe GmbH, Karlsruhe

2003

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

***enoki mushroom*,**  
**ein Histon-Acetyltransferase-Homolog,**  
**ist an der Regulation von Nahrungsaufnahme und**  
**Wachstum in *Drosophila melanogaster* (Meigen) beteiligt**

Zur Erlangung des akademischen Grades eines  
Doktors der Naturwissenschaften an der  
Fakultät für Bio- und Geowissenschaften der  
Universität Karlsruhe  
genehmigte

**DISSERTATION**

von

**Ingo Zinke**

aus Pforzheim

2003

Tag der mündlichen Prüfung: 03. Juli 2002

Referent: PD Dr. Michael J. Pankratz

Korreferent: Prof. Dr. Reinhard Paulsen



## Zusammenfassung

Es sind nicht viele Gene bekannt, die bei der Regulation von Nahrungsaufnahme und Wachstum eine Rolle spielen. In einem Verhaltens-Screen für Fressdefekte in *Drosophila*-Larven wurde die P-Element-Linie *I(2)09373* isoliert. Die Larven dieser Mutanten zeigten Defekte bei der Nahrungsaufnahme und beim Wachstum, den sogenannten *rotkehlchen*-Phänotyp. Da in *I(2)09373* eine Deletion vorlag, wurden in einem Ethyl-Methan-Sulfonat-Mutagenese Screen neue Allele für diesen Phänotyp isoliert. Es wurde gezeigt, dass eine Mutation des *enoki mushroom*-Gens (*enok*) für diesen Fress- und Wachstums-Phänotyp verantwortlich war. Sowohl der *enok*-Lokus als auch die *enok*-cDNS wurden identifiziert, kloniert und sequenziert. Das Enok-Protein zeigte sehr hohe Sequenz-Homologie zur MYST-Familie der Histon-Acetyltransferasen. Innerhalb dieser Familie zeigte Enok die höchste Homologie zu menschlichem MOZ (*monocytic leukemia zinc finger protein*). Für die biochemische Untersuchung der Enok-Protein-Funktion wurden monoklonale Enok-Antikörper hergestellt. Die Expression von *enok* wurde im Gehirn und in Imaginalgewebe von Wildtyp-Larven nachgewiesen. Desweiteren war unter Hungerbedingungen, bei denen Larven das Wachstum einstellen, die *enok*-Transkription erhöht. Bei der *enok*-Überexpression in transgenen *Drosophila*-Larven wurde ein Wachstumsdefekt verbunden mit einem Wanderverhalten, bei dem Larven die Futterquelle verließen, sichtbar. Hungerte man Larven, die *enok* überexprimieren, so zeigten sie keine vollständige physiologische Hungerreaktion, wie die Untersuchung der Aktivität von Genen, die unter Hungerbedingungen reguliert wurden, zeigten. Schließlich wurde mit Hilfe von DNS-Microarrays begonnen die Gen-Expression in *enok*-Mutanten und in Larven, die *enok* überexprimieren, zu untersuchen, um *enok*-Zielgen-Kandidaten zu identifizieren. Aus den vorliegenden Ergebnissen wurde gefolgert, dass *enok* unter normalen Nahrungsbedingungen Nahrungsaufnahme und Wachstum in Larven fördert. Unter Hungerbedingungen ist *enok* an der Regulation eines Notprogramms beteiligt, das zu einem Wachstums-Stop und zu einer Veränderung des Fressverhaltens führt und welches somit für die Anpassung dieser Tiere an Hungersituationen überlebenswichtig ist.





***enoki mushroom*, a histone acetyltransferase homolog,  
is involved in the regulation of nutrient intake and growth  
in *Drosophila melanogaster* (Meigen)**

**Abstract**

There are not many genes known which are involved in the regulation of nutrient intake and growth. The P-element line *I(2)09373* was isolated in a behavioural screen for feeding defects in *Drosophila* larvae. These mutant larvae showed specific defects in food intake and growth, a phenotype which was termed *rotkehlchen*. Using a deficiency in *I(2)09373*, new alleles for this phenotype were isolated in an ethyl methane sulfonate mutagenesis screen. The analysis of these lines showed that the mutation of the *enoki mushroom* (*enok*) gene caused the feeding and growth defects. In addition to the genomic *enok* locus, several *enok* cDNAs were identified, cloned and sequenced. The Enok protein sequence showed high homology to the MYST family of histone acetyltransferases. Within this group the highest homology was to the human MOZ (monocytic leukemia zinc finger protein). Monoclonal Enok antibodies were produced for biochemical analysis of Enok function. The *enok* gene was expressed in the brain and imaginal tissues of wildtype larvae. The transcription of *enok* was increased under starvation, a condition where larvae stop organismal growth. Overexpression of *enok* in transgenic flies led to growth defects and the induction of a so called wandering behaviour that is characterized by larvae leaving the food source. Analysis of genes regulated under starvation conditions in starved larvae which overexpressed *enok* showed that the physiological starvation response in these transgenic animals was incomplete. Finally a project was started using DNA microarrays to identify putative *enok* target gene candidates by analysing *enok* mutant larvae and *enok* overexpressing larvae. Taken together, these results led to the conclusion that *enok* promotes nutrient intake and organismal growth in *Drosophila* larvae under normal feeding conditions. Under starvation *enok* is involved in the regulation of a rescue program that leads to a stop of growth and to an alteration in feeding behaviour that is essential for adaption and survival under these conditions.



## Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung .....	1
Abstract .....	3
Inhaltsverzeichnis .....	5
Abkürzungsverzeichnis .....	9
1 Einleitung .....	11
1.1 Regulation von Wachstum.....	12
1.2 Modelle für die Kontrolle von statischer Allometrie.....	14
1.3 Ein Aminosäure-abhängiges Signal beeinflusst Nahrungsaufnahme und Wachstum.....	16
2 Ergebnisse .....	19
2.1 Neue <i>rot</i> -Allele aus einem EMS Mutagenese-Screen .....	20
2.2 Der <i>rotkehlchen</i> -Phänotyp ist charakterisiert durch Nahrungsaufnahme- und Wachstumsdefekte .....	22
2.3 Molekulare Charakterisierung des <i>rot</i> -Lokus .....	24
2.4 Identifizierung des für den <i>rot</i> -Phänotyp verantwortlichen Gens .....	29
2.5 Enok ist ein Sequenzhomolog von Histon-Acetyltransferasen .....	31
2.6 Ein HAT-Assay mit rekombinatem Enok zeigte keine Aktivität .....	37
2.7 Die Herstellung monoklonaler Enok-Antikörper.....	39
2.8 Hungerbedingungen induzieren die <i>enok</i> -Expression .....	41
2.9 Überexpression von <i>enok</i> .....	45
2.9.1 Überexpression von <i>enok</i> unter dem <i>glass</i> -Enhancer verursacht Defekte in der Augenentwicklung.....	46
2.9.2 Überexpression von <i>enok</i> unter dem <i>G2</i> -Promotor verursacht Defekte im Larvenwachstum, beim Verhalten und bei der Hungerreaktion.....	47
2.9.3 Überexpression von <i>enok</i> unter dem <i>hsp70</i> -Promotor verursacht ähnliche Defekte wie Expression unter dem <i>G2</i> -Promotor.....	51
2.10 Erste Schritte bei der Identifizierung von möglichen <i>enok</i> -Zielgenen .....	53
3 Diskussion .....	57
3.1 Die Mutation des <i>enok</i> -Gens verursacht den <i>rotkehlchen</i> -Phänotyp....	57
3.2 Enok ist wahrscheinlich eine Histon-Acetyltransferase .....	59
3.3 Enok hat höchste Homologie zu MOZ.....	61
3.4 Beeinflussen Ecdyson-Level die <i>enok</i> -Expression? .....	62
3.5 Nur mitotische Gewebe zeigen <i>enok</i> -Expression .....	64
3.5 Die <i>enok</i> -Expression wird von Nahrungssignalen beeinflusst .....	65
3.6 <i>Enok</i> spielt eine Rolle bei der Kontrolle von Wachstum und bei der Reaktion auf sich ändernde Nahrungsbedingungen.....	67
3.7 Eine Hypothese: die Mushroom Bodies sind vielleicht an der Regulation von Wachstum und Nahrungsaufnahme beteiligt.....	70
3.8 Perspektiven.....	72
4 Material.....	75
4.1 Bezugsquellen für Verbrauchsmaterialien und Chemikalien .....	75
4.2 Bezugsquellen für Enzyme.....	78
4.3 Bezugsquellen für Kits.....	78
4.4 Bezugsquellen für Geräte.....	79

4.5	Lösungen und Medien .....	80
4.6	Fliegenlinien .....	82
4.7	Vektoren und Plasmide.....	82
4.8	Bakterienstämme.....	84
4.9	Hybridisierungs-Sonden .....	84
4.10	RT-PCR Primer .....	85
5	Methoden .....	87
5.1	Fliegenhaltung .....	87
5.2	Fütterungsexperimente.....	87
5.3	Phänotypische Untersuchung von <i>Drosophila</i> -Larven.....	88
5.4	Genetik .....	89
5.4.1	Fliegenkreuzungen .....	89
5.4.2	Ethyl-Methan-Sulfonat (EMS) Mutagenese-Screen.....	89
5.4.3	Erzeugung transgener Fliegen .....	90
5.4.4	Bestimmung des P-Element-Insertions-Chromosoms in transgenen Fliegen.....	91
5.4.5	Rettungskreuzungen.....	92
5.5	Molekularbiologische und biochemische Methoden .....	92
5.5.1	Screen einer genomischen DNS-Bibliothek.....	92
5.5.2	Isolierung von $\lambda$ -Phagen-DNS .....	93
5.5.3	Screen einer cDNS-Bibliothek .....	93
5.5.4	Isolierung von Plasmid-DNS aus Bakterien.....	94
5.5.5	Isolierung von RNS aus <i>Drosophila</i> .....	95
5.5.6	Restriktionsverdau von DNS.....	95
5.5.7	Agarosegel-Elektrophorese .....	96
5.5.8	Isolierung von DNS-Fragmenten aus Agarosegelen .....	96
5.5.9	Klonierung und Transformation von DNS .....	97
5.5.10	Southern-Transfer .....	98
5.5.11	Northern-Transfer.....	99
5.5.12	Herstellung radioaktiv markierter DNS-Sonden.....	99
5.5.13	Hybridisierung mit radioaktiven DNS-Sonden und Autoradiographie .....	99
5.5.14	Polymerase-Kettenreaktion (PCR) .....	100
5.5.15	Reverse-Transkriptase-PCR (RT-PCR).....	101
5.5.16	Sequenzierung von DNS .....	101
5.5.17	Herstellung Fluoreszenz-markierter Targets für Microarray-Hybridisierungen .....	102
5.5.18	Hybridisierung von Kevin-White-Chips .....	103
5.5.19	Herstellung von Digoxigenin-markierten RNS-Sonden.....	103
5.5.20	<i>in-situ</i> -Hybridisierungen.....	104
5.5.21	Expression und Aufreinigung von rekombinanten Proteinen.....	105
5.5.22	Auftrennung von Proteinen in SDS-Polyacrylamidgelen (SDS-PAGE) .....	105
5.5.23	Coomassie-Färbung von Proteinen nach SDS-PAGE.....	106
5.5.24	Silberfärbung von Proteinen nach SDS-PAGE.....	106
5.5.25	Western-Transfer .....	107
5.5.26	Hybridisierung von Western-Transfers .....	107
5.5.27	HAT-Filterassay.....	107
5.5.28	Zellkultur.....	108
5.5.29	Herstellung monoklonaler Antikörper .....	108

---

5.6	Sequenzanalysen und Datenbanken.....	110
6	Literatur .....	111
7	Anhang.....	121
7.1	genomische DNS-Sequenz des <i>enok</i> -Lokus.....	121
7.2	cDNS- und Protein-Sequenz von <i>enok</i> .....	125
7.3	Primer-Sequenzen .....	129



## Abkürzungsverzeichnis

% (v/v)	prozentualer Volumenanteil bezogen auf das Gesamtvolumen
% (w/v)	prozentualer Mengenanteil bezogen auf das Gesamtvolumen
°C	Grad Celsius
µg	Mikrogramm, $10^{-6}$ g
µl	Mikroliter, $10^{-6}$ l
Abb.	Abbildung
bp	Basenpaare
Ci	Curie, Maß der Zerfallsaktivität radioaktiver Präparate
DNS	Desoxyribonukleinsäure
g	Gramm
h	Stunde
kb	Kilo-Basenpaare; 1000 bp
l	Liter
M	molar; Konzentration 1 Mol/Liter
mA	Milliampere
mg	Milligramm, $10^{-3}$ g
min	Minute
ml	Milliliter, $10^{-3}$ l
mol	Mol
ng	Nanogramm, $10^{-9}$ g
nm	Nanometer, $10^{-9}$ m
OD <sub>x</sub>	Optische Dichte bei einer Wellenlänge von x Nanometer
PCR	Polymerase Kettenreaktion
pH	pH-Wert
RNS	Ribonukleinsäure
RT	Reverse Transkriptase
ssDNS	einzelsträngige DNS
Tab.	Tabelle
U	Unit, Einheit der Enzymaktivität
Upm	Umdrehungen pro Minute
UV	ultraviolett
V	Volt
Wt	Wildtyp
x g	Mehrfaches der Erdbeschleunigung

Alle Abkürzungen für Chemikalien und Reagenzien sind in Kapitel 4.1 zu finden.





# 1 Einleitung

„Iss, damit Du gross und stark wirst!“

der Vater zum Sohn

Heterotrophe Lebewesen müssen ihrem Organismus Energie und Baustoffe in Form von Nahrung zuführen, damit sie wachsen können. Dabei müssen sie in kritischen physiologischen Phasen ihr Nahrungsaufnahmeverhalten und ihr Wachstum an sich wechselnde Nahrungsbedingungen anpassen. Fressverhaltensweisen haben sich im Laufe der Evolution zusammen mit endokrinen Kommunikationssystemen und neuronalen Systemen weiterentwickelt. Schon bei Protozoen kann so etwas ähnliches wie Fressverhalten beobachtet werden. Amöben (Amoebina, Rhizopoda) zum Beispiel phagozytieren Nahrungspartikel oder andere Einzeller, die sie während ihrer Lokomotion mit den Pseudopodien kontaktieren. Dabei wird der Beutezug noch unterstützt durch eine außen auf der Zellmembran befindliche Schleimschicht, mit der auch Pantoffeltierchen eingefangen werden können (Renner et al., 1991). Außerdem zeigen diese einzelligen Tiere Chemotaxis. Der Schleimpilz (*Dictyostelium discoideum*) zum Beispiel reagiert chemotaktisch auf das Beutesignal Folsäure, das von Bakterien produziert wird (Van Houten, 1994). *Dictyostelium* zeigt auch eine Verhaltensänderung unter Hungerbedingungen. Diese Amöben bilden Aggregate, indem sich mehrere Amöben einem von hungernden Amöben abgegebenen cAMP-Signal folgend aufeinander zu bewegen (Firtel, 1991). Eine Weiterentwicklung hinsichtlich des Nahrungsaufnahmeverhaltens zeigen Pantoffeltierchen (*Paramecium*, Ciliata). Sie strudeln mit Cilien Nahrungspartikel gezielt zum Zellmund, wo diese phagozytiert werden (Renner et al., 1991). Auch zeigen Ohrenpantoffeltierchen (*Paramecium tetraurelia*) chemotaktische Sensibilität gegenüber Glutamat, einem Aminosäurederivat (Van Houten, 1994). Sie scheinen bereits bestimmte Nahrungsquellen zu bevorzugen, die wie Aminosäuren wichtig für das Wachstum sind.

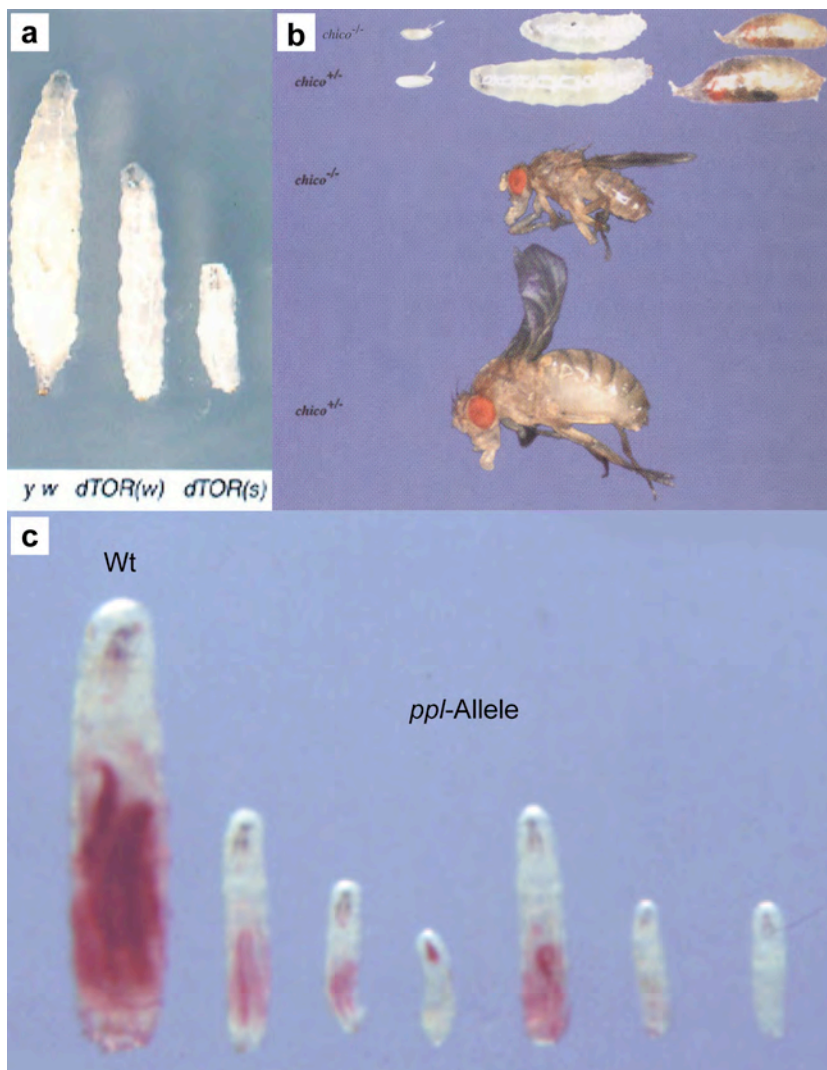
In mehrzelligen Organismen wird die Nahrungsaufnahme immer weniger dem Zufall überlassen. Zusätzlich müssen diese Tiere für die gleichmäßige Verteilung der Nährstoffe im Körper sorgen. *Hydra* als einfach gebauter mehrzelliger Organismus benutzt Tentakel mit Nesseln zum Beutefang (Renner et al., 1991). Dabei wird gefangene Beute unter anderem durch Glutathion-Stimulus, der eventuell von der verwundeten Beute stammt, sehr aktiv durch die Tentakeln zur Mundöffnung geführt und verschluckt (Hanai, 1998). Außerdem wechselt *Hydra* unter Hungerbedingungen den Ort. Sie löst sich in diesem Fall oft vom Untergrund und lässt sich zur Wasseroberfläche treiben, wo sie sich mit dem Fuss kopfüber an der Unterseite der Wasseroberfläche festsetzt und ihre Tentakel treiben lässt (Renner et al., 1991). In allen Fällen ist die Nährstoffversorgung des Organismus für die Aufrechterhaltung des Energie-Stoffwechsels und für das Wachstum wichtig. Dabei spielt das Größenwachstum vor allem in Larvenstadien oder Jungtieren eine Rolle. Ohne Nahrung wird das Wachstum gestoppt und es kann kein fruchtbares adultes Tier entstehen. Wie aber diese Vorgänge, Nahrungsaufnahme, Nahrungsaufnahmeverhalten und Wachstum, genetisch reguliert werden, ist weitgehend unbekannt.

## 1.1 Regulation von Wachstum

Zunächst muss darauf hingedeutet werden, dass verschiedene Formen von Wachstum definiert werden können. Ob einzelne Zellen oder Zellen im Gewebeverband, sie müssen erst zu einer bestimmten Größe heranwachsen, bevor sie sich teilen können. In den letzten Jahren sind molekulare Mechanismen und Gene identifiziert worden, die an der Kontrolle von Wachstum beteiligt sind. Die TOR-Signaltransduktion ist ein solcher Kontrollweg, bei dem die Phosphatidylinositol-3-Kinase-verwandte Kinase TOR (*Target of Rapamycin*) eine zentrale Rolle spielt (Schmelzle und Hall, 2000). Er wurde zuerst dadurch entdeckt, dass TOR-Mutanten in Hefe Resistenz gegen den Wachstumshemmer Rapamycin zeigten. Desweiteren vermittelt dieser Weg Nahrungssignale. In hungernden Hefen ist TOR an der Kontrolle von Autophagocytose beteiligt, einem Prozess, bei dem zelleigene Organellen abgebaut werden, um eine Hungerphase besser zu überstehen. In Säugetieren wurde gezeigt, dass mTOR unter anderem in Abhängigkeit von intrazellulären freien Aminosäuren die Translationsmaschinerie steuert

(Christie et al., 2002). In *Drosophila* zeigten *dTOR*-Mutanten Wachstumsdefekte in Larven (Abb 1.1 a) und Zell-autonome Wachstumsdefekte in Mosaik-Analysen (Oldham et al., 2000; Zhang et al., 2000). Außerdem beeinflusst auch hier das Aminosäure-Angebot die *dTOR*-vermittelte Translation (Oldham et al., 2000).

Ebenfalls in *Drosophila* sind Wachstumsdefekte in Mutanten des Insulinrezeptor-Signaltransduktionswegs beschrieben worden, wie zum Beispiel CHICO (Böhni et al., 1999). In CHICO ist das Insulinrezeptor-Substrat (IRS1-4 Homolog) mutiert und so der Insulinrezeptor-Weg unterbrochen. Der Unterschied zu *dTOR*-Mutanten besteht aber darin, dass sich in CHICO kleine adulte Fliegen entwickeln (Abb 1.1 b), während *dTOR*-Mutanten in der Puppenphase sterben. Hier wird der Unterschied im Wachstum zwischen mitotischem Gewebe (Imaginalgewebe) und endoreplikativem Gewebe (Larvengewebe) in holometabolen Insektenlarven deutlich. Unter Hungerbedingungen wird die Endoreplikation in



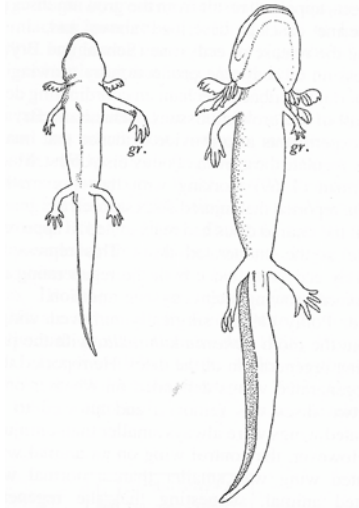
**Abb 1.1** Wachstums-Defekte in *Drosophila*. **(a)** Mutationen in *dTOR* verursachen Wachstums-Defekte in *Drosophila*-Larven. Links Kontrolltier (*yw*), rechts zwei *dTOR*-Allele (*dTOR(w)* und *dTOR(s)*). Nach Oldham et al. (2000). **(b)** Der CHICO-Phänotyp von Embryos, Larven, Puppen und Adulten. Aus Böhni et al. (1999). **(c)** Der *ppI*-Phänotyp zeigte ebenfalls Defekte beim Larven-Wachstum. Verglichen wurden Wildtyp-Larven (Wt) mit verschiedenen *ppI*-Allelen. Zur Visualisierung des Fressdefekts wurde rot gefärbtes Futter verwendet. Nach Zinke et al. (1999).

Larvengewebe eingestellt, während sich Imaginalscheiben-Gewebe weiterteilt, solange die Proteinsynthese funktionieren kann (Britton und Edgar, 1998). In *dTOR*-Mutanten ist die Zellgröße und auch, wahrscheinlich sekundär, die Zellzahl reduziert, wodurch in diesen Tieren auch die Imaginalgewebe betroffen sind und somit die Metamorphose gestört ist. In CHICO dagegen ist nur die Zellgröße betroffen, weshalb sich dort die Imaginalscheiben entwickeln können, aber in der Größe reduziert sind. Dies reflektiert auch den Unterschied im Bedarf von Kohlenhydraten und Aminosäuren. Kohlenhydrate scheinen vor allem für den Energiehaushalt benötigt zu werden, während Aminosäuren für die Funktion des Stoffwechsels wichtig sind.

Speziell in Insektenlarven ist es interessant, wie die Größe der einzelnen Organe in den verschiedenen Geweben, endoreplikative Larvengewebe und mitotische Imaginalgewebe, reguliert wird und inwiefern äußere Bedingungen wie das Nahrungsangebot die Organgröße beeinflussen können. Das Verhältnis von Organgröße zu Größe des gesamten Organismus oder die Größe einzelner Organe nach Ende des Wachstums zueinander wird statische Allometrie genannt (Stern und Emlen, 1999). Für die Regulation von statischer Allometrie werden verschiedene Modelle diskutiert.

## 1.2 Modelle für die Kontrolle von statischer Allometrie

Die Größe eines Organs scheint sowohl in Insekten als auch in Vertebraten genetisch festgelegt und unabhängig von der Zellzahl zu sein (Stern und Emlen, 1999). In einem klassischen Transplantationsexperiment wurden in zwei verschieden großen Axolotl-Arten (*Amblystoma punctatum* und *A. trigrinum*) im Schwanzknospen-Stadium die linken vorderen Gliedmaßen-Anlagen reziprok vertauscht (Twitty und Schwind, 1931). Dabei wuchsen die transplantierten Gliedmaßen zu einer Größe heran, wie sie der im Spenderorganismus entsprächen (Abb 1.2). Das Wachstum wurde also nicht vom neuen Organismus beeinflusst. In *Drosophila* zeigte Lewis (1978) dieses unabhängige Organwachstum mit Untersuchungen an homeotischen Mutanten. Einen weiteren Beweis erbrachten Bryant und Simpson (1984), indem sie Imaginalscheiben transplantierten, die selbst in Wachstums-hemmender Umgebung (Abdomen von erwachsenen Weibchen) zu einer normalen Größe heranwuchsen. Um nun die



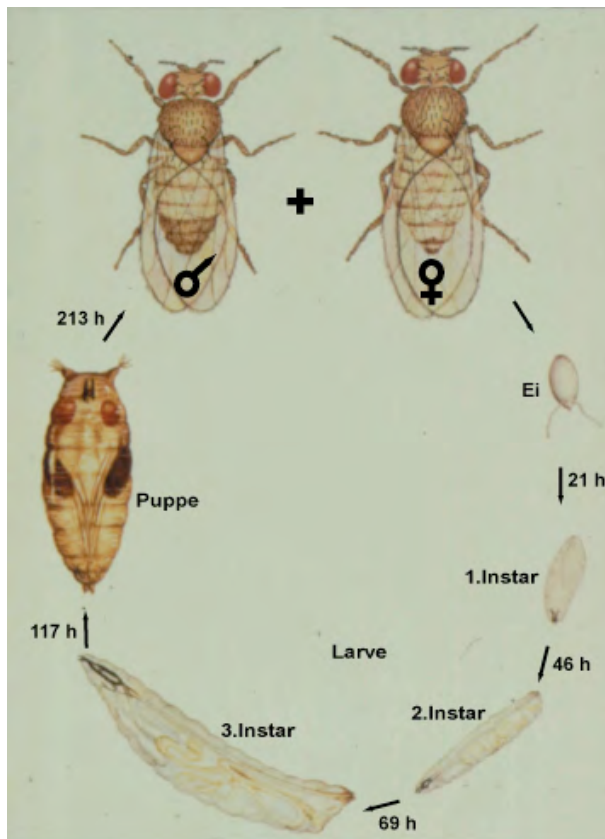
**Abb 1.2** Wirbeltierorgane enthalten eine autonome Größeninformation. Man beachte die transplantierten Vordergliedmaßen (*gr.*). Links *Amblystoma punctatum*, rechts *Amblystoma trigrinum*. Nach Twitty und Schwind (1931).

statische Allometrie zu regulieren, müssen auch äußere Einflüsse wie das Nahrungsangebot berücksichtigt werden. Hungert man Insektenlarven, so wird das Wachstum des Larvengewebes (endoreplikativ) eingestellt, während sich mitotische Imaginalgewebe weiterteilen (Britton und Edgar, 1998).

Das erste Modell geht davon aus, dass Informationen über Vorräte und/oder Körpergröße in ein Signal umgesetzt werden, das kontinuierlich oder in definierten Wachstumsphasen direkt die Organgröße steuert. Hierbei spielen vielleicht auch Entwicklungshormone wie das prothorakotrope Hormon (PTTH) und Ecdyson eine Rolle. Neben ihrer Kontrolle der Larvalentwicklung und der Metamorphose wurde auch über ihre Einflüsse auf das Wachstum von Imaginalscheiben berichtet (Überblick

bei Stern und Emlen, 1999). Hormone könnten also als Vermittler von äußeren und inneren Signalen wie Mitogenen (Kawamura et al., 1999) oder Nährstoff-abhängigen Signalen aus dem Fettkörper (Britton und Edgar, 1998; Zinke et al., 1999) das Organwachstum mitregulieren.

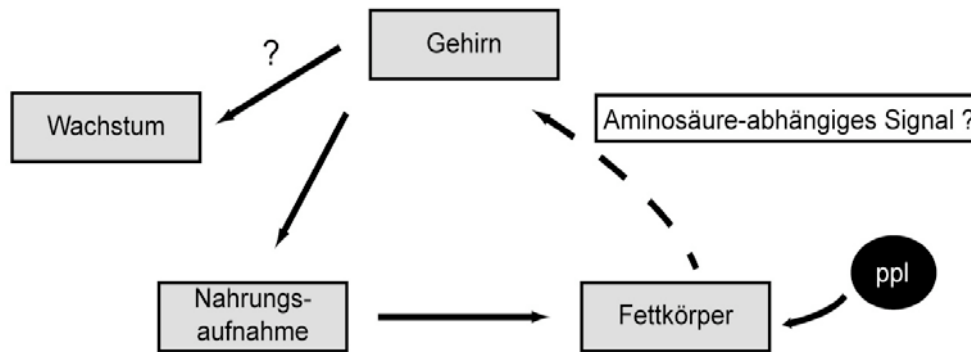
Das zweite Modell geht davon aus, dass das Wachstum der einzelnen Organe direkt von Nährstoffen abhängig ist, dass aber die Organe miteinander direkt oder durch Hormone vermittelt kommunizieren und so ihr Wachstum gegenseitig beeinflussen. Hinweise, die dieses Modell unterstützen, kommen von Untersuchungen, bei denen gezeigt wurde, dass Imaginalscheiben das endokrine System beeinflussen. Besonders Imaginalscheiben, die noch im Wachsen begriffen sind, verhindern die Metamorphose. Dabei wird vor allem die Ecdyson-Produktion unterdrückt. Dies könnte ein wichtiger Feedback-Mechanismus sein, um die Entwicklung aller wachsenden Gewebe miteinander zu koordinieren (Zitnan et al., 1993). Um nun Gene zu identifizieren und zu untersuchen, die bei der Kontrolle von Wachstum und statischer Allometrie, aber auch von Fressverhalten eine Rolle spielen, sind *Drosophila*-Larven als Modellsystem sehr gut geeignet. Sie fressen ununterbrochen bis kurz vor der Verpuppung und ihre Masse nimmt in dieser kurzen Phase um das ungefähr 200-fache zu (Abb 1.3).



**Abb 1.3** Der *Drosophila*-Lebenszyklus. Man beachte das starke Wachstum innerhalb weniger Tage in der Larven-Entwicklung. Die Zeiten sind für eine Entwicklung bei 25 °C angegeben. h, Stunden.

### 1.3 Ein Aminosäure-abhängiges Signal beeinflusst Nahrungsaufnahme und Wachstum

Um in *Drosophila* Gene zu identifizieren, die bestimmte Funktionen haben, bietet sich besonders die Suche nach Mutanten an. Eine Mutante, in der die verschiedenen besprochenen Aspekte - Nahrungsaufnahme, Fressverhalten und Wachstum - betroffen sind, ist *pumless* (*ppl*). Die *ppl*-Mutante wurde bei einer Suche nach Larven mit Fressdefekten isoliert (Zinke et al., 1999). Dabei wurden ungefähr 1000 lethale P-Element-Linien mit gefärbtem Futter auf Schluckdefekte hin untersucht. Neben diesem Defekt bei der Nahrungsaufnahme zeigten *ppl*-Larven ein gebremstes Larvenwachstum (Abb 1.1 c), das vergleichbar mit dem Phänotyp in *dTOR*- und *CHICO*-Mutanten war. Außerdem zeigen sie ein Verhalten, das in Wildtyp-Tieren erst kurz vor der Verpuppung zu beobachten ist, ein Wanderverhalten. Dabei verlassen die Larven in einem frühen Stadium die Futterquelle und wandern umher. Das *ppl*-Gen wird ausschließlich im Fettkörper exprimiert und codiert für eine Untereinheit des Glycin-Spaltsystems, einem



**Abb 1.4** Modell für die Rolle von Aminosäuren bei der Nahrungsaufnahme und beim Wachstum in *Drosophila*-Larven. Nach Zinke et al. (1999).

Enzym, das am Abbau von freiem Glycin beteiligt ist. Es wurde auch gezeigt, dass das Füttern von hohen Aminosäure-Konzentrationen an Wildtyp-Larven diesen *ppl*-Fressdefekt kopieren kann und dass es dabei zu einer Konzentrations-abhängigen Verzögerung der Verpuppung kommt. Aufgrund dieser Untersuchung wurde die Hypothese aufgestellt, dass es ein Aminosäure-abhängiges Signal aus dem Fettkörper gibt, welches im Gehirn das Beenden der Nahrungsaufnahme vermittelt und welches vielleicht auch für den Wachstumsdefekt verantwortlich ist (Abb 1.4).

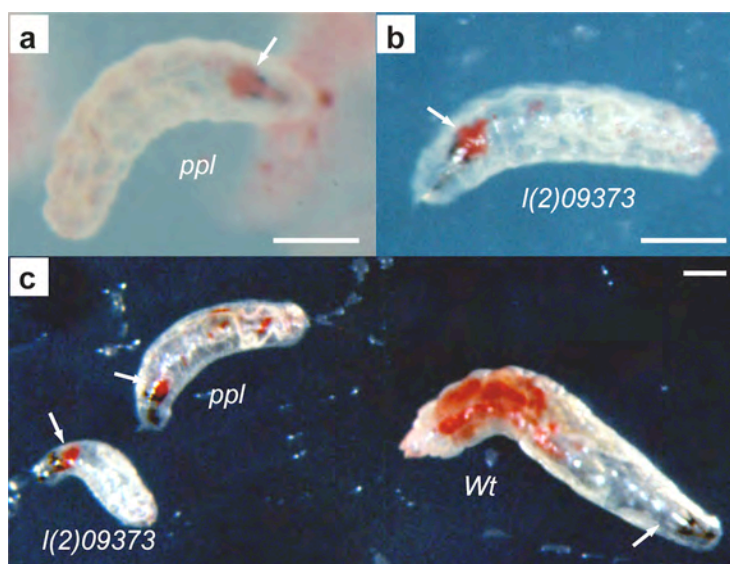
In dem Screen nach Mutanten mit Nahrungsaufnahme-Defekten wurden weitere P-Element-Linien isoliert, in denen der Phänotyp dem in *ppl* sehr ähnlich war. Mutationen, die ähnliche Phänotypen zeigen, betreffen oft Gene, die in ähnlichen Stoffwechselwegen eine Rolle spielen. Die Zielsetzung meiner Dissertation war es, den Phänotyp einer solchen Nahrungsaufnahme-Mutante zu charakterisieren, die zunächst *pumpless III* genannt wurde, und das mutierte Gen zu identifizieren und molekularbiologisch zu untersuchen. Erste Untersuchungen während meiner Diplomarbeit hatten gezeigt, dass in dieser Linie die P-Element-Insertion eine Deletion unbekanntes Ausmaßes verursacht hatte (Zinke, 1999). Durch die Identifizierung dieses Gens sollte ein weiterer Baustein gefunden werden, um die von uns aufgestellte Arbeitshypothese auszubauen.





## 2 Ergebnisse

Die Larvenphase von *Drosophila* ist charakterisiert durch ununterbrochene Nahrungsaufnahme und durch starkes Wachstum. Bei der zuvor besprochenen Suche nach Mutanten mit Nahrungsaufnahmedefekten (siehe Einleitung) wurde neben der *pumpless*-Mutante (Zinke et al., 1999; Zinke 1999) eine weitere P-Element-Linie isoliert: *l(2)09373*. Auf den ersten Blick glichen sich der *ppl* (*ppl*-Larven) und der *l(2)09373/l(2)09373* Phänotyp (*l(2)09373*-Larven). Beide zeigten einen Defekt bei der Nahrungsaufnahme und einen Defekt beim Wachstum (Abb 2.1). Der Schluckdefekt schien in beiden Fällen dadurch zu entstehen, dass die Nahrung den Pharynx nicht passieren konnte, wobei in beiden Fällen kein Verschluss des Oesophagus vorlag (Zinke et al., 1999; nicht gezeigte Beobachtung). Ebenfalls in beiden Linien starben jene Larven, die diesen Fressdefekt zeigten, ohne sich zu verpuppen (spätes zweites Instar). Außerdem zeigten beide ein sogenanntes Wanderverhalten (Zinke et al., 1999; Zinke 1999) und beide ließen, verglichen mit der heterozygoten Situation, ein Wachstumsdefizit erkennen. Bei genauerer Betrachtung wurden allerdings einige Unterschiede festgestellt. Während *ppl*-Larven ungefähr zwölf Stunden nach dem Schlüpfen den Fressdefekt zeigten, wurde dieser in *l(2)09373*-Larven schon nach zwei bis drei Stunden, kurz nach der ersten Nahrungsaufnahme, sichtbar. Aufgrund dieses Nahrungsaufnahmedefekts, der mit rot gefärbter Hefe sichtbar gemacht wurde, wurde dieser Phänotyp „rotkehlchen“ (*rot*) genannt.

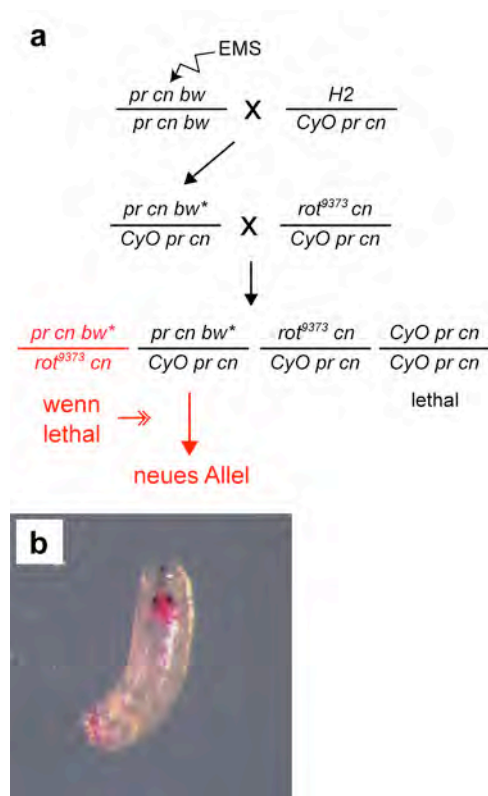


**Abb 2.1** Nahrungsaufnahmedefekte in *Drosophila*-Larven  
**(a)** *pumpless*-Larve (*ppl*).  
**(b)** Der rotkehlchen-Phänotyp in *l(2)09373*.  
**(c)** Größenvergleich von *ppl* und *l(2)09373* mit einer Wildtyp-Larve (*Wt*). Alle Tiere befanden sich im zweiten Instar. Die Nahrungsaufnahme wurde mit rot gefärbter Hefe sichtbar gemacht. Die Pfeile deuten auf den Pharynx, in dem der Fressdefekt deutlich wurde. Die Größenmarke entspricht 0,5 mm.

Weil die P-Element-Insertion in *I(2)09373* (*rot*<sup>9373</sup>) eine Deletion unbekannten Ausmaßes verursacht hatte (Zinke, 1999), sollten mit einem Ethyl-Methan-Sulfonat (EMS) Mutagenese-Screen *rot*-Allele erzeugt werden, die eine Punktmutation im *rotkehlchen*-Lokus haben.

## 2.1 Neue *rot*-Allele aus einem EMS Mutagenese-Screen

EMS verursacht G•C zu A•T Transitionen (Coulondre und Miller, 1977) und wird schon seit vielen Jahren für die Mutagenese in *Drosophila* verwendet. In



**Abb 2.2** Isolierung neuer *rot*-Allele durch einen EMS-Mutagenese-Screen. **(a)** EMS-Mutagenese (EMS) und Kreuzungsschema des Screens. Wurden in den Nachkommen der *pr cn bw*<sup>\*</sup>/*CyO pr cn* X *rot*<sup>9373</sup>/*CyO pr cn*-Kreuzung keine *Cy*<sup>+/+</sup>-Fliegen gefunden, konnte ein neues Allel isoliert werden. Der Stern (\*) zeigt ein mutagenisiertes Chromosom an. **(b)** Der *rotkehlchen*-Phänotyp in *rot*<sup>60</sup>. *H2*, *Pka-C1*<sup>H2</sup>.

diesem Fall war es möglich, nach Mutanten zu suchen, welche die Deletion in *rot*<sup>9373</sup> nicht zum adulten Stadium komplementierten. Da der *rot*-Lokus auf dem zweiten Chromosom liegt, konnte der Mutagenese-Screen entsprechend mit Markern und Balancern für dieses Chromosom geplant werden (Abb 2.2 a; Fliegenstämme und Details 4.6 und 5.4.2). Zunächst wurden *pr cn bw*-Männchen mit EMS behandelt und dann durch Kreuzung das möglicherweise mutagenisierte *pr cn bw*-Chromosom (*pr cn bw*<sup>\*</sup>) mit dem *CyO pr cn*-Balancer stabilisiert. Ungefähr 5800 Männchen des Genotyps *pr cn bw*<sup>\*</sup>/*CyO pr cn* wurden dann einzeln mit Weibchen des Genotyps *rot*<sup>9373</sup>/*CyO pr cn* gekreuzt. In der ersten Nachkommengeneration dieser Kreuzung wurden zehn Linien isoliert, in denen *rot*<sup>9373</sup> nicht komplementiert wurde. In diesen Linien wurde also der Genotyp *pr cn bw*/*rot*<sup>9373</sup> (Phänotyp: Wildtyp-Flügel) nicht

gefunden und somit musste eine Punktmutation im Bereich der *rot*<sup>9373</sup>-Deletion vorliegen. Für alle so isolierten neuen Allelen-Linien wurde der Genotyp *pr cn bw*<sup>\*</sup>/*CyO pr cn* etabliert (Abb 2.2 a).

Um zu testen, ob die Mutation 100% lethal über  $rot^{9373}$  ist, wurden alle zehn etablierten Linien nochmals mit  $rot^{9373}/CyO\ pr\ cn$  gekreuzt (Tab 2.1). In zwei

	$pr\ cn\ bw /$ $CyO\ pr\ cn$	$rot^{9373} /$ $CyO\ pr\ cn$	$pr\ cn\ bw /$ $rot^{9373}$
<b>1</b>	6 / 4	50 / 39	0 / 0
<b>2</b>	46 / 54	51 / 59	0 / 0
<b>26</b>	60 / 45	42 / 69	0 / 0
<b>60</b>	55 / 51	51 / 62	0 / 0
<b>70</b>	40 / 32	45 / 36	5 / 2
<b>76</b>	35 / 30	31 / 27	0 / 0
<b>91</b>	23 / 27	40 / 69	0 / 0
<b>98</b>	9 / 11	10 / 15	0 / 1
<b>104</b>	66 / 48	44 / 48	0 / 0
<b>106</b>	30 / 36	29 / 38	16 / 27

**Tab 2.1** Testrückkreuzung der aus dem EMS Mutagenese-Screen etablierten Fliegenlinien.

Gekreuzt wurden jeweils  $pr\ cn\ bw/CyO\ pr\ cn$ -Männchen mit  $rot^{9373}/CyO\ pr\ cn$ -Weibchen. In der obersten Zeile sind die zu erwartenden Genotypen aufgeführt (CyO/CyO fehlt, da 100% lethal), in der ersten Spalte die Liniennummern. Die Zahlen zeigen die Anzahl geschlüpfter Tiere (Weibchen / Männchen) des entsprechenden Genotyps. Gezählt wurde für Linie 98 vier Tage lang (nach Beginn des Ausschlüpfens), für Linie 70 acht Tage lang, für die Linien 1, 26, 76 und 106 neun Tage lang und für die Linien 2, 60, 91 und 104 zehn Tage lang.

der zehn Linien (70 und 98) wurden wenige Adulte des Genotyps  $pr\ cn\ bw*/l(2)09373$  gefunden (4% bzw. 2%), in Linie 106 hingegen viele Adulte (24%). Die sieben anderen zeigten 100% Lethalität für diesen Genotyp (Details in Tab 2.1). Parallel dazu wurden Kreuzungen angesetzt, um zu testen, ob die isolierten Linien einer oder mehreren Komplementationsgruppen zuzuordnen sind, ob also im  $rot^{9373}$ -Deletionsbereich in den zehn Linien immer dasselbe Gen oder

verschiedene Gene durch eine Mutation betroffen sind. Durch Erzeugung von transheterozygoten Tieren für diese Allele konnte überprüft werden, ob in den einzelnen Linien dasselbe Gen mutiert war. Dazu wurden sowohl Männchen als

	$pr\ cn\ bw /$ $pr\ cn\ bw$		$pr\ cn\ bw /$ $CyO\ pr\ cn$	
<b>1</b>	20	23	45	61
<b>2</b>	0	0	106	102
<b>26</b>	0	0	62	21
<b>60</b>	0	0	111	117
<b>70</b>	33	23	70	60
<b>104</b>	0	0	72	117
<b>106</b>	30	53	104	109

**Tab 2.2** Transheterozygotenkreuzung mit Linie 76.

Gekreuzt wurden sowohl Männchen als auch Weibchen der Linie 76 mit den in der ersten Spalte aufgeführten Linien. In der ersten Zeile die zu erwartenden Genotypen (CyO/CyO fehlt, da 100% lethal) in der F1-Nachkommengeneration. Die Zahlen geben die Anzahl geschlüpfter Tiere an (erste Zahl aus Kreuzungen mit Linie 76 Weibchen, zweite Zahl aus Kreuzungen mit Linie 76 Männchen). Ausgezählt wurde sechs Tage lang nach Beginn des Ausschlüpfens.

	$pr\ cn\ bw /$ $pr\ cn\ bw$		$pr\ cn\ bw /$ $CyO\ pr\ cn$	
<b>1</b>	0	0	75	95
<b>2</b>	55	40	142	116
<b>26</b>	29	19	118	63
<b>60</b>	49	66	123	124
<b>70</b>	0	0	113	154
<b>76</b>	46	56	123	103
<b>104</b>	62	34	129	113

**Tab 2.3** Transheterozygotenkreuzung mit Linie 106.

Ausgezählt wurde sieben Tage lang nach Beginn des Ausschlüpfens. Ansonsten wie Tabelle 2.2.

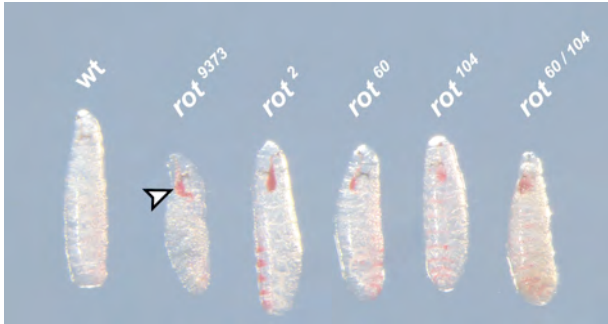
auch Weibchen der Linien 76 und 106 (es standen von diesen Linien am meisten Adultelfür Kreuzungen zur Verfügung) mit den Linien 1, 2, 26, 60, 70, 104 und auch gegeneinander gekreuzt (Tab 2.2 und 2.3). Aus diesen Kreuzungen ging eindeutig hervor, dass zwei Komplementationsgruppen vorlagen: die Lethalität in Linie 76 wurde nicht durch die Linien 2, 26, 60 und 104 komplementiert und die in Linie 106 nicht durch die Linien 1 und 70. Für diese Kreuzungen wurde also der Genotyp *pr cn bw/pr cn bw* nicht gefunden. Eine spätere Untersuchung der Linien 91 und 98 ergab, dass diese zur Gruppe mit den Linien 1, 70 und 106 gehören.

Nun sollte die Frage geklärt werden, ob eine der beiden Gruppen dem *rot*-Lokus zugeordnet werden kann. Dazu wurden die Linien mit gefärbter Hefe gefüttert, um deren Fressverhalten untersuchen zu können. In den Linien 2, 60 und 104 konnte der *rot*-Phänotyp (Fressdefekt) beobachtet werden (Abb 2.2 b). Somit wurde diese Gruppe dem *rot*-Lokus zugeordnet. Dies war konform mit den Ergebnissen der Rückkreuzungen, in denen adulte Ausreißer nur für die andere Gruppe gefunden wurden. Die neuen *rot*-Allele wurden daraus abgeleitet wie folgt benannt: *rot*<sup>2</sup>, *rot*<sup>26</sup>, *rot*<sup>60</sup>, *rot*<sup>76</sup> und *rot*<sup>104</sup>. Der nächste Schritt war nun, den *rot*-Phänotyp in den neuen Allelen näher zu charakterisieren.

## 2.2 Der *rotkehlchen*-Phänotyp ist charakterisiert durch Nahrungsaufnahme- und Wachstumsdefekte

Zunächst musste ein Marker gefunden werden, durch den es möglich war, im Larvenstadium homozygote von heterozygoten *rot*-Allelen zu unterscheiden. Dazu wurde ein Balancer (Green Balancer, *GB*) benutzt, der das Green Fluorescent Protein (GFP) unter der indirekten, Gal4-UAS-vermittelten Kontrolle des *Krüppel*-Promotors exprimiert (Casso et al., 1999). Mit Hilfe dieses Balancers konnten heterozygote, fluoreszierende von homozygoten, nicht fluoreszierenden *rot*-Larven unterschieden werden. Die Analyse wurde auf die Allele *rot*<sup>2</sup>, *rot*<sup>60</sup> und *rot*<sup>104</sup> konzentriert, da diese den Fressdefekt zeigten. Der Phänotyp des Originalallels *rot*<sup>9373</sup> wurde nicht weitergehend analysiert, da hier mehrere Faktoren (weitere Gene in der Deletion) den Phänotyp beeinflussen konnten.

Nicht alle homozygoten *rot*-Larven zeigten den Fressdefekt. Der Phänotyp konnte in zwei Kategorien einordnet werden: in der ersten Kategorie trat der Fressdefekt auf, während er in der zweiten Kategorie nicht beobachtet wurde. Die

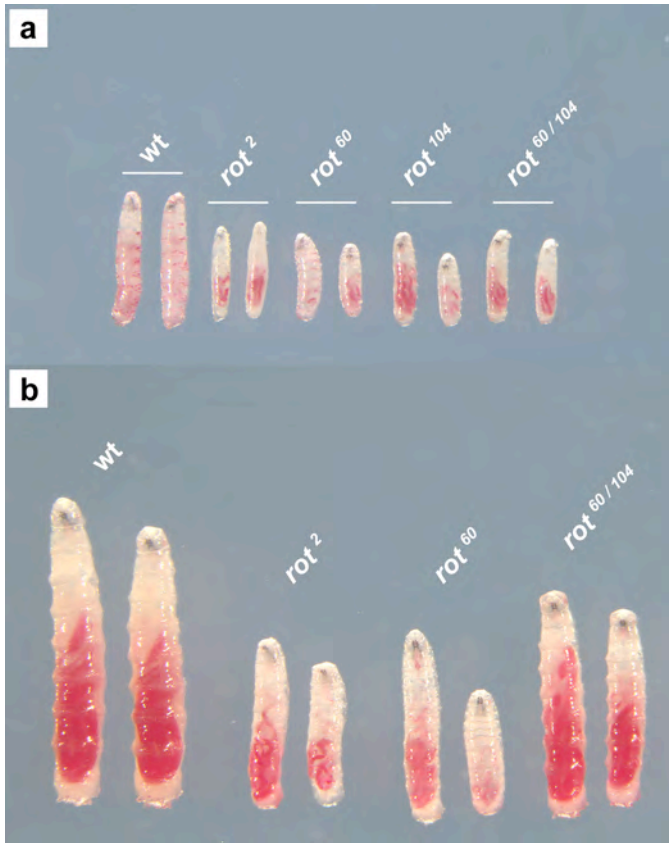


**Abb 2.3** Der Fressdefekt definiert die erste Kategorie des *rot*-Phänotyps. Mit rot gefärbter Hefe wurden Wildtyp-Larven (wt) mit verschiedenen *rot*-Allelen und *rot*-THZ im frühen ersten Instar verglichen. Der Pfeilkopf deutet auf die Futterakkumulation im Pharynx, die auch in den anderen Allelen sichtbar ist.

Untersuchung zeigte, dass für *rot*<sup>60</sup> und *rot*<sup>104</sup> ungefähr ein Drittel, dagegen für *rot*<sup>2</sup> weniger als 10% der homozygoten Larven den Fressdefekt hatten (Abb 2.3). Auch transheterozygote (THZ) Linien zeigten den Fressdefekt (Abb 2.3). In diesem Fall wurden an *rot*<sup>60</sup>/*rot*<sup>104</sup> etwa ein Drittel, an *rot*<sup>2</sup>/*rot*<sup>60</sup> und *rot*<sup>2</sup>/*rot*<sup>104</sup> etwa 20% der THZ der Fressphänotyp beobachtet. Larven der ersten

Kategorie (sowohl in den drei *rot*-Allelen als auch in den THZ) sterben im ersten Instar. Nur einige Larven dieser Kategorie, bei denen trotz Fressdefekts etwas Futter im Mitteldarm sichtbar war, erreichten das zweite Instar und starben erst dann. Hier stellte sich die Frage, ob der Fressdefekt durch einen Verschluss des Oesophagus entstand. Sowohl die Untersuchung getöteter Larven, die den Fressdefekt zeigten und bei denen durch Druck von außen das Futter in den Oesophagus gelangen konnte, als auch die Tatsache, dass bei einigen der Larven mit Fressdefekt etwas Futter im Mitteldarm zu erkennen war, verdeutlichte, dass kein Verschluss des Oesophagus in diesen Allelen vorlag.

Einen weiteren Aspekt des *rot*-Phänotyps wurde bei der Untersuchung der zweiten Kategorie der homozygoten *rot*-Allele deutlich, die keinen Fressdefekt erkennen ließen. Schon am Ende des ersten Instar war verglichen mit Wildtyp-Larven ein signifikanter Größenunterschied zu erkennen (dies traf auch für Larven der ersten Kategorie zu). Die *rot*-Allele zeigten ein deutlich gebremstes Wachstum (Abb 2.4 a). Für alle Allele außer *rot*<sup>104</sup> sowie für alle THZ galt, dass die meisten Larven, die nur den Wachstumsdefekt zeigten, das dritte Instar erreichten (Abb 2.4 b) und sich mit Verzögerung verpuppten. In homozygoten *rot*<sup>60</sup> verpuppten sich 31 % der Larven mit Wachstumsdefekt (zweite Kategorie; in *rot*<sup>60</sup>/*GB*-Kontroll-Tieren 85 %) zwischen Tag sechs und Tag zehn nach Eiablage, also mit ein bis fünf Tagen Verzögerung verglichen zu Kontroll-Tieren. In *rot*<sup>104</sup> dagegen erreichte kein homozygotes Tier das dritte Instar.



**Abb 2.4** Der Wachstums-Defekt definiert die zweite Kategorie des *rot*-Phänotyps.

**(a)** Larven des zweiten Instar. **(b)** Larven des dritten Instar.

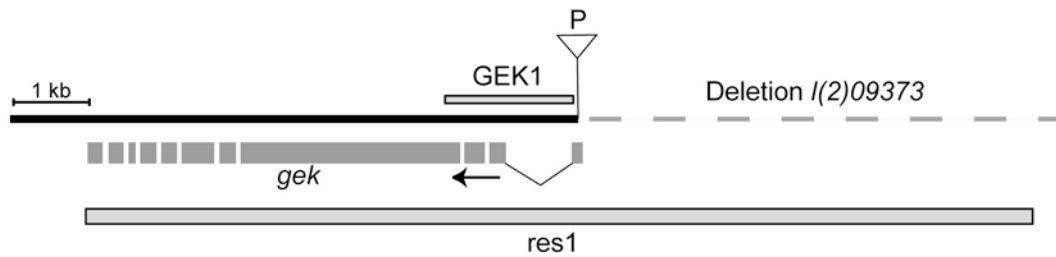
Verglichen wurden Wildtyp-Larven (wt) mit verschiedenen *rot*-Allelen und *rot*-THZ. Rot gefärbte Hefe macht sowohl in Wildtyp-Larven als auch in *rot*-Allelen und *rot*-THZ deutlich, dass bei diesen Tieren Nahrung in den Mitteldarm gelangen kann. Die Larven in (a) und (b) sind in der gleichen Vergrößerung dargestellt.

Der *rotkehlchen*-Phänotyp zeigte also zwei Aspekte: zum einen einen Nahrungsaufnahmedefekt und zum anderen, direkt oder indirekt mit dem ersten verbunden, ein Wachstumsdefizit. Dabei musste berücksichtigt werden, dass mit der Methode, das Futter anzufärben, nicht untersucht werden konnte, wieviel Futter ein Tier fraß. Ausgehend davon, dass in den EMS-Allelen von *rot* nur ein Gen betroffen war, sollte der genomische Bereich, in dem der *rot*-Lokus liegt, charakterisiert werden.

### 2.3 Molekulare Charakterisierung des *rot*-Lokus

Startpunkt für die Charakterisierung des *rot*-Lokus waren die Untersuchungen aus der vorangegangenen Diplomarbeit (Abb 2.5; Zinke, 1999). In der *flybase*-Datenbank (Flybase, 1999) konnte die genomische Sequenz, die am 3'-Ende des in *rot*<sup>9373</sup> inserierten *P{PZ}*-Elements anschließt, identifiziert werden. Das P-Element inserierte in den 5'-nichttranslatierten Bereich (erstes Exon) des *Genghis Khan* Gens (*gek*) (Luo et al., 1997) und verursachte eine Deletion stromaufwärts von *gek*. Luo und Kollegen benutzten eine transgene





**Abb 2.5** Der genomische P-Element-Insertionsbereich in *I(2)09373*. Der in *I(2)09373* deletierte Bereich ist gestrichelt dargestellt. Das *gek*-Gen wird mit allen Exons (dunkelgraue Balken) und Introns gezeigt. Die P{PZ}-Insertion (P) traf Exon 1 des *gek*-Gens und deletierte den Bereich stromaufwärts davon (rechts). Der Pfeil zeigt die Orientierung des *gek*-Gens. Der untere hellgraue Balken (*res1*) repräsentiert den genomischen Bereich, den die Linie *T35* als Transgen enthält. GEK1 wurde als DNS-Sonde im Screen der genomischen  $\lambda$ -Phagen-Bibliothek verwendet. Kb, Kilobasenpaare.



**Abb 2.6** Rettung des *rot*-Phänotyps. Links eine vom Gehäuse freipräparierte Wildtyppuppe (Wt). Rechts eine weiße Puppe, die den Rettungs-Phänotyp darstellt (*res1*). Der schwarze Fleck stammt von der Präparation.

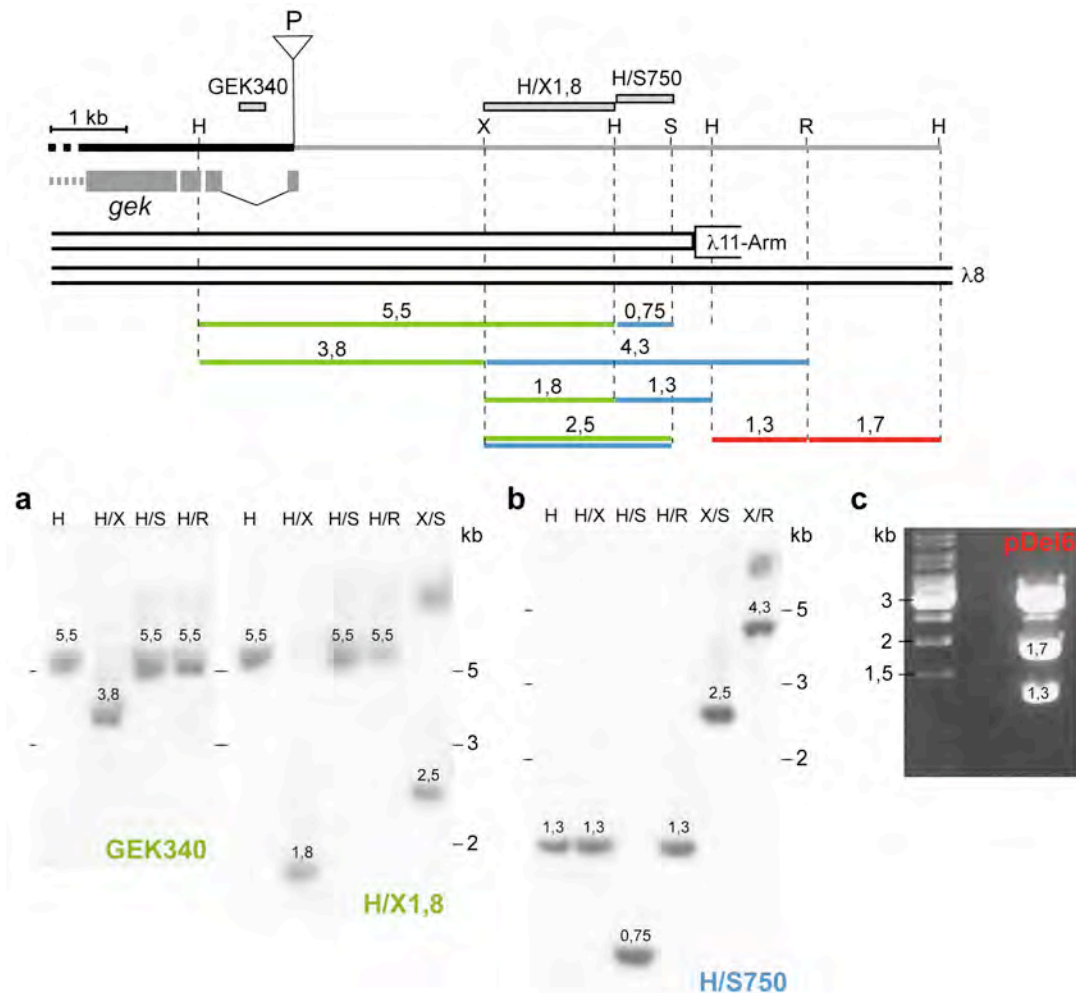
Fliegenlinie (*T35*) mit einem 12,5 Kilobasenpaar (kb) überspannenden genomischen Bereich, um den in *gek*-Mutanten beobachteten Phänotyp zu retten. Dieses Konstrukt (*res1*) enthielt den 6,5 kb Bereich, der den kompletten *gek*-Lokus überspannte, und 6 kb des genomischen Bereichs stromaufwärts von *gek* (Abb 2.5). Es stellte sich die Frage, ob dieses Konstrukt den Fressphänotyp in *rot<sup>9373</sup>* retten könnte. Die *T35*-Linie wurde von Liquun Luo zur Verfügung gestellt. Mit ihr wurde eine Linie des Genotyps *rot<sup>9373</sup>/CyO ; T35/T35* etabliert. Die *inter-se*-Kreuzung dieser Linie verglichen mit der *inter-se*-Kreuzung von *rot<sup>9373</sup> (rot<sup>9373</sup>/CyO ; +/+)* zeigte, dass der Fress- und Wachstumsphänotyp durch *T35* gerettet wurde. Die Rettung reicht jedoch nicht bis ins Adultstadium, da keine *Cy<sup>+/+</sup>*-Fliegen in der Nachkommenschaft gefunden wurden. Auffällig in der Rettungskreuzung waren die sich nicht weiterentwickelnden frühen Puppenstadien (weiße Puppen), die den Rettungs-Phänotyp repräsentierten (Abb 2.6).

Dieses Ergebnis warf die Frage auf, welcher Abschnitt von *res1*, das *gek*-Gen oder ein unbekannter Faktor im 6 kb Bereich stromaufwärts von *gek*, für die Rettung des Fressdefekts verantwortlich war. Zur näheren Untersuchung des genomischen Abschnitt stromaufwärts von *gek* wurde zunächst mit einer 1,75 kb DNS-Sonde (GEK1; Abb 2.5), die einen genomischen Abschnitt vom ersten bis vierten Exon des *gek* Gens überspannt und die 66 Basenpaare (bp) von der P-Element Eintrittsstelle entfernt beginnt, eine  $\lambda$ -Phagen-Bibliothek aus genomischer

*Drosophila*-DNS durchsucht. Nach drei Screen-Runden wurde mit zwei positiven Klonen weitergearbeitet (□8 und □11).

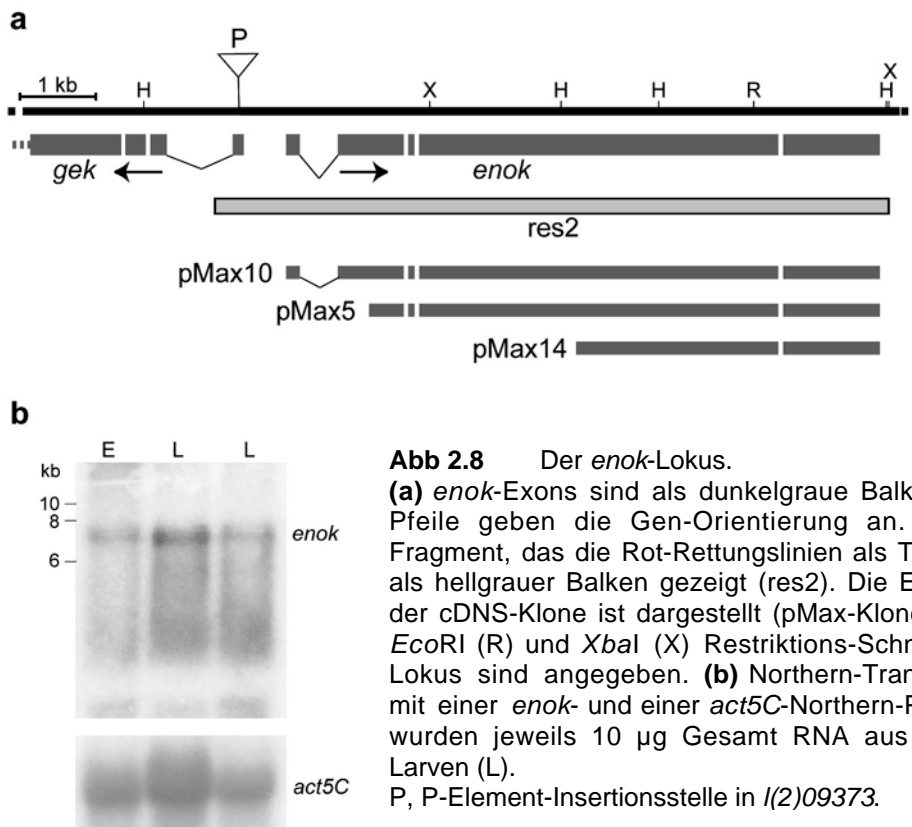
Um in diesen □-Klonen genomische Bereiche stromaufwärts von *gek* identifizieren und klonieren zu können, wurden Restriktionsenzym-Analysen und Southern-Transfer-Hybridisierungen durchgeführt. Startpunkt war eine *HindIII*-Schnittstelle im dritten Exon von *gek* (Abb 2.7). Mit einer DNS-Sonde (GEK340) aus dem ersten Intron von *gek* wurde eine erste Restriktionsenzym-Karte mit den Enzymen *HindIII*, *XbaI*, *EcoRI* und *SalI* erstellt (Abb 2.7 a). Um über die 5,5 kb von der Start-*HindIII*-Stelle gefundene, stromaufwärts von *gek* gelegene *HindIII*-Stelle hinauszukommen, wurde eine weitere DNS-Sonde (H/X1,8) benutzt, mit deren Hilfe eine *SalI*-Stelle identifiziert wurde. Sowohl das 3,8 kb *HindIII*-*XbaI*-Fragment (pDel1) als auch das 2,5 kb *XbaI*-*SalI*-Fragment (pDel2) wurden subkloniert und sequenziert. Diese Analysen wurden mit Klon □11 durchgeführt. Wie in Abb 2.7 dargestellt, endete das Insert dieses Klons aber ungefähr 300 bp hinter der erwähnten *SalI*-Stelle. Daher wurde Klon □8 für weitere Experimente verwendet. Im Vergleich der *HindIII*-Schnittmuster von □11 und □8 war zu sehen, dass in □11 das kürzeste Fragment die vorher erwähnte 5,5 kb-Bande war, während in □8 neben der 5,5 kb-Bande zwei kleinere Banden zu erkennen waren (3 kb und 1,3 kb). Es war also möglich, dass diese zwei Banden die genomischen *HindIII*-*HindIII*-Anschluss-Stücke repräsentierten. Das kleinere dieser beiden Fragmente wurde mit einer neuen DNS-Sonde (H/S750) identifiziert (Abb 2.7 b). Auch dieses 1,3 kb *HindIII*-*HindIII*-Fragment wurde subkloniert und sequenziert (pDel5). Die annotierte Sequenz aus den Sequenzierungen von pDel1, pDel2 und pDel5 (siehe 7.1) zeigte ein großes offenes Leseraster in die zu *gek* entgegengesetzte Richtung. Eine Suche nach homologen Sequenzen ergab, dass der Bereich von pDel2 und pDel5 für die spezielle Proteindomäne einer Histon-Acetyltransferasen-Familie kodierte (siehe unten). Weil das offene Leseraster am Ende von pDel5 noch nicht zu Ende war und weil die 6 kb aus res1 noch nicht erreicht waren, wurde das nächste Anschluss-Stück an die zuletzt gefundene *HindIII*-Stelle gesucht. Ein möglicher Kandidat war das zuvor erwähnte 3 kb *HindIII*-*HindIII*-Fragment aus □8. Mit der vorhergehenden Southern-Transfer-Analyse (Sonde H/S750) war in der *EcoRI*/*XbaI*-geschnittenen □8-DNS ein 4,3 kb-Fragment identifiziert worden, in dem eine Restriktionsschnittstelle (*EcoRI* oder *XbaI*) 1,3 kb hinter der





**Abb 2.7** Charakterisierung des genomischen Bereiches stromaufwärts von *gek*.  
**(a)**  $\lambda$ -11-DNS wurde mit verschiedenen Enzymkombinationen verdaut, aufgetrennt, transferiert und mit zwei DNS-Sonden (graue Balken) hybridisiert (GEK340, links; H/X1,8, rechts). Die zu den Signalen korrespondierenden genomischen Abschnitte sind grün dargestellt. Für beide DNS-Sonden wurde der gleiche Southern-Transfer verwendet **(b)** Wie in (a) wurde hier mit  $\lambda$ -8-DNS verfahren. Hybridisiert wurde mit der DNS-Sonde H/S750 (grauer Balken). Die zu den Signalen korrespondierenden genomischen Abschnitte sind blau dargestellt. **(c)** Der Verdau von pDel6 (siehe 4.7) mit H/R zeigte die zwei rot dargestellten Fragmente (1,3 und 1,7). Die Fragmentgrößen sind in Kilobasenpaaren (kb) angegeben. Die  $\lambda$ -Klone sind als weiße Balken dargestellt. Es sind nur Restriktions-Schnittstellen gezeigt, die in dieser Analyse identifiziert wurden. H, *HindIII*; P, P-Element-Insertionsstelle in *I(2)09373*; R, *EcoRI*; S, *SalI*; X, *XbaI*.

bekannten *HindIII*-Stelle liegen musste, also im möglichen 3 kb Anschluss-Stück. Der Restriktionsenzymverdau des subklonierten 3 kb *HindIII-HindIII*-Fragments (pDel6) mit *EcoRI* zeigte tatsächlich eine Teilung in ein 1,3 und ein 1,7 kb Fragment (Abb 2.7 c). Auch pDel6 wurde daraufhin sequenziert (siehe 7.1). Parallel dazu sollte für die weitere Analyse die cDNS zum identifizierten offenen Leseraster isoliert werden.

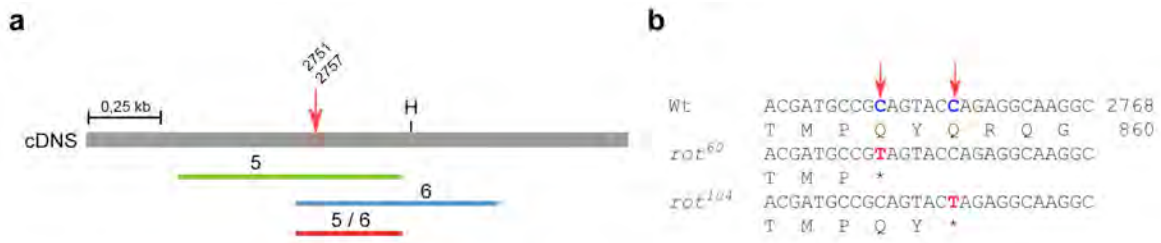


Hierzu wurde eine pNB40-cDNS Bibliothek (Brown und Kafatos, 1988) mit dem 2,5 kb *Xba*I-*Sal*I-Fragment aus pDel2 als Sonde durchsucht (X/S2,5). Nach drei Screen-Runden wurden drei positive cDNS-Klone isoliert: pMax5, pMax10 und pMax14. Eine Sequenzierung der jeweiligen 5'- und 3'-Enden zeigte, dass alle drei dasselbe 3'-Ende aufwiesen und dass pMax14 und pMax5 kürzere Klone waren, bei denen die cDNS-Transkription nicht vollständig war (Abb 2.8 a, wie der Name *enok* Zustande kommt, wird am Ende von Kapitel 2.4 erläutert). Der Vergleich der 5'- und 3'-Sequenz von pMax10 mit den genomischen Sequenzen aus pDel1, 2, 5 und 6 zeigte, dass pDel6 das Anschlussfragment war und dass pMax10 somit die vollständige cDNS des gefundenen Gens enthalten konnte. Eine Northern Transfer Hybridisierung mit dem *Xba*I-*Sal*I-Fragment aus pDel2 zeigte eine einzelne Bande bei ca. 7 kb (Abb 2.8 b). Deshalb wurden für den genomischen Bereich, den die vier sequenzierten pDel-Klone abdeckten und der zwischen 5'- und 3'-Ende von pMax10 lag, Oligonukleotide (Primer) entworfen. Diese wurden so kreiert, dass zwischen den Primerpaaren immer einen Abstand von ca. 800 bp bestand. Die 800 bp-Abschnitte wiederum überlappten sich immer um ca. 100 bp. Mit diesen Primern wurde pMax10 sequenziert (siehe 7.2). Die

Gesamt-cDNS hatte eine Länge von 7159 bp. Der Vergleich mit der genomischen Sequenz machte auch die Exon-Intron-Übergänge deutlich (Abb 2.8 a). Das Gen bestand aus fünf Exons (Exon 1: Nukleotid 1-182, Exon 2: 183-1051, Exon 3: 1052-1134, Exon 4: 1135-5879, Exon 5: 5880-7159). Das erste Exon war 5'-nicht-translatierter Bereich. Das Startcodon war an Position 189 im zweiten Exon. Das offene Leseraster codierte für 2291 Aminosäuren. Das Stopcodon TAA (*ochre*) war an Position 7062. Intron 1 (503 bp) war größer als die Introns 2, 3 und 4 (59 bp, 60 bp und 64 bp). Die 5'-Enden der Klone pMax5 und pMax14 lagen an Position 595 bzw. 3210 der Gesamt-cDNS, wodurch sich für diese Klone eine Länge von 6565 bp bzw. 3950 bp ergab. Nachdem nun der Bereich stromaufwärts von *gek* bekannt war und dort auch ein offenes Leseraster gefunden wurde, sollte als nächstes die Frage beantwortet werden, ob das neu entdeckte Gen oder *gek* für den *rot*-Phänotyp in Frage kam.

## 2.4 Identifizierung des für den *rot*-Phänotyp verantwortlichen Gens

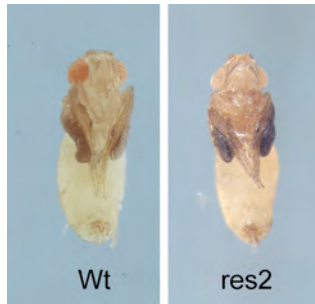
Um diese Frage zu klären, mussten zwei Untersuchungen vorgenommen werden. Zum einen sollte im neu charakterisierten Gen die durch EMS verursachte Punktmutation in den *rot*-Allelen gesucht werden und zum anderen sollte mit diesem Gen unter Zuhilfenahme von transgenen Fliegen der *rot*-Phänotyp gerettet werden. Für die Suche nach einer Punktmutation wurden die Allele *rot*<sup>60</sup> und *rot*<sup>104</sup> ausgewählt, da in ihnen der Fressphänotyp am häufigsten auftrat. Aus homozygoten Larven (erstes Instar), die den Fressdefekt zeigten, wurde genomische DNS isoliert. Mit den oben erwähnten Primern wurde der gesamte Bereich des neuen Gens aus dieser genomischen DNS als sich überlappende 800 bp-Abschnitte subkloniert und sequenziert. In einem Bereich, der von zwei unabhängigen Klonen abgedeckt wurde, wurde in beiden Allelen je eine Punktmutation gefunden (Abb 2.9 a). Die Sequenzierungen wurden mit unabhängigen Klonen aus Polymerase-Kettenreaktionen (PCRs) dreier Primerkombinationen (siehe Abb 2.9 a) mit unabhängigem Template wiederholt. In beiden Allelen wurde eine C•T-Transition identifiziert, die jeweils eine Nonsense-Mutation verursachte. In *rot*<sup>60</sup> fand die Transition an cDNS-Position 2751, in *rot*<sup>104</sup> an Position 2757 statt, was in beiden Fällen das Codon CAG für Glutamin (Q, Aminosäure 855 bzw. 857) in das Stopcodon TAG (*amber*) veränderte (Abb 2.9 b und c). In beiden Allelen, die in



**Abb 2.9** Identifizierung der durch EMS induzierten Punktmutationen in *rot*<sup>60</sup> und *rot*<sup>104</sup>. **(a)** Angegeben ist ein Ausschnitt der *enok*-cDNS, der von drei unabhängigen PCR-Fragment-Klonen aus *rot*<sup>60</sup> und *rot*<sup>104</sup> überlappend abgedeckt wird (5, prot60/104.05; 6, prot60/104.06; 5/6, prot60/104.05/06). Der rote Pfeil zeigt die Stellen, an denen die beiden Transitionen gefunden wurden (cDNS-Position 2751 bzw. 2757). Die aufgeführte *Hind*III-Stelle (H) entspricht der ersten *Hind*III-Stelle im vierten Exon von *enok* (siehe Abb 2.8). **(b)** Der Transitions-Lokus im *enok*-Gen. Angegeben sind cDNS-Position und Protein-Position in der *enok*-Sequenz. Die C•T-Transitionen sind durch rote Pfeile dargestellt. Hervorgehoben wird die Transition der Cytosin-Basen (blau) in der Wildtyp-Sequenz (Wt) zu Thymin-Basen (rot) in den *rot*-Allelen, die zu Nonsens-Mutationen (\*) führen.

ähnlicher Häufigkeit Mutanten mit Fressdefekt aufwiesen, wurde also eine Nonsens-Mutation an dicht benachbarten Stellen des Gens gefunden. Nur eine weitere, eher unwahrscheinliche Punktmutation in diesen Allelen im *gek*-Gen würde dieses noch für den *rot*-Phänotyp in Frage kommen lassen. Eine Rettung des *rot*-Phänotyps mit einem Konstrukt, das nur das neue Gen enthielt, konnte den Beweis erbringen, dass dieser Phänotyp durch eine Mutation in diesem Gen verursacht wurde.

Für die Herstellung transgener Fliegen wurden drei Rettungskonstrukte kloniert: pRot1, pRot2 und pRot3. Unter der Annahme, dass im genomischen Bereich zwischen erstem Exon von *gek* und erstem Exon des neuen Gens der Promotor lag, der dieses Gen aktivierte, wurden die Konstrukte geplant. Das 5'-Ende in allen drei klonierten Elementen war eine *Nsi*I-Stelle im ersten Intron von *gek* (Position 938, genomische Sequenz, siehe 7.1). In pRot1 und pRot2 war das 3'-Ende eine *Hind*III-Stelle (genomische Position 9808, Abb 2.8 a), die 185 bp hinter dem Stopcodon des neuen Gens lag. Diese beiden Plasmide unterschieden sich nur in der Art ihrer Klonierungsstrategie. Das 3'-Ende des dritten Konstrukts, pRot3, leitete sich von einer *Xba*I-Stelle an Position 9840 ab (res2, Abb 2.8 a). Alle drei genomischen Abschnitte wurden in den P-Element-Vektor pP{CaSpeR-4} ligiert und eine Keimbahn-Transformation durchgeführt (Spradling und Rubin, 1983). Für pRot1 wurden vier, für pRot2 eine und für pRot3 15 unabhängige transgene Linien etabliert. Zur Bestimmung des Chromosoms, auf dem die P-Element-Insertion stattfand, wurden genetische Standardkreuzungen



**Abb 2.10** Rettung des *rot*-Phänotyps in *rot*-Allelen.

Links eine vom Gehäuse freipräparierte Wildtyppuppe (Wt, wie Abb 2.6). Rechts eine Puppe, die den Rettungs-Phänotyp darstellt (*res2*). Auffällig sind die unpigmentierten Augen in *res2*.

mit verschiedenen Balancer-Linien durchgeführt. Für die Linien *Rot1*<sup>12C</sup> und *Rot3*<sup>26B</sup> wurde eine Insertion auf Chromosom 3 festgestellt, und deshalb diese Linien für die Rettungskreuzungen gewählt. Startpunkt für das Rettungsexperiment war für beide Linien der Genotyp *rot*<sup>60</sup>/*CyO* ; *res2/res2*, der *inter se* gekreuzt wurde. In der ersten Nachkommengeneration wurde in keiner Larve ein Fressdefekt oder eine Wachstumsverzögerung beobachtet. Allerdings wurde auch keine *Cy*<sup>+/+</sup>-Fliegen gefunden. Auffällig waren viele Puppen in einem sehr späten Entwicklungsstadium (kurz vor dem Schlüpfen) sowie Fliegen mit aufgebrochenem Puppengewebe und frisch geschlüpfte Fliegen, die vor dem Entfalten der

Flügel starben. Alle so auffällig gewordenen Tiere hatten unpigmentierte, weiße Augen (Abb 2.10). Dieser Phänotyp stellte den Rettungsphänotyp dar. Somit war bewiesen, dass das Gen, welches im genomischen Bereich identifiziert wurde, der in *rot*<sup>9373</sup> deletiert war, für den *rotkehlchen*-Phänotyp verantwortlich war. Dieses Gen wurde ebenfalls von Scott und Kollegen (2001) analysiert und *enoki mushroom* (*enok*) genannt. Sie zeigten, dass *enok* an der Proliferation der Neuroblasten in den Corpora pedunculata (Mushroom Bodies) des Gehirns beteiligt war.

## 2.5 Enok ist ein Sequenzhomolog von Histon-Acetyltransferasen

Wie bereits erwähnt, zeigte ein Abschnitt der translatierten *enok*-DNS-Sequenz Homologie zu einer Protein-Domäne, die charakteristisch für eine Familie von Histon-Acetyltransferasen (HATs) ist. Es handelte sich dabei um die MYST-Domäne. Sie wurde nach vier Genen benannt, in denen sie zuerst beschrieben wurde (Borrow et al., 1996): MOZ (monocytic leukaemia zinc finger protein), YBF2/SAS3 (something about silencing), SAS2 und TIP60 (tat-interactive protein, 60 kDa). Bei der Untersuchung der gesamten in kleinere Abschnitte unterteilten Proteinsequenz mit mehreren Analyse-Programmen wurden verschiedene Domänen und Eigenschaften von Enok deutlich (Abb 2.11). Neben der bereits erwähnten MYST-Domäne (Aminosäuren 715 bis 988) wurden zwei PHD-Zinkfinger-Domänen (plant homeodomain, 183-292) und eine H15-Domäne



```

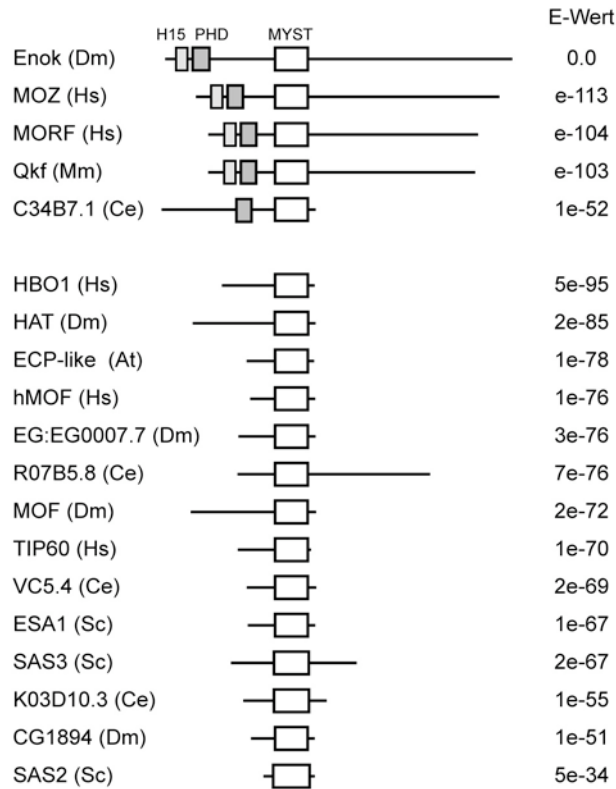
1  MMRESAHDINMOTWQWILEAISKIRSQKQRPVSRICQAICTHKKFHEDIVAEKLEKAVESGAVIKVYNNGLHSYKAPMAKRRVKVDKNTNLYKLVAKA H15
101  VHDLGECEGSTIKSIENYIQKFNCDLSPNVDFKAVIKASIKKAVDAGFLIQEGKLYKKGSLTTPRKCAPVSEVVIKGEESCTHCSGNSQKNLNGIPEP
    * * * * * C4HC3 * * * * * * * * * * C4HC3 * * * * * PHD
201  LSSCKQCGISLHTTCANIAGRCKSQSYVLLYMLVTKGTIWDQNCADCAVCKMNRGPCLLQCFVCKDHFHLTCLDTIPDKPKHFRYCRKTCCKQGFDTF
    * * * * * C4HC3 * * * * * * * * * * C4HC3 * * * * *
301  KLVKKDHSRIKMEARMTPSYKYASNRQSIKKDGNIESPSTSKLCLVYNDGGQRRKVPASLSSRRKMHSDDQFEFSPKQKRSQILQGGYLASQETKRF
    Serin-reich
401  HSDLSSSTSSSESEDEDEDDDRNRNGDDNDQDESTSSDSTSSSSSDSDSSESSSDTSEWDDDEYDEEEDYDTRSTIREKNVFESEGKQSCAKLSTGDGLG
501  SPONNELGSENGWFAAVAKNPIDIFVKSKHNSNVKIGIGYSKPAASTFATSPAANRVQKSTPVASSTPEKNSAPIGGMITIKROTANGOKKKIVPLKSMPL
601  AGKSYEKCEDDIPYLTEETVMKQLLEESIERSETHSQADGKREMNDELDAPGESTKRANPFENQPLPPGVTATDVELYQEVVHLKAVQVMNNHIEKVND
701  VSLKSGCNTQSPKSTIQIGKWDIETWYSSPFPQYARLLKILFLCEFLKYTKRSRSLDRHGNKCIWKQPPGTEIFRQGNISVFEVDGNVNTIYQNLCLLA
    * * * * * C2HC * * * * *
801  KFFLDHTLYYDVEPFLFYILTKNDQSGCHLVGYFSKEKHCTQKYNVSCILTMPQYQRQYGRFLIDFSYLLSREEGQLTPEKPLSDGLBLSYFSYKWS MYST
    Ac CoA
901  VVLELYKXRNWYTRITFKDIAIKTGLAISDIALAFELLNFIKLRKNDGDIRYQINVKLEWKVLAHNNKMANSTRITIEPDCLRWSPHLLSVSKPLNIIX
    HAT
1001  PISNRELYSNQMETNSSFKINEDKIGVQKGVSTSSRVNQESSLSTKNRGSSSEKLLDERENQRKRAYPEEFKLSASNEARKPKLITAPQNLNEDQSPGE
1101  LSDSDCKSKKDLSEQLTKRAQLAKRNDLIPHTNKRKHFDRLPENNNTTSDHNPQAQADTAGTENGLKSEESAANKCNKVVKEHVDKPVNIMPKL
1201  RGKQNGKRSEEPQFNENPSTDEVAVASLSPAKEITREPVKAKTESFGRNQESAKHDAEPNSVSDQVLDVAKTKKTLFSDVASYNTEDVRYNSEEKF
1301  MAIAQEPKESPTAGIKETKPLEVPEQKAKAKSPKATVAETVQHVHAPVNTKISTEESKLELDVHYLKLSPDSALNPPVASVQKPVFPPAPKEKA NfH
1401  KDLQAAQPSALQKQPEIEMVKKTEKTRTETPVSNPSPNRDVSLSVEQPVKAPEKVEQPMVKEAVDIKDKALKKFPVDPVVKPEATSCEKIDHSKTK
1501  VPEHEKAIKTDQQLVQVKEEEKSNARAPSAPIPIRDKIQDKGNZHAQLQNSIPSQFPLNQMPNYHTSQYQWWEYGYNLSHLDSQKQKQFKKDLATTM
1601  AYTHNFTQNLQSANLAMQHAHHQMHQTKKHKVVERKNSGKKEEQNVVSVNVVSTAREDAHVQHCNEYAANNQAALYNQRCASQKQQAQMKSLANVQ
1701  NEVPRQSNNSAPESTVLMNPVVISQAGSVPAKQVEHGVNSTSVISREGKLNKIGHSNIHATAQHANLQVGGGQSDVNPNMVYNTSESSANSAMQHYDCGI
1801  SAQINMUSPANIGSAIANGPQELISATSNVHMQPHRQFSDCSMQNPVTTPMHMSIQNSHMQQNNLNLNLAPEGSSNINLLSNPQHQQSRKLNQAQADI
1901  AVSSPTPSHRATTPKQIRSGNTQQRDAKNAAPPTTTTNTHHQIPQGGAAANISKSHHDSLHNLQFSQHGHQNNMQPIDYVPIPIQISQNFANPSNYDIVG
2001  MPAVIOQRMSLNGSVHLSLANSHORIEQPSACAVNMFYLQNNMPAAENAPRVFVSSSLGGPPTAGNNDORQAGQDSITTANSAGATASLAGNLCLSKSLQ
    Prolin-reich
2101  QLTNCLSEQPCNTSPGAQVNLAFSPHHPIPPNSTPPEHLLMQRNISTPFWMLQQTQVTFLOQYKYYPGNMNIPETSAQNTSRNTRNTPSAPVQHTSTPMG
    Methionin-reich
2201  SGNNRTANVHISPNIMAPYGAINSYRMSPOQSPPTGYSYSGGDVPSQITPMQMMNMQSQVQDACVLQRGTSPSNPMPTYSPLYPLNGSIRR* 2291

```

**Abb 2.11** Die Enok-Proteinsequenz.

Dargestellt ist die aus dem pMax10-cDNS-Klon translatierte Sequenz (siehe 7.2). Die zu einer Domäne gehörenden Aminosäuren sind jeweils eingerahmt. Sterne zeigen Cytosin- bzw. Histidin-Reste in Zinkfingern (C4HC3 und C2HC). Details zu den Domänen sind im Text aufgeführt. Pfeilspitzen zeigen die beiden Positionen, die in *rot*<sup>60</sup> und *rot*<sup>104</sup> mutiert sind. Sie liegen direkt im Acetyl-CoA-Bindebereich (AcCoA). Ebenfalls gezeigt ist der für die HAT-Aktivität in MOZ wichtige Abschnitt in der MYST-Domäne (HAT). Grau hervorgehoben sind drei mögliche Phosphorylierungs-Stellen in der zu Neurofilament H (NfH) homologen Domäne.

(histone linker, 89-165) identifiziert. Zwischen Position 301 und 399 war der Anteil an basischen Aminosäuren (Histidin, Lysin und Arginin) 24 %, der an sauren Aminosäuren (Asparaginsäure und Glutaminsäure) nur 10 %, womit dieser Abschnitt als basisch definiert werden konnte. Auffällig waren desweiteren der hohe Anteil an Serin zwischen Position 402 und 458 (40 %), sowie am C-Terminus ein Prolin-reicher Abschnitt (27 %, 2123-2173) und ein Methionin-reicher Abschnitt (12 %, 2216-2275). Im Bereich zwischen den Aminosäuren 1229 bis 1538 wurde Homologie zu Neurofilament H (NfH) aus verschiedenen Spezies gefunden (31 % Identität zu menschlichem NfH). Obwohl die für NfH charakteristischen KSP-Wiederholungen (Lysin-Serin-Prolin) fehlten, konnten drei mögliche Phosphorylierungsstellen (Motiv: S/T-P-X-K/R) für Cyclin-abhängige Kinasen (CDKs) identifiziert werden (Abb 2.11; Shetty et al., 1993).



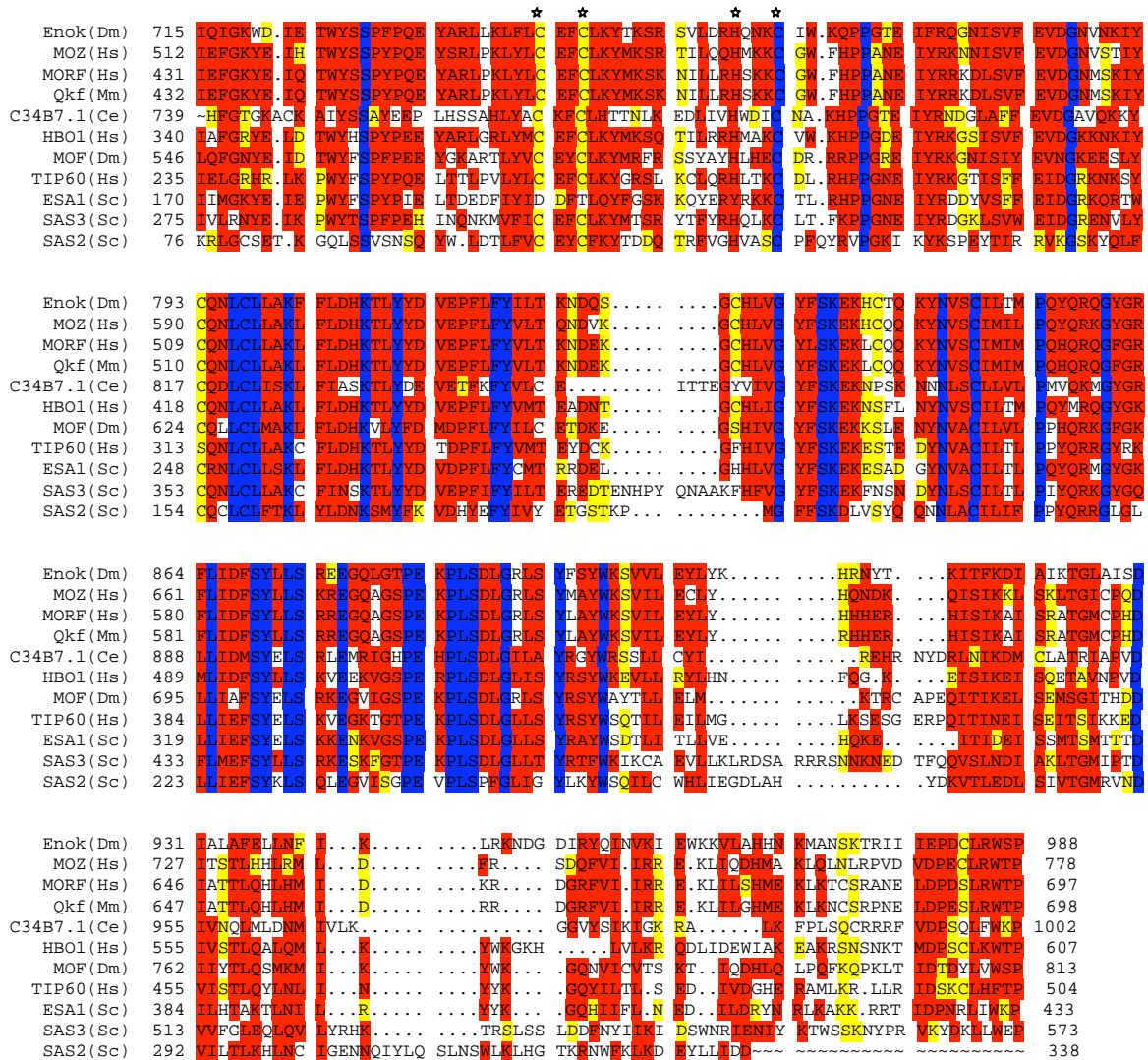
**Abb 2.12** Die MYST-Familie der Histon-Acetyltransferasen.

Die höchste Homologie zu Enok wurde in MOZ (*Homo sapiens*, Hs), MORF (MOZ-related factor, Hs) und Querkopf (Qkf, *Mus musculus*, Mm) gefunden. MYST-HATs mit niedrigerer Homologie zu Enok sind in Menschen HBO1 (HAT bound to ORC), hMOF (human MOF) und TIP60, in *Drosophila melanogaster* (Dm) MOF (males absent on the first) und drei weitere nicht näher charakterisierte Proteine (HAT, EG:EG0007.7 und CG1894), in *Caenorhabditis elegans* (Ce) vier unbekannte Proteine, in *Saccharomyces cerevisiae* (Sc) ESA1 (essential SAS family acetyltransferase), SAS2 und SAS3 und schließlich in *Arabidopsis thaliana* (At) ECP-like (embryogenic callus protein-like). Die obere Gruppe ist die beschriebene MYST-Unterfamilie, zu der Enok gehört. Gezeigt werden die H15- (hellgraue Box), die PHD (dunkelgraue Box) und die MYST-Domäne (weiße Box). Sortiert sind die Proteine innerhalb der beiden Gruppen (obere und untere) nach ihrer Homologie zu Enok. Der E-Wert (Erwartungswert) ist ein Parameter, der die Anzahl an Treffern beschreibt, die man erwarten kann, wenn man eine Sequenzdatenbank einer bestimmten Größe durchsucht. Je kleiner der E-Wert, desto größer ist die Übereinstimmung

Eine Suche mit der gesamten Enok-Proteinsequenz in der NCBI-Datenbank (National Center for Biotechnology Information, Bethesda, USA) mit dem BLASTp-Programm (Altschul et

al., 1997) ergab eine Liste von Proteinen, die zur MYST-Familie von HATs gehörten (Abb 2.12). Die Abbildung zeigt alle MYST-HATs, die bis April 2002 in Proteindatenbanken zu finden waren. Bei genauerer Untersuchung der einzelnen Proteine hinsichtlich ihrer Domänen wurde deutlich, dass Enok zu einer speziellen Gruppe innerhalb der MYST-HAT-Familie gehörte. Zusammen mit MOZ, MORF, Qkf und C34B7.1 (Ce) wieß Enok neben der MYST-Domäne auch zwei PHD-Domänen auf (Abb 2.12). Außerdem besaßen alle Mitglieder dieser Gruppe außer C34B7.1 die H15-Domäne.

Charakteristisch für die MYST-Domäne waren zwei spezielle Abschnitte. Zum einen ein C<sub>2</sub>HC-Zinkfinger und zum anderen eine Domäne, die Homologie zu Motiv A der GNAT-Superfamilie (Gcn5-related N-acetyltransferase; Neuwald und Landsman, 1997) zeigte, zu der HATs wie Gcn5 (general control



**Abb 2.13** Sequenzvergleich verschiedener MYST-Domänen. Besonders im Mittelbereich rund um die Acetyl-CoA-Bindestelle ist die MYST-Domänen-Sequenz hoch konserviert. Die Sterne zeigen den C2HC-Zinkfinger. Die Rauten zeigen Aminosäuren, deren Reste Acetyl-CoA kontaktieren. Farbcode: blau, alle Aminosäuren sind identisch; rot mehr als die Hälfte der Aminosäuren sind identisch oder haben starke Ähnlichkeit; gelb, mehr als die Hälfte der Aminosäuren haben schwache Ähnlichkeit. Abkürzungen für Spezies siehe Abb 2.12.

underepressible) oder P/CAF (p300/CBP-associated factor) gehörten. Motiv A enthielt ein R/Q-X<sub>2</sub>-G-X-G/A-Segment, für das gezeigt wurde, dass es Acetyl-CoA erkennen und binden konnte (Dutnall et al., 1998; Wolf et al., 1998). Kitabayashi und Kollegen (2001b) haben die zuerst definierte MYST-Domäne (Borrow et al., 1996) erweitert, indem sie zeigten, dass ein Bereich etwa 80 Aminosäuren hinter der "alten" MYST-Domäne essentiell für die HAT-Aktivität ist. Ein Vergleich der MYST-Domäne von Enok mit anderen Vertretern der MYST-Unterfamilie und den Proteinen, die näher in der Literatur beschrieben wurden, veranschaulichte die hohe Homologie in der MYST-Domäne (Abb 2.13). Die höchste Homologie in diesem



			*	*					*	*	*	*					*	*
Enok (Dm)	183	CTHCSNSQK	NLNGIPPLS	SCKQCGISL	..TTCANIAGR	CKSQSYVLLY	MLVTKGTIWD	QONCA										
MOZ (Hs)	209	CSFCLGTKEQ	NREKKPEELI	SCADCGNSGH	..PSCLKFSPE	LTVR.....	..VKALRWQ	CIECK										
MORF (Hs)	216	CSFCLGTKEQ	NREKKPEELI	SCADCGSSGH	..PSCLKFCPE	LTTN.....	..VKALRWQ	CIECK										
Qkf (Mm)	217	CSFCLGTKEQ	NREKKPEELI	SCADCGSSGH	..PSCLKFCPE	LTAN.....	..VKALRWQ	CIECK										
C34B7.1 (Ce)	494	CSFC...KE	DQKADDEPLK	ECSECKAKYE	IRKCLRYKEE	FATN.....	..ILKLNKWF	CPRCV										
		*	*		*	*	*	*					*	*				
Enok (Dm)	247	DCAVCKMRNR	..GPCLLQCFV	CKDHFHITCL	DTIPDKPKH	P....YRCKT	C	292										
MOZ (Hs)	264	TCSSCRDQGR	NADNMLFCDS	CDRGFHMECC	DPPLTRMPKG	M....WICQI	C	310										
MORF (Hs)	271	TCSACRVQGR	NADNMLFCDS	CDRGFHMECC	DPPLSRMPKG	M....WICQV	C	317										
Qkf (Mm)	271	TCSACRVQGR	NADNMLFCDS	CDRGFHMECC	DPPLSRMPKG	M....WICQV	C	318										
C34B7.1 (Ce)	547	ECDSCRGYIG	DPSN..EETF	CCRAWHGSCA	..KGYSSG	EFDSDNVIA	C	594										

**Abb 2.14** Sequenzvergleich verschiedener PHD-Domänen. Die Sterne zeigen die Cytosin- und Histidin-Reste der zwei C4HC3-Zinkfinger. Farben wie in Abb 2.13. Abkürzungen für Spezies siehe Abb 2.12.

Bereich hatten Qkf (66,3 % Identität), MORF (65,9 %) und MOZ (63,7 %). Für die anderen abgebildeten Sequenzen lag die Identität zwischen 47 % und 57 %. Nur C34B7.1 und SAS2 waren Ausnahmen. C34B7.1 zeigte, obwohl es der gleichen Unterfamilie zugeordnet wurde, nur 44 % Identität und SAS2 33 %. Der Grad der Homologie von C34B7.1 zu Enok war damit niedriger als die Übereinstimmung zweier anderer *C. elegans* Proteine (VC5.4 mit 49 % und R07B5.8 mit 45 %). Der C<sub>2</sub>HC-Zinkfinger war in allen gezeigten Proteinen außer ESA1 konserviert. Obwohl er in ESA1 fehlte, wurde dieses Protein dennoch der MYST-Familie zugeordnet, da die Homologie ansonsten sehr hoch war. Besonders im Bereich der Acetyl-CoA-Bindestelle fand man die höchste Übereinstimmung in der MYST-Familie. Das oben erwähnte Sequenzsegment aus Motiv A der GNAT-Superfamilie, speziell das hochkonservierte Glycin, war in allen Sequenzen zu finden. Interessant war in diesem Zusammenhang die Tatsache, dass die identifizierten Punktmutationen aus *rot*<sup>60</sup> und *rot*<sup>104</sup> genau vor diesem Glycin lagen (Abb 2.9, 2.11 und 2.13) und somit diese Domäne unterbrachen.

Das zweite Charakteristikum der MYST-Unterfamilie waren die PHD-Domänen (Abb 2.14). Ein Vergleich zwischen Enok und den anderen Unterfamilienmitgliedern zeigte, dass für MORF, Qkf und MOZ auch neben der C-X<sub>2</sub>-C-X<sub>9-21</sub>-C-X<sub>2-4</sub>-C-X<sub>4-5</sub>-H-X<sub>2</sub>-C-X<sub>12-46</sub>-C-X<sub>2</sub>-C-Struktur (Aasland et al., 1995) eine hohe Homologie vorlag (Identität entsprechend 32 %, 31 % und 31 %). Für C34B7.1 war die Identität niedriger (25 %). Auffällig im ersten PHD-Zinkfinger-Motiv (PHD1) von Enok war im Vergleich zu den anderen Sequenzen eine 9-Aminosäuren-Verlängerung, die aber immer noch zur PHD-Konsensus-Sequenz passte. Das dritte Charakteristikum für Enok, MOZ, MORF und Qkf war eine H15-Domäne (Histone 1 und 5), die typisch für Linker-Histone war und einen Abschnitt der

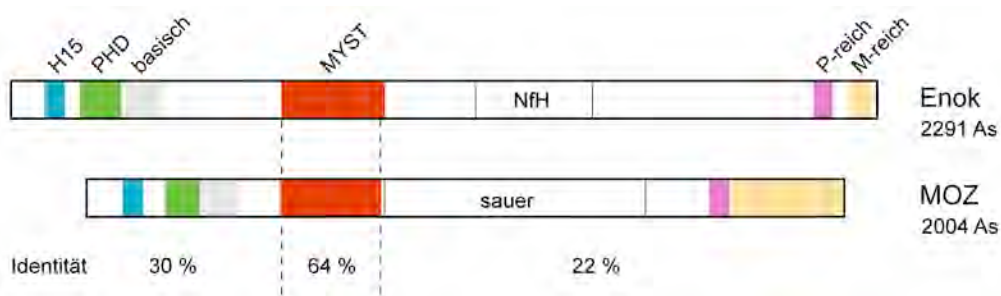
Enok (Dm)	89	KNTNLYKLVA	KAVHDLGECF	GSTIKSIENY	IQKFNCLDLS	FN...VDFK	AVTKASIKKA	VDAEFLIQ.E	GKLYKKGKSL	TT	165
MOZ (Hs)	95	QNVDWNKLIK	RAVEGLAASG	GSTLKSIERF	LKCGQKDVSA	FGGSAASGPH	QQLRLAIKRA	FGHGRLLK.D	GPLYRLNTRK	IN	175
MORF (Hs)	103	RNVDWNKLLR	RAIEGLEEEN	GSSLKNLEKY	LRSQSDLTST	TNNPA...FG	QRLRLGAKRA	VNNGRLLK.D	GPOYRVNYGS	LD	180
Qkf (Mm)	104	RNVDWNKLLK	RAIEGLEEEN	GSSLKNLEKY	LRSQSDLTGT	TNHFA...FG	QRLRLGAKRA	VNNGRLLK.E	GPOYRVNYS	SD	181
His1 (Dm)	45	SHPTQQMV	ASIKNLERG	GSSLAIKKY	ITA...TYK	CDAQKLAPH	..TKKYLKSA	VVNGRLIQTK	GKGASGFKL	S~	118

**Abb 2.15** Sequenzvergleich verschiedener H15-Domänen.

Zum Vergleich ist die H15-Domäne von *Drosophila* Histon H1 (His1) aufgeführt. Farben wie in Abb 2.13. Abkürzungen für Spezies siehe Abb 2.12.

globulären Domäne von Histon H1 und Histon H5 darstellte. Für die H15-Domäne wurde gezeigt, dass sie Chromatin binden konnte (Ramakrishnan et al., 1993; Hayes und Wolffe, 1993). Ein Vergleich dieser Domäne von Enok mit MOZ, MORF, Qkf und Histon H1 aus *Drosophila* zeigte, dass die Homologie zu Histon H1 verglichen mit den anderen MYST-Vertretern ähnlich hoch war (Abb 2.15; Identität zu: MOZ 32 %, MORF 30 %, Qkf 29 % und His1 30 %).

Die höchste Homologie zu Enok über die gesamte Proteinsequenz wurde bei MOZ gefunden (30 % Identität). Besonders die N-terminalen Bereiche von Enok und MOZ zeigten einen vergleichbaren Domänenaufbau (Abb 2.16). In beiden Proteinen waren in gleicher Abfolge zum einen die schon beschriebenen Domänen H15, PHD und MYST und zum anderen ein zwischen PHD und MYST liegender basischer Abschnitt angeordnet. Die Proteinsequenzen der N-terminalen Bereiche vor der MYST-Domäne waren 30 % identisch. Der C-terminale Teil dagegen zeigte weniger Übereinstimmung. Die Identität hinter der MYST-Domäne lag bei 22 %. Besonders im zu NfH homologen Teil von Enok wurde der Unterschied deutlich, da im entsprechenden Bereich von MOZ ein Abschnitt vieler saurer Aminosäuren lag. Im gesamten C-terminalen Bereich von Enok waren keine Abschnitte zu finden, die einen erhöhten Anteil an sauren Aminosäuren aufwiesen (zwischen Position 989 und 2123 11 % saure und 15 % basische Aminosäuren). In MOZ dagegen befanden sich zwischen Position 789 und 1518 28 % saure und 16 % basische Aminosäuren, eine deutlich saure Domäne. Am C-terminalen Ende von Enok und MOZ war eine leichte Übereinstimmung zu finden. In Enok befanden sich dort ein kurzer Prolin-reicher und ein kurzer Methionin-reicher Abschnitt. Diese waren in MOZ wesentlich länger. Eine ähnliche Proteinarchitektur wie in MOZ wurde auch in MORF und Qkf gefunden. Für fast alle publizierten Mitglieder der MYST-Familie ist *in vitro* HAT-Aktivität nachgewiesen worden. Es wurde gezeigt, dass die MYST-Domäne dabei eine Rolle spielte.

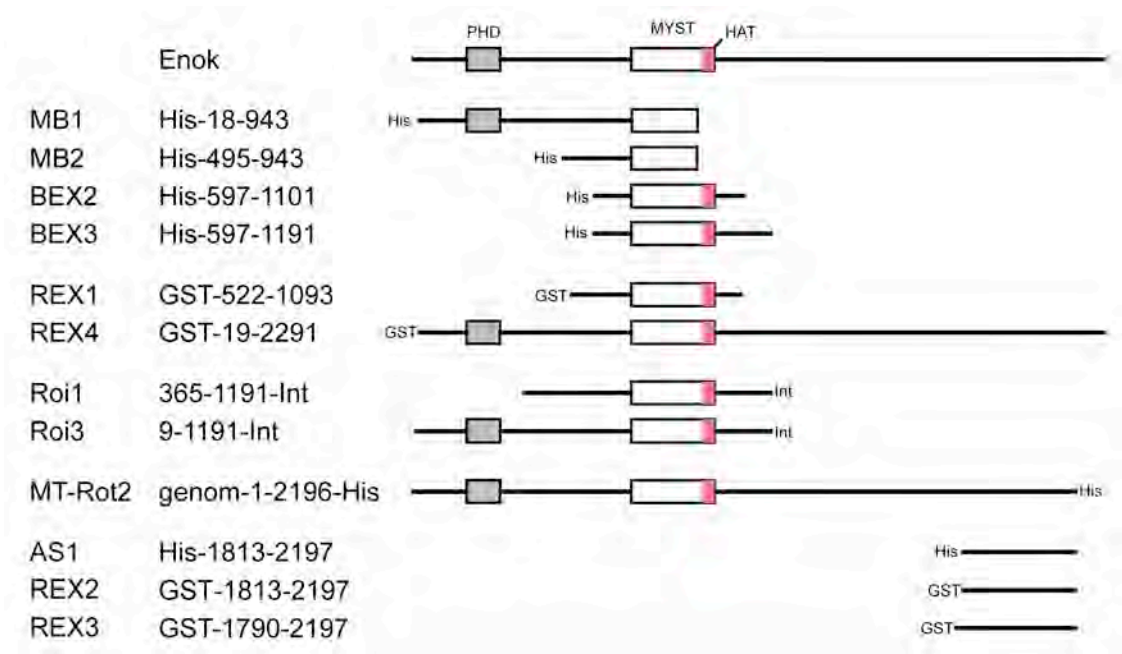


**Abb 2.16** Vergleich der Proteindomänen von Enok und MOZ. Auffällig ist die höhere Homologie im N-terminalen Teil vor der MYST-Domäne. Die Farben machen den ähnliche Domänenaufbau in diesen Proteinen deutlich. As, Aminosäuren; M-reich, Methionin-reich, NfH, Homologiebereich zu Neurofilament H; P-reich, Prolin-reich.

Zusammenfassend konnte festgestellt werden, dass Enok eine hohe Sequenzhomologie zu MYST-HATs besaß. Um zum einen in Kollaboration mit Dr. Axel Imhof (Adolf-Butenandt Institut, Universität München) die HAT-Aktivität von Enok nachweisen zu können und zum anderen um in Kollaboration mit Dr. Jörg Mengwasser (ITG, Arbeitsgruppe Dr. Sleeman) monoklonale Antikörper gegen Enok als biochemisches Werkzeug zu gewinnen, wurden verschiedene Expressionskonstrukte kloniert.

## 2.6 Ein HAT-Assay mit rekombinantem Enok zeigte keine Aktivität

Für die spätere Expression und die Aufreinigung von rekombinanten Enok-Fragmenten für HAT-Aktivitäts-Tests (HAT-assays) wurden verschiedene Fusionen (*tags*) verwendet. In vier Konstrukten wurde an das 3'-Ende der Enok-codierenden Sequenz eine His-*tag*-Sequenz kloniert. Die Fusionsproteine besaßen am N-terminalen Ende entsprechend sechs Histidine. Folgende Enok-Fragmente wurden in verschiedene Expressionskonstrukte integriert: MB1 (Enok-Proteine 18 bis 943, His-18-943), MB2 (His-495-943), BEX2 (His-597-1101) und BEX3 (His-597-1191) (Abb 2.17). Mit dem aufgereinigtem His-495-943 (MB2) wurde ein HAT-Filterassay durchgeführt, bei dem keine HAT-Aktivität festgestellt wurde (siehe 5.5.27). Allerdings fehlten bei diesem Konstrukt ungefähr 40 C-terminale Aminosäuren der "neuen" MYST-Domäne. Das Konstrukt MB1 enthielt zusätzlich die PHD-Domänen. Die Konstrukte BEX2 und BEX3 dagegen enthielten



**Abb 2.17** Rekombinante Enok-Protein-Konstrukte.

Gezeigt ist jeweils die PHD-Domäne (graue Box) und die MYST-Domäne (weiße Box), wenn sie im Expressionskonstrukt vorhanden sind. In der MYST-Domäne wird vor allem der für die HAT-Aktivität wichtige Bereich gezeigt (pinkfarben, HAT). Die jeweiligen Tags sind in der graphischen Darstellung am entsprechenden Ende dargestellt (GST, His oder Int). Weitere Details sind im Text dargelegt.

die komplette neue MYST-Domäne. In zwei Konstrukten wurde an das 3'-Ende der Enok-codierenden Sequenz eine *Glutathion-S-Transferase*-Sequenz (GST-tag) kloniert. Die Fusionsproteine besaßen am N-terminalen Ende entsprechend das GST-tag. Folgende Enok-Fragmente wurden in verschiedene Expressionskonstrukte integriert: REX1 (GST-522-1093) und REX4 (GST-19-2291). REX4 enthielt fast das gesamte offene Leseraster von Enok, bei dem nur 17 Aminosäuren am N-Terminus fehlten. REX1 kodiert für den MYST-Domänen-Bereich. Ein schon erfolgreich für den Nachweis von HAT-Aktivität des *Drosophila*-MYST-Proteins MOF verwendetes tag war Intein (Akhtar und Becker, 2000). Intein hatte eine Selbstspaltfunktion, die bei der Aufreinigung des rekombinanten Proteins genutzt werden konnte, um das Intein abzutrennen. Mit C-terminalem Intein-tag (Vektoren von Dr. Axel Imhof) wurden zwei Konstrukte kloniert. Roi1 (365-1191-Intein) enthielt die MYST-Domäne, während Roi3 (9-1191-Intein) zusätzlich die PHD-Domänen beinhaltete. Die drei beschriebenen Systeme waren für die Expression in *Escherichia coli* geeignet. Da aber für die MYST-Domäne bekannt war, dass die Expression in Bakterien aufgrund der schlechten Löslichkeit

problematisch sein konnte (persönliche Kommunikation mit Dr. Axel Imhof), sollte zusätzlich das *Drosophila Expression System* (Invitrogen) benutzt werden, um rekombinante Proteine in *Drosophila*-Schneiderzellen exprimieren zu können. Mit Vektoren dieses Systems wurde ein Konstrukt hergestellt (MT-Rot2), das Enok mit C-terminalem His-tag exprimieren sollte (1-2196-His). Der erste Versuch die HAT-Aktivität von Enok mit His-495-943 nachzuweisen schlug wahrscheinlich deshalb fehl, weil ein Teil der HAT-Domäne im Konstrukt nicht vorhanden war. Um die HAT-Aktivität letztendlich nachweisen zu können, wurden verschiedenen Expressionskonstrukte mit verschiedenen Enok-Proteinvarianten kloniert, die in biochemischen Untersuchungen verwendet werden können.

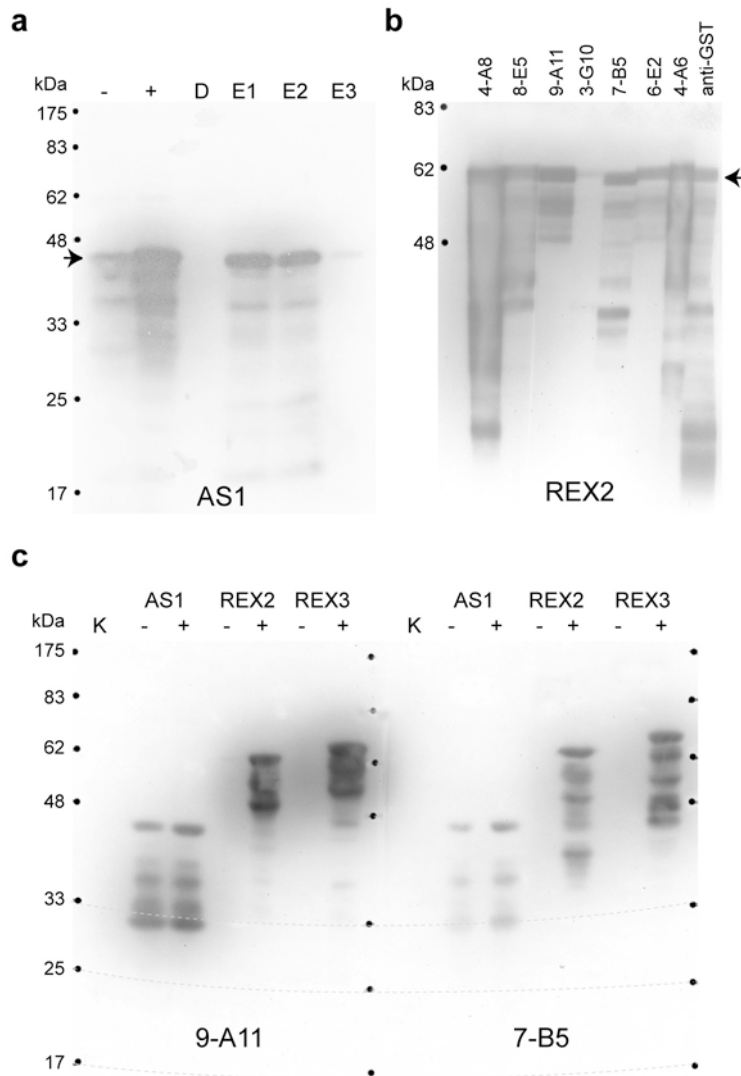
## 2.7 Die Herstellung monoklonaler Enok-Antikörper

Zur Immunisierung von Mäusen für die Gewinnung monoklonaler Antikörper wurde ein Fragment aus dem C-terminalen Bereich von Enok ausgewählt (Position 1813 bis 2197), in dem die Homologie zu anderen Proteinen niedrig war. Ein Konstrukt wurde kloniert (AS1), das mit N-terminalem His-tag die Aminosäuren 1813 bis 2197 exprimierte (Abb 2.17 und 2.18 a; His-1813-2197). Nach mehreren Expressionsrunden wurden mit aufgereinigtem His-1813-2197 Mäuse immunisiert (siehe 5.5.29). Durch ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay; siehe 5.5.29) wurden acht positive Klone identifiziert und jeweils die Immunglobulinklasse bestimmt (Tab 2.4). Anschließend wurden sie in Western-Transfer-Hybridisierungen getestet. Dabei wurden Lysate von *E. coli*-Kulturen ver-

<i>Antikörper</i>	<i>Immunglobulin-Klasse</i>
3-G10	IgG 1 □
4-A6	IgG 2a □
4-A8	IgG 2a □
6-E2	IgG 1 □
7-A6	nb
7-B5	IgG 2b □
8-E5	IgG 2a □
9-A11	IgG 3 □

**Tab 2.4** Immunglobulinklassen der im ELISA positiv getesteten Enok-Antikörper. Die Bestimmung erfolgte mit dem *IsoStrip Mouse Monoclonal Antibody Isotyping Kit* (siehe 4.3). nb, nicht bestimmt.

wendet, die mit REX2 transformiert und mit IPTG induziert worden waren (Abb 2.18 b). Alle Antikörper zeigten spezifische Signale mit einem Hauptprodukt bei ungefähr 65 kDa, was der errechneten Größe des Fusionsproteins GST-1813-2197 entsprach. Zwei Antikörper (7-B5 und 9-A11) wurden aufgereinigt



**Abb 2.18** Die Herstellung von Enok-Antikörpern.

**(a)** Expression von rekombinantem His1813-2197 aus AS1. Der Pfeil zeigt das Hauptprodukt. -, uninduzierte Bakterien; +, mit IPTG induzierte Bakterien; D, Durchlauf; E1-3, Elutionsfraktionen. **(b)** Test der identifizierten Hybridoma-Klon-Überstände auf Western Transfers. Details siehe Text. Der Pfeil zeigt das Hauptprodukt. GST-Antikörper wurden zur Kontrolle verwendet. **(c)** Test zweier aufgereinigter Antikörper (9-A11, links; 7-B5, rechts) auf Western Transfers mit drei verschiedenen Enok-Expressionskonstrukten (AS1, REX2 und REX3). Details siehe Text. Als Kontrolle wurden Bakterienlysate von nichttransformierten Bakterien verwendet (K). kDa, Kilodalton.

(siehe 5.5.29) und erneut mit Western-Hybridisierungen getestet (Abb 2.18 c). Hierbei wurden Lysate untersucht, die aus *E.coli*-Kulturen gewonnen wurden, welche mit verschiedenen Konstrukten transformiert worden waren. Neben den Proteinen, die mit dem Plasmid AS1 (His-1813-2197), welches für die Immunisierung verwendet wurde, und dem Plasmid REX2 (GST-1813-2197) erzeugt wurden, wurde auch das REX3-Protein für den Western-Transfer verwendet (GST-1790-2197). Beide Antikörper zeigten spezifische Signale. Die Hauptprodukte entsprachen den berechneten Größen (AS1: 43 kDa, REX2: 65 kDa und REX3: 71 kDa). Somit war nachgewiesen, dass es sich um spezifische Antikörper gegen Enok handelte, die zur Untersuchungen der HAT-Aktivität und zur Identifizierung des Enok-Komplexes genutzt werden sollen.

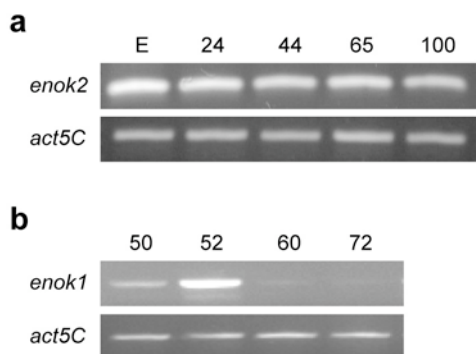


Die Untersuchungen hatten soweit gezeigt, dass die Mutation des vermeintlichen Histon Acetyltransferase-Gens *enok* Nahrungsaufnahme- und Wachstumsdefekte, nämlich den *rotkehlchen*-Phänotyp, verursacht hatte. Aus den Untersuchungen an *pumpless*-Mutanten hatten wir gefolgert, dass ein Aminosäure-abhängiges Signal aus dem Fettkörper die Nahrungsaufnahme in *Drosophila* Larven unterdrückte (Zinke et al., 1999). Zu dieser Schlussfolgerung kamen wir, da *ppl* ausschließlich im Fettkörper exprimiert wurde und ein Enzym kodierte, das am Glycinabbau beteiligt war, und weil der Fressphänotyp in Wildtyp-Larven durch die Fütterung hoher Aminosäurekonzentrationen imitiert werden konnte. Da sich die Nahrungsaufnahmedefekte in *ppl*- und *enok*-Mutanten ähnelten, war nun die Frage, ob die Expression von *enok* durch verschiedene Nahrungssignale beeinflusst werden konnte und in welchen Organen es exprimiert wurde.

## 2.8 Hungerbedingungen induzieren die *enok*-Expression

Aufgrund der erwähnten Northern-Transfer-Hybridisierungen (Abb 2.8 b), bei denen sowohl in Embryos (17 Stunden nach Eiablage, 17 h nE) als auch in Larven des ersten Instar (40 h nE) *enok*-Expression zu erkennen war, lag es nahe das Expressionsmuster während der Larvenentwicklung genauer zu untersuchen. Da die *enok*-Expression sehr schwach war (Northern-Transfer-Signal in Abb 2.8 a erst nach fünf Tagen sichtbar), wurden die weiteren Untersuchungen mittels RT-PCR-Technik durchgeführt (siehe 5.5.15).

Zunächst wurde die *enok*-Aktivität in normal gefütterten Larven (siehe 5.2) während verschiedener Entwicklungsstadien (24 h nE, frühes erstes Instar; 44 h nE, spätes erstes Instar; 65 h nE, spätes zweites Instar; 100 h nE, spätes drittes



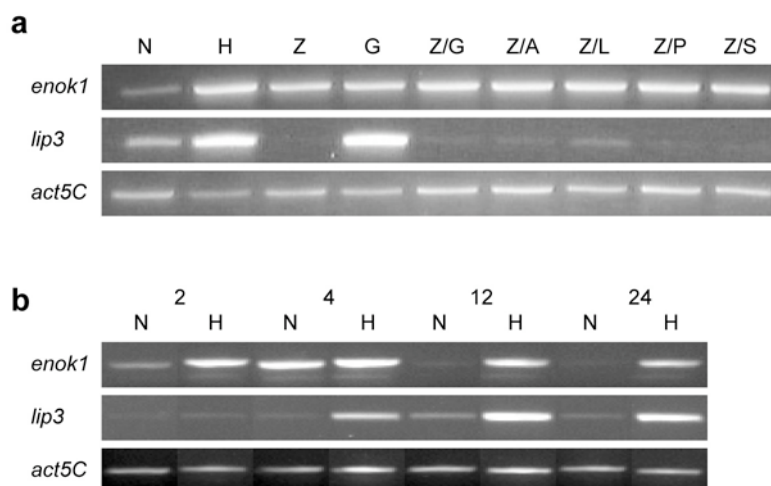
**Abb 2.19** Expression von *enok* während der Embryonal- und Larvalentwicklung.

**(a)** Konstante *enok*-Expression in den untersuchten Entwicklungsstadien. E, Embryos aus mittlerem Entwicklungsstadium. **(b)** Eine *enok*-Expressions-Spitze wird im zweiten Instar deutlich (52).

Die Zahlen stehen für das Alter der Larven in Stunden nach der Eiablage. Es wurden Vier-Stunden-Eiersammlungen für diese Versuche durchgeführt. Actin (*act5C*) wurde als Ladekontrolle verwendet. Die RT-PCR-Primer sind in 4.10 aufgeführt.

Instar) und in Embryos (15 h nE) untersucht (Abb 2.19 a). Der *enok*-Level war an den untersuchten Zeitpunkten konstant.

Um die Frage zu beantworten, ob Nahrungssignale die Expression von *enok* beeinflussen konnten, wurden Wildtyp-Larven zwischen spätem ersten und spätem zweiten Instar für 24 Stunden verschiedenen Ernährungssituationen ausgesetzt (Abb 2.20 a). Populationen von Larven wurden normal gefüttert (N, siehe oben), in PBS gehungert (H) oder in 20 % Saccharose einer hohen Zuckerkonzentration (Z) bzw. in 0,4 M Glycin-Lösung einer hohen Aminosäurekonzentration ausgesetzt (G) (siehe 5.2). Außerdem wurden verschiedene Aminosäuren (je 0,4 M) kombiniert mit 20 % Saccharose getestet: Glycin (Z/G), Alanin (Z/A), Lysin (Z/L), Prolin (Z/P) und Serin (Z/S). Für die Transkription von *enok* wurde deutlich, dass sein Aktivität unter allen Bedingungen verglichen zu normalen Bedingungen signifikant erhöht war. Das *lipase3*-Gen (*lip3*) wurde als Kontrolle für die Nahrungsverhältnisse benutzt, da gezeigt worden war, dass seine Transkription absolut Zucker-abhängig reguliert wurde (Zinke et al., 1999). Wie in Abb 2.20 a zu sehen ist, wurde *lip3* unter normalen Futterbedingungen schwach exprimiert (N). Wurden hohe Zuckerkonzentration gefüttert, war die *lip3*-Transkription stark reprimiert (Z oder Z/Aminosäure). Dagegen wurde die Transkription,



**Abb 2.20** Expression von *enok* unter Hungerbedingungen.

**(a)** Die Expression von *enok* ist unter allen getesteten Bedingungen erhöht, während *lip3* ohne Zucker als Nahrungsquelle immer stark induziert wird. Abkürzungen für die Nahrungsbedingungen siehe Text. **(b)** Bereits nach zwei Stunden Hungern ist die Expression von *enok* erhöht, während *lip3* nach vier Stunden induziert ist. Die Zahlen zeigen die Zeit in Stunden nach Beginn des Hungerns an.

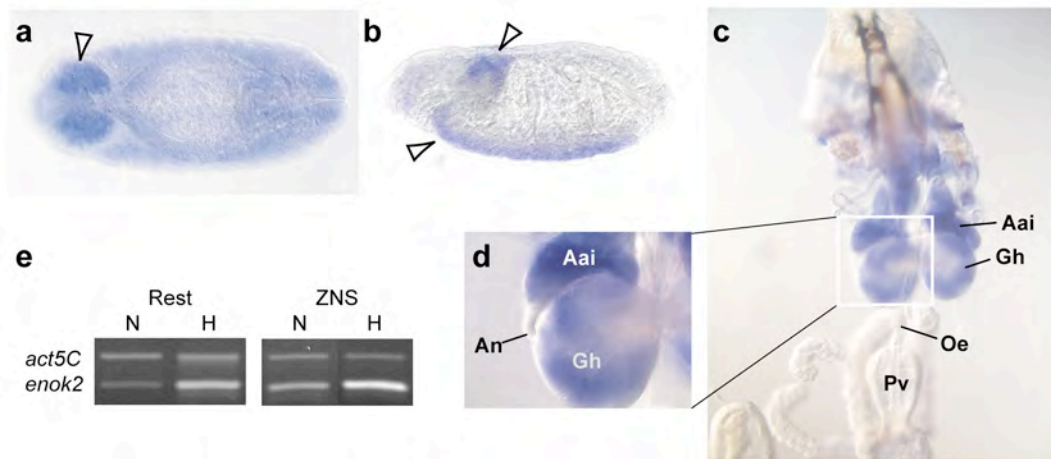
Es wurden Vier-Stunden-Eiersammlungen für diese Versuche durchgeführt. Actin (*act5C*) wurde als Ladekontrolle verwendet. Die RT-PCR-Primer sind in 4.10 aufgeführt.



wenn kein Zucker zur Verfügung stand, sehr stark induziert (Abb 2.20). Die Expression von *enok* wurde also von Nahrungssignalen beeinflusst. Dieses Signal schien nicht von Zucker oder den getesteten Aminosäuren abhängig zu sein, da die Zugabe dieser Nährstoffe keinen Einfluss auf die *enok*-Transkription verglichen mit der Hungersituation hatte.

Um zu sehen, nach welcher Hungerdauer ein Signal *enok* beeinflusst, wurden Larven im zweiten Instar (48 h nE) für verschiedene Zeitperioden gehungert (PBS). Das Experiment zeigte, dass *lip3* nach vier Stunden deutlich hochreguliert war und bis 24 Stunden hochreguliert blieb (Abb 2.20 b). Die *enok*-Aktivität war bereits nach zwei Stunden Hungern leicht erhöht und war nach 12 und 24 Stunden Hungerzeit deutlich erhöht. In normal gefütterten Kontroll-Larven dieses Experiments wurde ebenfalls eine Erhöhung der *enok*-Expression 52 Stunden nE entdeckt (Abb 2.19 b). Die Möglichkeit, dass es sich dabei um eine Stressantwort auf die vier Stunden zuvor erfolgte Waschung handelte, konnte nicht vollständig ausgeschlossen werden. Es ist jedoch vorstellbar, dass es sich hierbei um eine Entwicklungs-bedingte *enok*-Regulation handelt und nicht um eine verspätete Stressreaktion (siehe 3.3). Das zu diesem Zeitpunkt in der Kontrolle vorhandene Signal wurde unter Hunger nicht weiter erhöht. Ob die Hunger-abhängige Regulation in einer anderen Entwicklungsphase nach vier Stunden sichtbar wäre, konnte dieses Experiment nicht zeigen, aber die Tatsache, dass *enok* nach zwei und nach zwölf Stunden Hungern hochreguliert war, deutete darauf hin.

Um die Gewebe zu bestimmen, in denen *enok* exprimiert wurde, wurden *in situ* Hybridisierungen (Tautz und Pfeifle, 1989) mit spezifischer Digoxigenin-markierter Gegensinn-RNS in Embryos und Larven durchgeführt. Die in diesen Experimenten benutzte Probe entsprach einem genomischen Abschnitt des *enok*-Lokus von Position 7825 bis 9335 (*enok*-Dig). In einem mittleren Embryonalstadium war ein ubiquitäres *enok*-Signal mit stärkerer Intensität im Nervensystem (Abb 2.21 a) zu erkennen. Die *enok*-Expression im Nervensystem wurde in späteren Stadien spezifischer, während das ubiquitäre Signal schwächer wurde (Abb 2.21 b). *In situ* Hybridisierungen in Larven wurden an seziierten Tieren durchgeführt (Abb 2.21 c und d). Hier war die spezifische Färbung in beiden Gehirn-Hemisphären sowie in der Augenantennen-Imaginalscheibe sichtbar. Die Expression im ventralen Nervensystem konnte nicht mehr nachgewiesen werden.



**Abb 2.21** Expression von *enok* im Nervensystem.

(a) *in-situ*-Hybridisierung mit *enok*-Dig in einem Embryo aus der Mittembryogenese in Aufsicht. Die Pfeilspitze deutet auf eine Gehirnhemisphäre (b) *in-situ*-Hybridisierung mit *enok*-Dig in einem Embryo aus der Spätembryogenese in Seitenansicht. Die Pfeilspitzen zeigen die Expression in Gehirn und ventralem Nervensystem. (c) *in-situ*-Hybridisierung mit *enok*-Dig an einer seziierten Larve des dritten Instar. Die Expression ist spezifisch nur in den beiden Gehirnhemisphären (Gh) und in den Augenantennen-Imaginalscheiben (Aai) zu sehen. Oe, Oesophagus; Pv, Proventriculus. (d) Vergrößerung aus (c). Der Augennerv ist zu erkennen (An). (e) Die Expression von *enok* wird im Gehirn (ZNS) unter Hunger (H, 24 h) erhöht. Gehirne wurden aus Larven des zweiten Instar herauspräpariert. Actin (*act5C*) wurde als Ladekontrolle verwendet. Die RT-PCR-Primer sind in 4.10 aufgeführt.

Daraus abgeleitet sollte untersucht werden, in welchem der beiden Organe, Gehirn oder Imaginalscheibe, Nahrungssignale die Expression von *enok* erhöhten. Dazu wurde das Nervensystem (Gehirn mit ventralem Nervensystem) aus normal gefütterten und 24 Stunden gehungerten Larven (ca. 66 h nE) herauspräpariert. Aus den Nervensystemen sowie aus den vom Nervensystem befreiten Larvengewebe, die auch die Augenantennenscheiben enthalten sollten, wurde RNS isoliert und mit Hilfe von RT-PCR untersucht (Abb 2.21 e). Sowohl im Nervensystem als auch in den übrigen Geweben gehungelter Larven war *enok* stärker exprimiert als in Organen normal gefütterter Tiere. Die stärkere *enok*-Aktivität in den Larvengewebe konnte in den Augenantennenscheiben oder aber in anderen Bereichen erfolgen, in denen unter normalen Futterbedingungen keine *enok*-Expression stattfand.

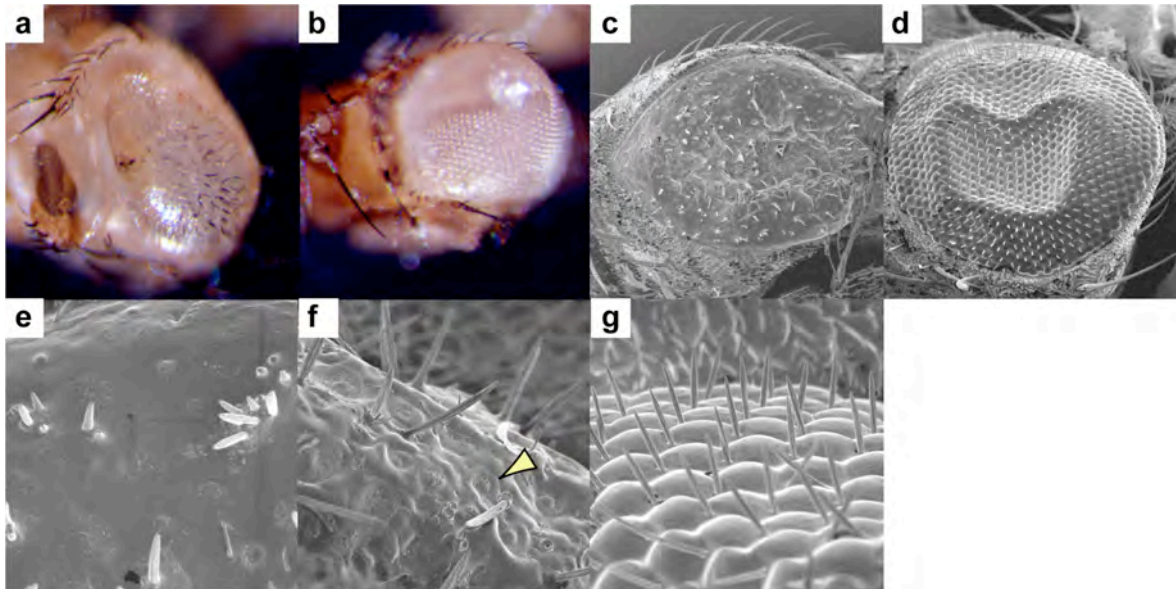
*Enok* wurde also spezifisch sowohl im Gehirn als auch in den Augenantennen-Imaginalscheiben von Larven exprimiert. Ein unbekanntes Nahrungssignal, das nicht Zucker-abhängig war, erhöhte in gehungerten Larven im Gehirn und vielleicht auch in den Augenantennenscheiben die *enok*-Transkription. Desweiteren zeigten *rot<sup>60</sup>*-Larven, in denen das *enok*-Gen durch eine Nonsensmutation beschädigt war, Nahrungsaufnahme- und Wachstumsdefekte. Der

nächste Schritt war nun, transgene Tiere herzustellen, in denen *enok* im Gal4-UAS-kontrollierten Missexpressionssystem (Brand und Perrimon, 1993) untersucht werden konnte. Hierbei sollten die Effekte einer *enok*-Missexpression auf Nahrungsaufnahme und Wachstum untersucht werden.

## 2.9 Überexpression von *enok*

Um das Überexpressionskonstrukt pRed3 zu klonieren, wurde die Voll-Längen cDNS von *enok* aus pMax10 in den P-Element-Vektor pP{UAST} ligiert (siehe 4.7). In diesem Plasmid stand *enok* unter der Kontrolle von fünf UAS-Promotoren (*Upstream Activation Sequence*), die durch den Hefe-Transkriptionsfaktor Gal4 stark aktiviert werden konnten. Durch die Kreuzung von UAS-*enok*-Linien mit Fliegenlinien, die Gal4 unter der Kontrolle spezifischer Promotoren oder Enhancer exprimierten, konnte *enok* gezielt aktiviert werden. Die Keimbahn-Transformation (Spradling und Rubin, 1983) von pRed3 erbrachte zwei unabhängige transgene Linien: UAS-*enok*<sup>3</sup> und UAS-*enok*<sup>4</sup>. Die meisten Versuche wurden mit der Linie UAS-*enok*<sup>4b</sup> durchgeführt.

UAS-*enok*<sup>4b</sup> wurde zunächst mit einer *elav*-Gal4-Linie gekreuzt. In dieser Linie wurde Gal4 unter der Kontrolle des *elav*-Promotors in allen postmitotischen Neuronen exprimiert. Die Nachkommenschaft zeigte starke Lethalität während der Embryonalentwicklung und spätestens in der Larvalentwicklung. Dasselbe Ergebnis ergaben auch Versuche mit UAS-*enok*<sup>4a</sup> und UAS-*enok*<sup>3a</sup>. Die Kreuzung mit *24B*-Gal4, in der Gal4 im Mesoderm aktiviert wird, zeigte einen ähnlichen Phänotyp. Die Phänotypen aus diesen beiden Kreuzungen wurden nicht weitergehend untersucht.



**Abb 2.22** Augendefekte in *GMR-enok*.

(a) Lichtmikroskopische Aufnahme eines *GMR-enok*-Facettenauges. (b) Lichtmikroskopische Aufnahme eines *W1118*-Kontroll-Facettenauges. (c) Rasterelektronenmikroskopische (REM) Aufnahme eines *GMR-enok*-Facettenauges. (d) REM-Aufnahme eines *W1118*-Kontroll-Facettenauges. Durch einen notwendigen Trocknungsprozess sind die Augen in manchen Bereichen kollabiert. (e) 10-fache Vergrößerung aus (c) im Randbereich. (f) 10-fache Vergrößerung aus (c) im inneren Bereich. Die Pfeilspitze deutet auf eine runde Struktur. (g) 10-fache Vergrößerung aus (d).

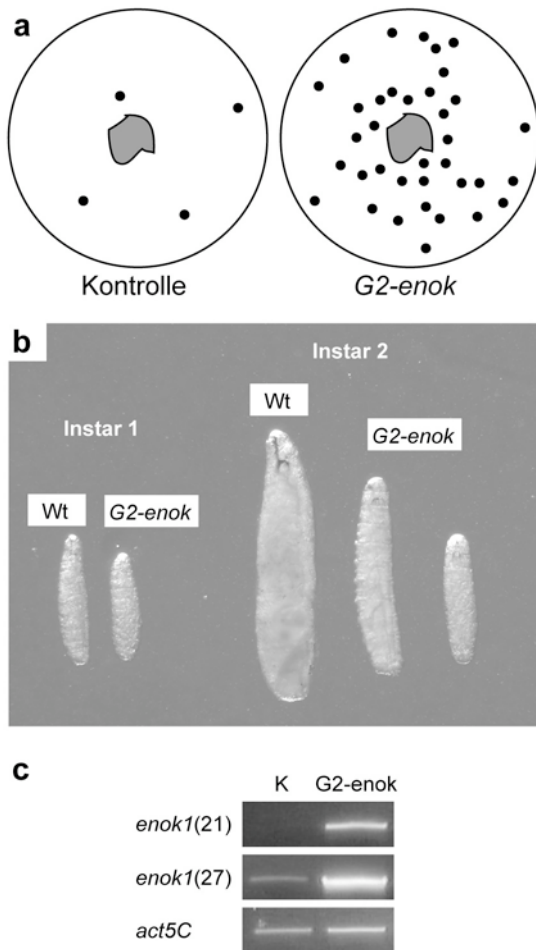
### 2.9.1 Überexpression von *enok* unter dem *glass*-Enhancer verursacht Defekte in der Augenentwicklung

Um nicht-lethale Wachstums-Phänotypen untersuchen zu können, sollte *enok* im Auge exprimiert werden. Dazu wurde die Linie *GMR-Gal4*, die Gal4 in Zellen hinter der morphogenetischen Rinne (*morphogenetic furrow*) in der Augenantennen-Imaginalscheibe exprimiert (Moses und Rubin, 1991), mit *UAS-enok<sup>4b</sup>* gekreuzt. In ihr wurde Gal4 durch den *glass*-Enhancer kontrolliert. In den adulten F1-Nachkommen (*GMR-enok*) war in allen Tieren zu erkennen, dass die Komplexaugen-Struktur völlig zerstört war (Abb 2.22 a). In Lichtmikroskopischen Aufnahmen konnte im Vergleich zu Wildtyp-Augen (Abb 2.22 b, unpigmentiertes Auge einer *W<sup>1118</sup>*-Fliege) erkannt werden, dass die gleichmäßige Facettenstruktur nicht mehr vorhanden war. Außerdem fehlte die Pigmentierung und es waren ungewöhnlich große schwarze Borsten zu erkennen. Die Gesamtgröße und -form des Komplexauges schien dagegen normal zu sein. Mit der freundlichen Hilfe von Herrn Abaffy (Institut für Mikrostrukturtechnik, Forschungszentrum Karlsruhe) wurden rasterelektronenmikroskopische (REM) Untersuchungen an *GMR-enok*-

Augen und Wildtyp-Augen vorgenommen (Abb 2.22 c bis g). Der zuvor beschriebene Phänotyp wurde hier noch einmal deutlich (Abb 2.22 c und d). Im Vergleich zu den regelmäßig angeordneten Borsten im Wildtyp-Auge (Abb 2.22 d) erschienen die Borsten im *GMR-enok*-Auge ungeordnet und außerdem im inneren Bereich des Komplexauges länger und zahlreicher als im Randbereich (Abb 2.22 c). In einer Ausschnittsvergrößerung wurde deutlich, dass im Wildtyp-Auge insgesamt pro Ommatidium eine Borste vorhanden war (Abb 2.22 g), so dass jedes Einzelauge von drei Borsten (an jeder zweiten Ecke des Sechsecks) umgeben wurde. Außerdem waren die Borsten senkrecht zur Augenoberfläche ausgerichtet. Im *GMR-enok*-Auge dagegen waren keine Einzelommatidien zu erkennen und die Borsten standen ungeordnet, einzeln oder in Gruppen auf dem Auge verteilt (Abb 2.22 e und f). In Bereichen, in denen aufgrund des für die REM-Aufnahmen notwendigen Trocknungs-Prozesses das Auge eingefallen war (siehe auch Abb 2.22 d), konnten im *GMR-enok*-Auge runde Strukturen erkannt werden (Abb 2.22 f), die vom unter der Cornea gelegenen Kristallkegel stammen konnten. Diese Ergebnisse wurden mit den Linien *UAS-enok*<sup>4a</sup> und *UAS-enok*<sup>3a</sup> reproduziert.

### **2.9.2 Überexpression von *enok* unter dem *G2*-Promotor verursacht Defekte im Larvenwachstum, beim Verhalten und bei der Hungerreaktion**

Eine weitere Gal4-Linie, die für Kreuzungen verwendet wurde, war *G2-1032* (Lyko et al., 1999). In ihr wurde Gal4 unter einem unbekanntem Promotor exprimiert, der ab einem mittleren Embryonalstadium durch alle Larvenstadien hindurch ubiquitär aktiv war (persönliche Kommunikation mit Dr. Frank Lyko). Die erste Beobachtung war, dass die *G2-enok*-Larven (*G2-gal4/UAS-enok*) ungefähr 30 Stunden nE begannen das Futter zu verlassen (Abb 2.23 a). Normalerweise nahmen Larven ununterbrochen (mit kurzer Unterbrechung bei der Häutung) Nahrung auf. Dabei hielten sie sich in der Regel im Futter auf. Erst ungefähr zwölf Stunden vor der Puppen-Phase zeigten sie ein sogenanntes Wanderverhalten, wenn sie die Futterquelle verließen, um einen Platz für die Verpuppung zu suchen (Riddiford, 1993). Auch in *pp1*-Mutanten wurde ein ähnliches Verhalten beobachtet (Zinke et al., 1999). Aus sechs Ansätzen für Tiere der *G2-enok*-Linie und drei Kontroll-Populationen (*G2-gal4/G2-gal4*) wurden stündlich die wandernden Larven

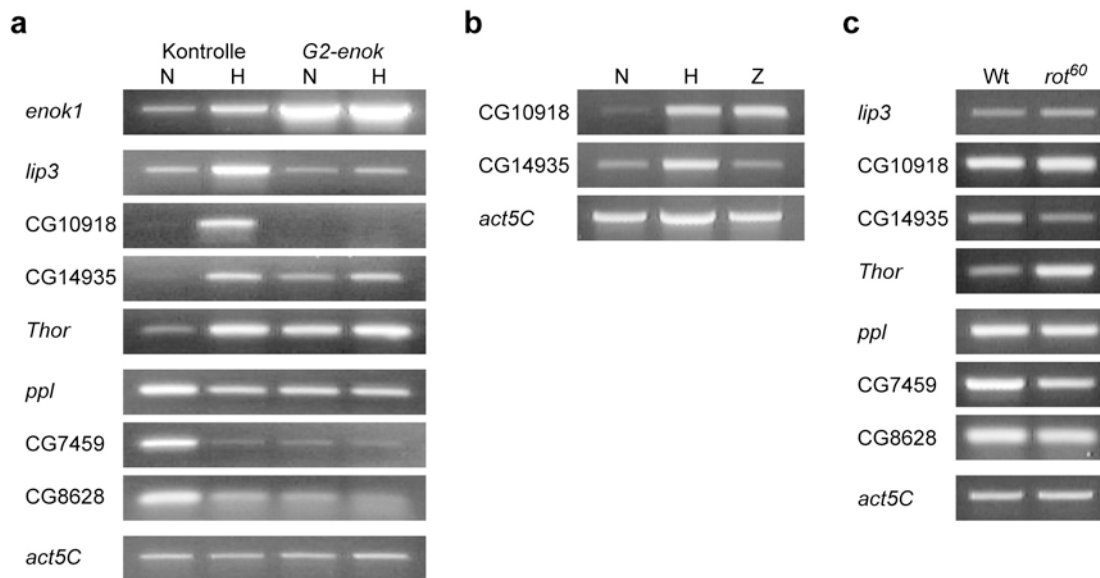


**Abb 2.23** Der *G2-enok*-Phänotyp. **(a)** Dieses Schema zeigt einen Schnappschuss der Larvenaufenthaltsorte (Punkte) außerhalb der Hefe (grau) auf einer Apfelagarplatte 46 h nE in einem von mehreren Experimenten. In Kontrolltieren (*G2-gal4/ G2-gal4*) befanden sich nur vier von 87 Tieren außerhalb des Futters, dagegen in *G2-enok* 36 von 91. Es wurden Vier-Stunden-Eiersammlungen für diese Versuche durchgeführt. **(b)** Größenvergleich von Wildtyp-Larven (Wt) mit *G2-enok*-Larven im ersten und zweiten Instar. **(c)** Die Überexpression von *enok* in *G2-enok*-Larven ist sehr stark. Die Zahlen zeigen die Anzahl an RT-PCR-Zyklen. Actin (*act5C*) wurde als Ladekontrolle verwendet. Die RT-PCR-Primer sind in 4.10 aufgeführt. K, Kontrolltiere wie in (a).

entfernt. Von insgesamt 208 Kontrolltieren befanden sich während des Versuchs nur 7 Tiere außerhalb des Futters (3,4 %). Gleichzeitig wurden aus dem *G2-enok*-Ansatz von 382 Larven 297 wandernde Tiere entfernt (78 %). Um zu zeigen, dass dieses Wanderverhalten nicht auf die transgenen Insertionen zurückzuführen ist, wurden Larven aus Kontrollkreuzungen beobachtet. Weder in *G2-gal4/UAS-ppI*-Larven noch in *24B-gal4/UAS-enok*-Larven wurde ein Wanderverhalten festgestellt. Weil sowohl *rot*-Allele als auch *ppI*-Mutanten Wachstumsdefekte zeigten, wurde die Größe von *G2-enok*-Larven mit der von Kontrolltieren (Wildtyp) verglichen (Abb 2.23 b). Am Ende des zweiten Instar waren *G2-enok*-Larven signifikant kleiner als Kontroll-Larven. Außerdem erreichten sie nie das Puppenstadium. Zwischen frühem zweitem und frühem dritten Instar starben die meisten Tiere. Diese Beobachtungen wurden auch in einer Kreuzung mit *UAS-enok*<sup>3a</sup> gemacht.

Bei der Untersuchung von *ppI*-Larven wurde gezeigt, dass der Hunger-Marker *lip3* in ihnen nicht wie in gehungerten Tieren hochreguliert wurde, obwohl





**Abb 2.24** Expression von Hungermarker-Genen in *G2-enok* unter Hungerbedingungen. **(a)** Expression von Markergenen in Kontrolllarven (*G2-gal4/G2-gal4*) und *G2-enok*-Larven unter normalen Futterbedingungen (N) oder Hunger (H). **(b)** Zwei Hungermarker-Gene wurden auf ihre Regulation unter Hunger (H) bzw. Zuckerfütterung (Z) in Wildtyp-Larven (zweites Instar) untersucht. **(c)** Regulation der Hungermarker in *rot<sup>60</sup>*-Larven. Es wurden Vier-Stunden-Eiersammlungen für die Versuche in (a) und (b) durchgeführt. In (c) wurden in einer zwölf Stunden Periode *rot<sup>60</sup>*-Larven mit Fressdefekt gesammelt. Actin (*act5C*) wurde als Ladekontrolle verwendet. Die RT-PCR-Primer sind in 4.10 aufgeführt.

sie wanderten, einen Fressdefekt hatten und nicht wuchsen (Zinke et al., 1999). Deshalb wurden *G2-enok*-Larven mit RT-PCR-Analysen untersucht. In Larven des späten ersten Instar wurde zunächst gezeigt, dass die Überexpression von *enok* auf transkriptionellem Level sehr stark war (Abb 2.23 c). Neben *lip3* wurden auch andere Marker verwendet, die bei der Untersuchung von verschiedenen Nahrungsbedingungen auf Affymetrix *Drosophila* Gene Chips identifiziert wurden (Zinke et al., 2002). Dazu wurden *G2-enok*-Larven und Kontroll-Larven (*UAS-enok/UAS-enok*) 28 Stunden nE gewaschen und dann entweder für 18 Stunden gehungert oder normal gefüttert. Als weitere Marker wurden die Gene *ppl*, CG10918 (ATP-abhängige RNS Helikase), CG14935 (Maltose Vorstufe), *Thor* (4E-BP1, eukaryotischer Initiationsfaktor 4E-Bindeprotein), CG7459 (Kupfer-Transporter) und CG8628 (Diazepam-bindender Inhibitor/Acyl-CoA-bindendes Protein) verwendet. Es konnte festgestellt werden, dass die *enok*-Expression in *G2-enok*-Larven sehr viel stärker war als in der Hungerreaktion von Kontrolltieren (Abb 2.24 a). Neben *lip3* wurden drei der zusätzlich untersuchten Gene (CG10918, CG14935 und *Thor*) unter Hunger hochreguliert (Abb 2.24 a, Spalten 1 und 2). Die Gene *ppl*, CG7459 und CG8628 wurden reprimiert. In *G2-enok*-Larven

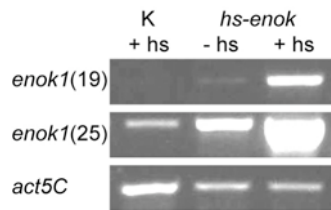
wiesen fünf der Marker auf eine Hungerreaktion hin (Abb 2.24 a, Spalte 3). Neben *lip3* wurde aber auch CG10918 nicht wie in der Kontrollsituation reguliert. Selbst ein zusätzlicher Entzug von Nahrung zeigte keine transkriptionelle Aktivierung von *lip3* und CG10918 in *G2-enok*-Larven (Abb 2.24 a, Spalte 4). Da *lip3* Zucker-abhängig reguliert wurde (siehe oben), stellte sich die Frage, ob es einen Zusammenhang zwischen Zucker-abhängiger Regulierung und Nichtregulierung in *G2-enok*-Larven gab. Deshalb wurde die transkriptionelle Aktivität von CG10918 und CG14935 in Wildtyp-Larven nach 24 Stunden Hungern (H) oder nach 24 Stunden Fütterung von Saccharoselösung (Z) untersucht (Abb 2.24 b). CG10918, das wie *lip3* in *G2-enok*-Larven nicht reguliert wurde, war im Gegensatz zu *lip3* nicht Zucker-reguliert. CG14935 dagegen, das in *G2-enok*-Larven Hungerbedingungen anzeigte, wurde wie *lip3* Zucker-abhängig reguliert. Ob ein Gen in Kontrolltieren Zucker-abhängig reguliert wurde, hatte also keinen Einfluss auf seine Regulation in *G2-enok*-Larven.

Bei der RT-PCR-Analyse der *enok*-Mutanten (*rot<sup>60</sup>*) wurden ebenfalls die Hungermarker verwendet (Abb 2.24 c). Außer *Thor* wurde dabei kein anderer Marker im selben Maße wie in gehungerten Kontrolltieren reguliert. Dies konnte darauf zurückgeführt werden, dass die meisten *rot<sup>60</sup>*-Larven (besonders Kategorie zwei) noch soviel Futter aufnahmen, dass eine starke Hungerreaktion ausblieb. Weitere Untersuchungen an gehungerten *rot<sup>60</sup>*-Larven werden klären helfen, ob diese Tiere eine Hungerreaktion zeigen.

*G2-enok*-Larven zeigten ungewöhnliche Verhaltensweisen. Sie verließen schon im ersten Instar das Futter und zeigten ein Wanderverhalten. Außerdem hatten sie Wachstumsdefekte und starben spätestens im frühen dritten Instar. Obwohl sie sich lange Zeit außerhalb des Futters aufhielten und somit weniger Nahrung aufnehmen konnten, zeigten sie in einigen Fällen keine Hungerreaktion, selbst wenn man sie völlig von einer Futterquelle entfernte. Da die starke *enok*-Expression in *G2-enok*-Larven schon in der Embryonalentwicklung begann, konnte der beschriebene Phänotyp teilweise auf Effekten sekundärer Art wie langes Hungern oder Entwicklungsdefekten aus der Embryonalphase beruhen. Diese Sekundärauswirkungen blieben in einem System aus, in dem die *enok*-Aktivität in der Larve induzierbar wäre. Deshalb wurde eine durch Hitzeschock induzierbare Gal4-Linie mit *UAS-enok* gekreuzt.



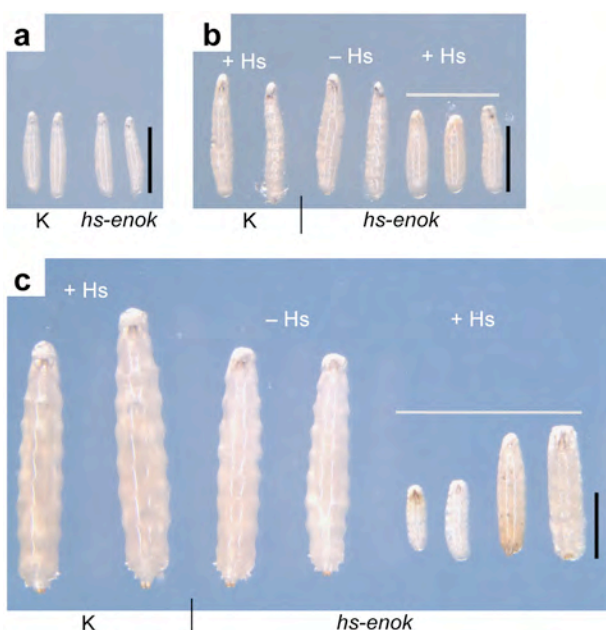
### 2.9.3 Überexpression von *enok* unter dem *hsp70*-Promotor verursacht ähnliche Defekte wie Expression unter dem *G2*-Promotor



**Abb 2.25** Überexpression von *enok* durch Hitzeschock. Die *enok*-Expression in einer Hitzeschock-Kontrolle (*hs-gal4/hs-gal4*, K, +hs), in *hs-enok* ohne Hitzeschock (-hs) bei 25 °C und in *hs-enok* mit Hitzeschock (+hs). Die Zahlen geben die Anzahl von RT-PCR-Zyklen an. Actin (*act5C*) wurde als Ladekontrolle verwendet. Die RT-PCR-Primer sind in 4.10 aufgeführt.

In der *hs-gal4*-Linie stand Gal4 unter der Kontrolle des *hsp70*-Promotors (heat shock protein 70 kDA). Die Versuche wurden bei 18 °C durchgeführt, da *hs-enok*-Larven (*hs-gal4/UAS-enok*) bei 25 °C auch ohne Hitzeschock eine erhöhte *enok*-Expression zeigten (Abb 2.25). Zunächst wurden die *hs-enok*-Larven auf Wachstumsdefekte hin untersucht. Der Hitzeschock (37 °C, 40 Minuten) erfolgte 72 Stunden nE, was einem frühen bis mittlerem ersten Instar entsprach (es ist zu beachten, dass bei 18°C die Entwick-

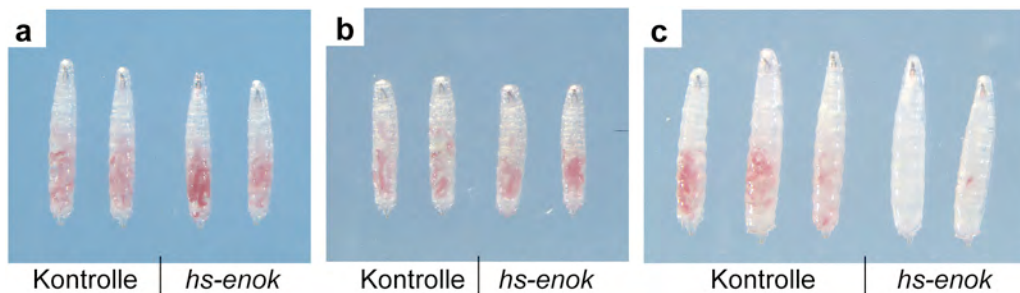
lungszeit um etwa das zwei- bis dreifache verlängert war). Parallel zu Hitzeschock-behandelten Kontrolltieren (*hs-gal4/hs-gal4*) und *hs-enok*-Larven wurden auch *hs-enok*-Larven beobachtet, die keinem Hitzeschock ausgesetzt wurden. Vor dem Hitzeschock zeigten Kontroll-Larven und *hs-enok*-Larven eine vergleichbare Größe (Abb 2.26 a), aber bereits 30 Stunden nach dem Hitzeschock (Larvenalter 103 h nE) konnte ein signifikanter Größenunterschied erkannt werden



**Abb 2.26** Wachstumsdefekte in *hs-enok* durch *enok*-Überexpression.

(a) Larven im ersten Instar direkt vor dem Hitzeschock. (b) Larven 30 h nach dem Hitzeschock. (c) Larven vier Tage nach dem Hitzeschock.

Die schwarze Größenmarke (jeweils rechts) entspricht 1 mm. Die Tiere wurden bei 18 °C gehalten. Abkürzungen wie in Abb 2.25.



**Abb 2.27** *hs-enok*-Larven beenden die Nahrungsaufnahme unter *enok*-Überexpression. **(a)** Larven wurden vier Stunden nach dem Hitzeschock für eine Stunde auf rotes Futter gesetzt. **(b)** Larven wurden acht Stunden nach dem Hitzeschock für eine Stunde auf rotes Futter gesetzt. **(c)** Larven wurden 22 Stunden nach dem Hitzeschock für eine Stunde auf rotes Futter gesetzt. Die Tiere wurden bei 18 °C gehalten.

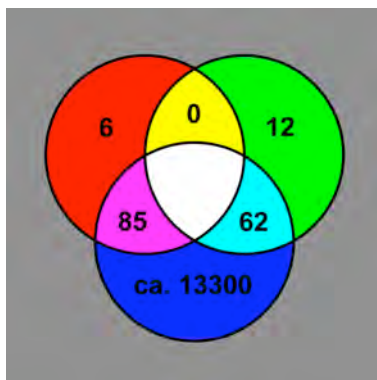
(Abb 2.26 b). Verglichen mit beiden Kontrollansätzen waren die hitzegeschockten *hs-enok*-Larven kleiner. Dieser Wachstumsdefekt wurde an Tag vier nach dem Hitzeschock noch deutlicher (Abb 2.26 c). Noch lebende hitzegeschockte *hs-enok*-Larven zeigten einen Wachstums-Stillstand (man beachte die Größenmarkierungen in Abb 2.26). Kontroll-Tiere verpuppten sich zwischen Tag 9 und 11 nE, *hs-enok*-Larven (ohne Hitzeschock) zwischen Tag 10 und 13 nE. Hitzegeschockte *hs-enok*-Larven verpuppten sich nie. Aus den verpuppten Kontrolltieren schlüpften 15 Tage nE adulte Fliegen und aus den *hs-enok*-Puppen ohne Hitzeschock 17 Tage nE. Eine weitere Beobachtung während des Versuchs war, dass ungefähr 12 Stunden nach dem Hitzeschock in *hs-enok*-Larven das Wanderverhalten auftrat. Wurden vier oder acht Stunden nach dem Hitzeschock Larven von ungefärbtem Futter für eine Stunde in gefärbtes Futter gesetzt, war kein Unterschied bei der Futteraufnahme zwischen Kontroll-Larven und *hs-enok*-Larven zu erkennen (Abb 2.27 a und b). Bei einem äquivalenten Versuch 22 Stunden nach dem Hitzeschock, konnte sowohl bei *hs-enok*-Larven, die größtenteils außerhalb des Futters waren, als auch bei solchen, die sich in der Hefe befanden, kein Futter im Darm erkannt werden (Abb 2.27 c). Die Überexpression von *enok* während des Larvenstadiums führte also zu Wachstumsdefekten, zu Wanderverhalten und zu einer Verzögerung der Larven- und Puppenentwicklung. Außerdem stoppten die Tiere in der Phase zwischen acht und 22 Stunden nach dem Hitzeschock die Nahrungsaufnahme.

Sowohl die Mutation von *enok* als auch die Überexpression hatte Auswirkungen auf das Wachstum, auf die Nahrungsaufnahme und auf die Hungerreaktion. Scott und Kollegen (2001) haben desweiteren gezeigt, dass *enok*

eine Rolle bei der Neuroblastenproliferation spielte. Außerdem führte Überexpression in den Komplexaugen zur einer Fehlentwicklung. Veränderungen des Chromatins, die durch Histon Acetyltransferasen verursacht wurden, gingen immer auch mit Genaktivierung einher (Marmorstein und Roth, 2001). Die Mutation oder Überexpression von *enok*, sehr wahrscheinlich eine HAT, sollte also transkriptionelle Veränderungen von möglichen Zielgenen verursacht haben. Die Identifizierung dieser Zielgene sollte weitere Einblicke in die Regulation von Nahrungsaufnahme und Wachstum ermöglichen. Eine Kollaboration mit Dr. Kevin White (Yale University, New Haven, USA) ermöglichte die Benutzung von DNS-Microarrays (Kevin-White-Chips), um solche Zielgenkandidaten zu identifizieren.

## 2.10 Erste Schritte bei der Identifizierung von möglichen *enok*-Zielgenen

Kevin-White-Chips basierten auf PCR-Produkten von ungefähr 13500 Genen (White et al., 1999) und enthielten somit einen Großteil aller *Drosophila*-Gene. In der Microarray-Analyse wurden zum einen *rot<sup>60</sup>*-Larven und zum anderen *G2-enok*-Larven untersucht. Aus drei unabhängigen Sammlungen von Wildtyp-



**Abb 2.28** Kategorisierung von Kevin-White-Chip-Daten. Erklärung im Text.

Larven (38-48 h nE) sowie *G2-enok*-Larven (38-48 h nE) und aus zwei unabhängigen Sammlungen von homozygoten *rot<sup>60</sup>*-Larven (42-52 h nE) wurde PolyA<sup>+</sup>-RNS isoliert. In verschiedenen Kombinationen (siehe 5.5.18) wurden auf vier Microarrays *G2-enok*-Proben mit Wildtyp-Proben und auf drei Microarrays *rot<sup>60</sup>*-Proben mit Wildtyp-Proben verglichen (siehe 5.5.17 und 5.5.18). Nach globaler Normalisierung (mit einem Faktor, der die Gesamtintensitäten der zu vergleichenden Proben angeglichen) wurden die Werte

für jedes Gen der vier Datensätze für *G2-enok* bzw. der drei Datensätze für *rot<sup>60</sup>* gemittelt, so dass nun für jedes Gen zwei Werte, je einer pro Versuch, vorlagen (unter <http://itgmv.fzk.de/pankratz/zinke.php> kann eine Excel-Tabelle mit den Daten für jedes Gen heruntergeladen werden). Diese Werte gaben die relative Vielfach-Induktion oder -Repression der Überexpressions- bzw. Mutationssituation

<b>Gennamen</b>	<b>G2-enok</b>	<b>rot<sup>60</sup></b>	
<i>enok</i>	35,4	1,9	<i>enoki mushroom</i> , MYST-HAT
<i>w</i>	24,1	1,1	<i>white</i> , ABC Transporter
<i>ImpL2</i>	17,8	2,0	<i>ecdysone-inducible gene L2</i>
CG13878	7,9	1,9	unbekannt
<i>scylla</i>	7,5	1,9	RNS-bindendes Protein, prä-mRNS Prozessierung
<i>GstD22</i>	7,5	-1,4	<i>Gluthathion-S Transferase D22</i> , Pseudogen
CG2064	7,0	1,4	kurzkettige Acyl-CoA Dehydrogenase
CG11911	6,4	1,4	Serin-Proteinase
<i>pcl</i>	5,8	1,9	<i>pepsinogen-like</i> , Cathepsin, intracelluläre Protease
<i>Akap200</i>	5,7	1,9	<i>A kinase anchor protein 200</i> , PKAII-bindendes Protein
CG18522	5,7	1,4	Aldehyd-Oxidase/Xanthin-Dehydrogenase
CG17843	5,6	1,4	Thioredoxin, Quiescin Q6-ähnlich, Nukleotid-Biosynthese
CG8665	5,6	-2,7	N <sub>10</sub> -Formyl-THF Dehydrogenase, Purin-Biosynthese
CG14418	5,4	-1,2	EG:BACR43E12.5, unbekannt
CG14872	5,2	1,8	unbekannt, Lipocalin-Domäne
CG6447	-5,0	-1,8	unbekannt, Fliegen-Proteinfamilie
CG13170	-5,3	1,1	unbekannt
CG6271	-5,6	-1,2	pankreatische Triacylglycerol Lipase
CG17764	-5,6	-1,8	kleines Kern-Ribonukleoprotein, LSM4-Homolog
CG8869	-5,6	1,2	Chymotrypsin
CG8871	-5,9	-1,3	Chymotrypsin
CG6283	-5,9	-1,1	pankreatische Triacylglycerol Lipase
CG10131	-5,9	-1,4	3-Hydroxyacyl-CoA Dehydrogenase
CG4377	-6,3	1,1	unbekannt
CG5804	-6,3	1,4	Acyl-CoA-bindendes Protein/Diazepam-bindender Inhibitor
CG8664	-6,3	-1,6	unbekannt
CG7170	-6,3	-1,4	Chymotrypsin
CG8629	-6,3	nr	Acyl-CoA-bindendes Protein/Diazepam-bindender Inhibitor
CG16713	-8,3	-1,3	Serin-Proteinase Inhibitor
CG7941	-8,3	-1,5	Strukturprotein der Larven-Cuticula
CG10531	-10,0	-1,5	Chitinase

**Tab 2.5** Gene, die in *G2-enok*, nicht aber in *rot<sup>60</sup>* im Vergleich zu Wildtyp-Larven reguliert werden. Details zur Einteilung im Text. Die Werte stehen für die Vielfach-Induktion (positiv) oder Repression (negativ). Gelb, zwischen +2,0 und -2,0 (unverändert); rot, mehr als fünffach induziert; blau, mehr als fünffach reprimiert; hellblau, zwischen zweifach und fünffach reprimiert. nr, nicht reguliert.

im Vergleich zur Wildtyp-Situation wieder. Unter Verwendung von GeneSpring™ Software (Version 4.0, Silicon Genetics, USA) wurden diese Gene in Mengen eingeordnet und anschließend in einem Mengen-Diagramm untersucht (Abb 2.28). Es wurden drei Mengen gebildet (zu beachten ist, dass sich dabei ein Gen in mehreren Mengen befinden kann). In die erste Menge kamen alle Gene, die in

mindestens einer der beiden Situationen (*G2-enok* und/oder *rot<sup>60</sup>*) mehr als oder genau fünffach induziert ( $> 5,0$ ) waren (Abb 2.28, Kreismenge links oben), in die zweite Menge kamen alle Gene, die in mindestens einer der beiden Situationen mehr als oder genau fünffach reprimiert ( $< -5,0$ ) waren (Abb 2.28, Kreismenge rechts oben) und in die dritte Menge kamen alle Gene, deren Werte in mindestens einer der beiden Situationen zwischen fünffach induziert und fünffach reprimiert ( $< 5,0$  und  $> -5,0$ ) waren (Abb 2.28, Kreismenge unten). Der stringente Grenzwert wurde gewählt, um nur stark regulierte Gene zu identifizieren. Die erste Feststellung war, dass kein Gen in *G2-enok* induziert und in *rot<sup>60</sup>* reprimiert (oder umgekehrt) war (Abb 2.28, gelbes Feld). Sechs Gene waren in beiden Situationen mehr als fünffach hochreguliert (rotes Feld) und zwölf Gene waren in beiden Situationen mehr als fünffach reprimiert (grünes Feld). Neben diesen 18 Genen gehörten auch die Gene aus dem magentafarbenen und hellblauen Feld zu mög-

<b>Gennamen</b>	<b><i>G2-enok</i></b>	<b><i>rot<sup>60</sup></i></b>	
CG17107	1,1	7,5	unbekannt, eggshell-Domäne
<i>Ag5r</i>	1,8	5,7	<i>Antigen 5-related</i> , sekretorisches Protein
CG16885	-1,2	5,4	unbekannt
CG13560	-1,7	5,1	Fibrinogen-ähnlich
<i>Gr36b / c</i>	-1,1	-5,9	<i>Gustatory receptor 36b/c</i>
<i>Hsp22</i>	nr	-5,9	<i>heat shock protein 22</i>
<i>Hsp23</i>	1,2	-6,3	<i>heat shock protein 23</i>
CG6441	-1,5	-6,7	unbekannt

**Tab 2.6** Gene, die in *rot<sup>60</sup>*, nicht aber in *G2-enok* im Vergleich zu Wildtyp-Larven reguliert werden. Details zur Einteilung im Text. Die Werte stehen für die Vielfach-Induktion (positiv) oder Repression (negativ). Abk. und Farbcode wie in Tab 2.5.

lichen Zielgenkandidaten. Diese Gene waren in einem der beiden Situationen mehr als fünffach induziert bzw. reprimiert, während der zweite Wert jeweils zwischen den Grenzwerten lag. Das blaue Feld schließlich zeigt Gene, deren Werte beide zwischen den Grenzwerten lagen. Die Zahl der möglichen von *enok* stark beeinflussten Zielgene lag also nach einer ersten Bewertung bei 165. In einer weiteren Analyse wurde die Auswahlstringenz nochmal erhöht. Die Gene wurden durch ein Doppel-Grenzwert-Verfahren in drei Kategorien eingeteilt. Kategorie eins enthält Gene, die in *G2-enok*-Larven mehr als oder genau fünffach induziert oder reprimiert wurden und gleichzeitig in *rot<sup>60</sup>*-Larven zwischen +2,0 und

<b>Gencode</b>	<b>G2-enok</b>	<b>rot<sup>60</sup></b>	
<i>Thor</i>	8,0	5,9	eIF4E-Bindeprotein, Translationsregulation
CG7876	7,3	6,1	Strukturprotein
AI296841	7,3	7,4	B-box binding factor-1
CG6933	5,2	5,0	Peritrophin-ähnlich
AI387810	5,2	5,2	unbekannt
CG4554	-5,9	-9,1	hDRIM-Homolog
CG14242	-5,9	-7,7	unbekannte Fliegen-Proteinfamilie
<i>Lsp1beta</i>	-6,7	-8,3	<i>larval serum protein 1 beta</i>
CG7968	-8,3	-5,6	BG:DS00941.15, unbekannt
CG7406	-8,3	-11,1	unbekannt
CG17571	-12,5	-9,1	Serin-Proteinase
CG14143	-16,7	-5,6	unbekannt

**Tab 2.7** Gene, die sowohl in *rot<sup>60</sup>* als auch in *G2-enok* im Vergleich zu Wildtyp-Larven reguliert werden. Details zur Einteilung im Text. Die Werte stehen für die Vielfach-Induktion (positiv) oder Repression (negativ). Farbcode wie in Tab 2.5.

-2,0 lagen (außer sie waren entgegengesetzt reguliert). In Kategorie zwei sind Gene, für die es sich wie für Gene aus Kategorie eins verhielt, nur in diesem Fall für *rot<sup>60</sup>*-Larven. Und in Kategorie drei finden sich Gene, die sowohl in *G2-enok*-Larven als auch in *rot<sup>60</sup>*-Larven mehr als oder genau fünffach induziert oder reprimiert waren. In Kategorie eins befanden sich 31 (Tab 2.5), in Kategorie zwei acht (Tab 2.6) und in Kategorie drei zwölf Gene (Tab 2.7). Die Zahl der möglichen *enok*-Zielgene war so auf 49 reduziert worden. Details über die vorläufige Liste möglicher *enok*-Zielgene soll Bestandteil der Diskussion sein.

Wie schon oben erwähnt, konnten Sekundärauswirkungen in steuerbaren Systemen reduziert werden. Deshalb wurden RNS-Proben aus Hitzeschock-Experimenten vorbereitet, die zukünftig mit Kevin-White-Chips analysiert werden können. Hier könnten zum Beispiel Hungereffekte ausgeschlossen werden, indem man Proben isoliert, bevor die Larven die Nahrungsaufnahme einstellen (siehe Abb 2.27). Es wurden also Gene identifiziert, die durch Überexpression oder Mutation von *enok* anders reguliert wurden als unter Wildtyp-Bedingungen, in denen *enok* regulär exprimiert wurde. Diese Liste mit möglichen Zielgenen zusammen mit *enok*-Antikörpern und Expressionskonstrukten sind Werkzeuge, mit denen nach der bis jetzt erfolgten molekularbiologischen Charakterisierung von *enok* funktionelle Daten gesammelt werden können, um die Rolle von *enok* bei der Regulation der fundamentalen Vorgänge - Nahrungsaufnahme und Wachstum - zu verstehen.



### 3 Diskussion

Es sind nicht viele Gene bekannt, die bei der Regulation von Nahrungsaufnahme und Wachstum eine Rolle spielen. *pumpless* zum Beispiel ist ein solches Gen, bei dessen Mutation Fressdefekte und Wachstumsdefekte auftreten (Zinke et al., 1999). In einem Verhaltens-Screen für Fressdefekte in *Drosophila*-Larven, bei dem auch *ppl* entdeckt wurde, wurde die P-Element-Linie *I(2)09373* isoliert. Es wurde bewiesen, dass eine Mutation des *enoki mushroom*-Gens für den Fress- und Wachstums-Phänotyp in dieser Linie verantwortlich ist. Sowohl der *enok*-Lokus als auch die *enok*-cDNS wurden identifiziert, kloniert und sequenziert. Das Enok-Protein zeigt sehr hohe Sequenz-Homologie zur MYST-Familie der Histon-Acetyltransferasen. Für die Expression von *enok* in der Wildtyp-Situation wurde gezeigt, dass Hunger, also eine bestimmte Nahrungsbedingung, bei der Larven das Wachstum einstellen, die *enok*-Transkription verstärkt. Und bei *enok*-Überexpression wurde ein Wachstumsdefekt verbunden mit einem Wanderverhalten sichtbar, bei dem Larven die Futterquelle verlassen. Außerdem wird *enok* außer in den Augenantennen-Imaginalscheiben auch sehr spezifisch im Gehirn von Larven exprimiert, einem übergeordneten Organ, das die Reaktion des Organismus auf exogene und endogene Signale koordiniert. Aus all diesen Daten lässt sich ein Rolle für *enok* erkennen, die vielleicht an der Schnittstelle zwischen Erkennung von Nahrungsbedingungen und angepasster Regulation des Wachstums an diese Bedingungen liegt. In den folgenden Abschnitten wird versucht, eine Hypothese über die Funktion von *enok* bei der Koordination von Nahrungsaufnahme und Wachstum aufzustellen und zu diskutieren.

#### 3.1 Die Mutation des *enok*-Gens verursacht den *rotkehlchen*-Phänotyp

In dem Verhaltens-Screen wurde neben *pumpless*-Mutanten auch *rot*<sup>9373</sup> isoliert. Der *rotkehlchen* genannte Fressphänotyp in *rot*<sup>9373</sup> gleicht sehr dem *ppl*-Phänotyp. Sie unterscheiden sich jedoch darin, dass der *ppl*-Phänotyp erst Mitte des ersten Instars auftritt, während der *rot*-Phänotyp auch in den EMS-*rot*-Allelen bereits nach der ersten Futteraufnahme sichtbar wird. Es wurde die Hypothese aufgestellt, dass in *ppl* zuerst eine bestimmte Konzentration an Glycin,

verursacht durch Mutation des Glycin-Spaltsystems, erreicht werden muß, bis sich der Fressdefekt zeigt (Zinke et al., 1999). In *rot*-Allelen dagegen scheint der Fressdefekt bei der ersten Mahlzeit durch physiologische Vorgänge zu entstehen oder bereits durch einen Entwicklungsfehler vorhanden zu sein. Nach der Identifizierung des genomischen Bereichs, in dem sich der *rotkehlchen*-Lokus befinden musste, wurde der *rot*-Phänotyp mit transgenen Fliegen durch ein genomisches Konstrukt gerettet, welches zwei Möglichkeiten eröffnete: entweder eine Mutation des *gek*-Gens oder eine Mutation in einem 6 kb genomischen Bereich, der groß genug war, um weitere Gene zu enthalten, verursacht den *rot*-Phänotyp. Der unbekannte Bereich wurde deshalb näher untersucht, weil in den parallel erzeugten EMS-*rot*-Allelen von zehn isolierten lethalen Linien fünf zu einer Komplementationsgruppe gehörten, in der der *rot*-Phänotyp zu sehen war. Es war unwahrscheinlich, dass aus einem mindestens 6 kb Bereich, der deletiert ist, 50 % der isolierten EMS-Linien den *gek*-Lokus betrafen, bei dem nur der Promotor von der Deletion zerstört wurde. Dieser genomische Bereich wurde mit Restriktionsverdau- und Southern-Transfer-Analysen charakterisiert, kloniert und sequenziert. Ebenso wurde ein Voll-Längen-cDNS-Klon zu einem in diesem Bereich identifizierten offenen Leseraster isoliert und sequenziert. Dass es sich bei dem isolierten Klon um eine Gesamt-cDNS handelt, folgte aus Northern-Transfer-Hybridisierungen, die eine ungefähr 7 kb große mRNS-Bande zeigten.

Um zu Beweisen, dass dieses Gen für den *rot*-Phänotyp verantwortlich ist, wurde die genomische DNS im Bereich des offenen Leserasters zweier *rot*-Allele, die den Fressdefekt zeigten, sequenziert, um die durch EMS verursachte Mutation zu identifizieren. Tatsächlich wurde in beiden Allelen eine dicht beieinander liegende Nonsensmutation gefunden. Den entgültigen Beweis, dass dieses neu identifizierte Gen (*enok*) für den *rot*-Phänotyp verantwortlich ist, erbrachte die Rettung des Fress- und Wachstumsdefekts in *rot*<sup>60</sup> durch ein genomisches Konstrukt, welches den gesamten *enok*-Lokus abdeckt und dessen *enok*-Aktivität auf eigene Promotor-Aktivierung angewiesen ist. Dass die Rettung nicht zu adulten Fliegen führte, die den Schlüpfvorgang überlebten, kann entweder auf fehlende Enhancer-Elemente oder auf Insertions-Stellen-spezifische Effekte zurückgeführt werden. Damit war also bewiesen, dass der klonierte und charakterisierte genomische Bereich ein Gen enthält, dessen Mutation den *rot*-Phänotyp verursacht. Die von diesem Gen - *enok* - codierte Proteinsequenz zeigt hohe



Homologie zu einer bestimmten Familie von Histon-Acetyltransferasen, den MYST-HATs.

### 3.2 Enok ist wahrscheinlich eine Histon-Acetyltransferase

Die Proteine der MYST-Familie sind an sehr verschiedenen biologischen Funktionen in verschiedenen Spezies beteiligt: in Hefe beim Silencing (SAS2 und SAS3; Reifsnyder et al., 1996), beim Wachstum (ESA1; Smith et al., 1998) und im Zellzyklus (ESA1; Clarke et al., 1999), in *Drosophila* bei der Dosis-Kompensation der X-Chromosomen (MOF; Hilfiker et al., 1997), in Mäusen bei der Gehirnentwicklung (Qkf; Thomas et al., 2000), in Menschen bei der DNS-Reparatur (TIP60; Ikura et al., 2000), bei der Replikation (HBO1; Iizuka und Stillman, 1999) und als Mitverursacher von Leukämie (MOZ und MORF; Borrow et al., 1996; Panagopoulos et al., 2001). Für Enok wurde bei einer Mosaik-Analyse in den Mushroom Bodies (MBs) gezeigt, dass es wichtig für die Neuroblasten-Proliferation in diesem Gehirnabschnitt ist (Scott et al., 2001). Um Aussagen über biochemische Funktionen und Eigenschaften von Enok machen zu können, wurden die konservierten Domänen in diesem Protein genauer untersucht. Der Vergleich der Enok-Proteinsequenz mit Proteinsequenzen dieser MYST-HATs zeigte einige solcher konservierten Bereiche. In einer evolutionsgeschichtlichen Sequenzanalyse der MYST-Familie wurde die MYST-Unterfamilien-Einteilung mit MOZ, MORF und Enok (CG11290) bestätigt (Sanjuán und Marín, 2001). Das Mausgenom wurde in dieser Untersuchung nicht analysiert. Werden aber die Bewertungskriterien berücksichtigt, die diese Gruppe für die Bestimmung von evolutiven Verwandtschaftsverhältnissen der MYST-Proteine heranzog, so gehört auch Qkf in diese Gruppe. Am höchsten ist die Homologie in der MYST-Domäne, für welche die meisten funktionellen Untersuchungen vorliegen. Für viele MYST-HAT-Proteine ist HAT-Aktivität nachgewiesen worden, auch für die Proteine, die die höchste Homologie zu Enok in der MYST-Domäne zeigen (Abb 2.13). Qkf acetyliert vorzugsweise freies Histon H3 und H4 (Thomas et al., 2000), MORF acetyliert ebenfalls freies H3 und H4, bietet man allerdings Nukleosomen als Substrat an, so wird vor allem H4 acetyliert (Champagne et al., 1999). In MOZ wurde gezeigt, dass ebenfalls freies H3 und H4 acetyliert wird (Champagne et al., 2001; Kitabayashi et al., 2001b), an Nukleosomen dagegen konnte keine Aktivität

nachgewiesen werden (Champagne et al., 2001). Auch für MOF, die andere näher untersuchte MYST-HAT in *Drosophila*, wurde HAT-Aktivität nachgewiesen (Akhtar und Becker, 2000). Unsere Ansätze rekombinantes Enok zu exprimieren waren begleitet von Problemen bei der Löslichkeit der Produkte. Aus der persönlichen Kommunikation sowohl mit Dr. Asifa Akhtar als auch mit Dr. Axel Imhof wissen wir, dass besonders die Expression der MYST-Domäne sehr schwierig ist. Dasselbe berichten auch Champagne und Kollegen (Champagne et al., 1999; Champagne et al., 2001), die sowohl für MOZ als auch für MORF HAT-Aktivität nachgewiesen haben. Bei der Analyse der ESA1-Kristallstruktur wurde deutlich, dass die hoch konservierten Aminosäuren der MYST-Domäne hydrophob sind und sich im Inneren des Gesamtproteins befinden (Yan et al., 2000). Deshalb wurde begonnen die Expression mit verschiedenen Strategien durchzuführen. Wie schon erläutert, wurde in Kollaboration mit Dr. Axel Imhof ein Intein-Konstrukt sowie die Expression in Schneiderzellen getestet, die auch für MOF funktioniert hatte (Akhtar und Becker, 2000). Eine weitere Möglichkeit wäre die Fusion mit einem Maltose-bindenden Protein, was die Löslichkeit erhöht und bei MOZ und MORF benutzt wurde (Champagne et al., 1999; Champagne et al., 2001). Im Fall von Qkf dagegen wurde eine GST-Fusion verwendet (Thomas et al., 2000). Eine weitere Möglichkeit, HAT-Aktivität nachzuweisen, wäre die Benutzung von Immunpräzipitaten, bei denen die Komplexe gefällt würden, mit denen HATs im allgemeinen interagieren und Aktivität zeigen (Sternier und Berger, 2000). Hierzu können die im Rahmen dieser Arbeit gewonnenen Enok-Antikörper benutzt werden.

Neben der Acetyl-CoA-Bindestelle ist der C<sub>2</sub>HC-Zinkfinger in der MYST-Domäne charakteristisch. Außer in ESA1 ist er in allen MYST-HATs vertreten. In ESA1 wurde aber dennoch in der Kristallstrukturanalyse eine Fingerstruktur in dem Bereich identifiziert, wo die Zinkfinger liegen sollten (Yan et al., 2000). In MOF wurde gezeigt, dass dieser Zinkfinger essentiell für die Substrat-Erkennung ist (Akhtar und Becker, 2001). Er interagiert mit dem N-terminalen Schwanz von Histon H4 und mit dem globulären Teil des Nukleosoms. In Enok-EMS-Mutanten, bei denen das zweite Cystein des Zinkfingers in ein Tyrosin mutiert ist (Scott et al., 2001), findet man bei Larven und Puppen Lethalität, ähnlich wie im *rot*<sup>60</sup>-Allel.

Die zweite konservierte Domäne sind die PHD-Zinkfinger. Obwohl sehr viele Proteine diese Art von Zinkfinger aufweisen, ist wenig über seine Funktion bekannt. Es wird vermutet, dass die PHD-Domäne bei der Protein-Protein-Interaktion eine Rolle spielt (Aasland et al., 1995). Untersuchungen an MORF haben außerdem gezeigt, dass ein kurzer Bereich, der die PHD-Domäne enthält, eine transkriptionelle Repressionsfunktion hat (Champagne et al., 1999). Aus der Untersuchung der konservierten Sequenzen in Enok kann man also folgern, dass Enok eine HAT ist, da Domänen wie die Acetyl-CoA-Bindestelle oder der C<sub>2</sub>HC-Zinkfinger, die für die HAT-Aktivität wichtig sind, vorhanden sind. Desweiteren scheint die Funktion dieser Domäne für Enok sehr wichtig zu sein, da in zwei *rot*-Allelen, die Fress- und Wachstumsdefekte zeigen, Nonsensmutationen an konservierten Positionen der Acetyl-CoA-Bindestelle identifiziert wurden. Bei dieser wichtigen Funktion muss es sich also um HAT-Aktivität handeln. Die PHD-Finger deuten auf Protein-Protein-Interaktionen von Enok in einem Komplex hin, in dem Co-Faktoren die Transkription beeinflussen. Weitere Einblicke in die mögliche Funktion von Enok ergibt der Vergleich mit MOZ.

### 3.3 Enok hat höchste Homologie zu MOZ

Für MOZ ist gezeigt worden, dass es mit AML1b (acute myeloid leukemia) interagiert, einem Protein, das sehr häufig an chromosomalen Translokationen beteiligt ist, die Leukämie verursachen (Kitabayashi et al., 2001b), ebenso wie auch MOZ (Borrow et al., 1996; Carapeti et al., 1998; Liang et al., 1998; Chaffanet et al., 2000; Kitabayashi et al., 2001a). Dabei interagiert MOZ mit AML1b zum einen über die basische Domäne und zum anderen über den Serinreichen Bereich, beides Abschnitte, die auch in Enok zu finden sind. AML1b wird charakterisiert durch eine Runt-Domäne, die DNS bindet (Meyers et al. 1993) und die auch zu vier *Drosophila*-Proteinen hohe Homologie zeigt: *lozenge* (*lz*), *runt* (*run*), CG1379 und CG15455. Dies sind vielleicht Kandidaten für eine Interaktion mit Enok. Besonders *lz* ist hierbei interessant, da es eine Rolle bei der Augendifferenzierung (Daga et al., 1996) und bei Differenzierung der Geruchstypen in den Antennen (Gupta et al., 1998) spielt. *Lz* und *run* werden beide in der Augenantennen-Imaginalscheibe exprimiert (Kaminker et al., 2001). Ein weiterer Bereich, den wie Enok auch MOZ, MORF und Qkf aufweisen, ist die H15-

Domäne. In MOZ wurde gezeigt, dass H15 eine Rolle bei der nukleären Lokalisation von MOZ sowie bei der AML1b-vermittelten transkriptionellen Aktivierung (hier ist auch der C-Terminus beteiligt) spielt (Kitabayashi et al., 2001b). Die Linker-Histone H1 oder H5, nach deren globulärer Domäne H15 benannt wurde, binden Nukleosomen besser als nackte DNS (Hayes und Wolffe, 1993), was auch die Kristallstruktur der globulären Domäne von H5 bestätigt (Ramakrishnan et al., 1993). Dies könnte ein Hinweis auf direkte Enok-Nukleosomen-Interaktion sein.

In Enok wurde auch ein Abschnitt beschrieben, der hohe Homologie zu Neurofilament H aufweist, einem Intermediär-Filament, das Bestandteil des axonalen Cytoskeletts ist und das am axonalen Transport beteiligt ist (Shea und Flanagan, 2001; Shah und Cleveland, 2002). Die hohe Homologie zu Enok wurde im C-terminalen Teil von Neurofilament H gefunden, in dem in Neurofilamenten bis zu 50 KSP-Phosphorylierungs-Stellen (Lysin-Serin-Prolin) zu finden sind (Grant et al., 2001). Es wurde gezeigt, dass der Phosphorylierungs-Grad in Neurofilamenten in Zusammenhang steht mit Axon-Wachstum, Axon-Durchmesser und Synaptogenese. In Enok kommen nur drei solche Phosphorylierungs-Stellen im Bereich der Homologie vor, dennoch könnte die Enok-Funktion durch Phosphorylierung/Dephosphorylierung auf ähnliche Weise wie in Neurofilamenten im Zusammenhang mit Axon-Wachstum reguliert werden.

Der Vergleich mit MOZ hat gezeigt, dass ein Co-Faktor, der mit Enok interagiert, ein *Drosophila*-Homolog von AML1b sein könnte, welches mit der basischen Domäne von Enok interagiert. Die H15-Domäne weist darauf hin, dass Enok nicht nur eine HAT-Funktion hat, sondern auch direkt mit Nukleosomen interagieren kann.

### **3.4 Beeinflussen Ecdyson-Level die *enok*-Expression?**

Im Laufe der Embryonalentwicklung entwickelt sich das *enok*-Expressionsmuster von einer ubiquitären Expression mit spezifischerem Signal im Nervensystem (mittleres Stadium) zu einem spezifischen Signal im Gehirn. Die ubiquitäre Expression in frühen Stadien und die Tatsache, dass *enok*-Mutanten das Larvenstadium erreichen, deutet auf eine maternale Komponente hin. Der Basallevel der *enok*-Expression scheint während der Larvalentwicklung relativ

stabil zu sein. Es gibt aber zwei Ausnahmen, erstens eine entwicklungsabhängige Verstärkung der Aktivität und zweitens eine Induktion unter Hungerbedingungen. Die entwicklungsabhängige Regulierung erfolgt in Wildtyp-Larven im frühen zweiten Instar (52 h nE) und ist ungefähr so stark wie eine Induktion durch Hunger. Es stellt sich die Frage, ob es sich dabei um eine Stressreaktion auf den vier Stunden zuvor erfolgten Waschschrift handeln könnte. Dagegen spricht, dass eine solche Stressreaktion sehr spät käme, da vier Stunden in der Larvalentwicklung eine lange Zeit sind. Normalerweise befinden sich gewaschene Larven nach maximal 10 Minuten wieder im Futter. Desweiteren tritt zu dem Zeitpunkt, an dem der leichte Anstieg in normal gefütterten 50 h nE Larven (zwei Stunden nach dem Waschen) zu erkennen ist, in gehungerten Larven bereits eine signifikant stärkere *enok*-Expression auf. Wahrscheinlicher ist also eine entwicklungsabhängige Induktion der *enok*-Expression. Auffällig ist hierbei, dass diese Expressions-Spitze an einem Zeitpunkt auftritt, an dem auch der Ecdyson-Level stark ansteigt (Riddiford, 1993). An den anderen untersuchten Zeitpunkten ist der Ecdyson-Titer nicht im Ansteigen begriffen. Ecdyson ist an der Auslösung der larvalen Häutungen und auch des Wanderverhaltens vor der Verpuppung beteiligt (Dominick und Truman, 1985; Riddiford, 1993; Hesterlee und Morton, 1996; Mesce und Fahrbach, 2002). Der Ecdyson-Titer in der Hämolymphe steigt z.B. während des zweiten Instar an und nimmt vor der Häutung wieder ab. Dabei werden durch Ecdyson Vorgänge ausgelöst, die sich letztendlich im Häutungsverhalten und in der Häutung zeigen (Hesterlee und Morton, 1996). Das Wanderverhalten wird wahrscheinlich auf ähnliche Weise beeinflusst. Solche wandernden Larven und auch sich häutende Larven beenden dabei die Nahrungsaufnahme. Interessanterweise kann man in Larven, in denen *enok* anders als normal exprimiert wird, zum Beispiel in *hs-enok*-Larven, ebenfalls solche Verhaltensweisen erkennen. Ein ähnlicher Phänotyp wie in *hs-enok* wurde auch für Ecdysteroid-Rezeptor-Mutanten berichtet, die durch Rettungsexperimente bis ins dritte Instar gerettet wurden (Li und Bender, 2000). Diese Larven zeigen zu Beginn des dritten Instar ein Wanderverhalten und suchen einen Platz auf, an dem sie die Bewegung einstellen, sich aber nicht verpuppen. Larven, in denen *enok*-Überexpression stattfindet, zeigen also Verhaltensweisen, die auch von Ecdyson beeinflusst werden. Und Wildtyp-Larven zeigen einen Anstieg der *enok*-Expression an einem Zeitpunkt in der Entwicklung, an dem Ecdyson-Titer stark

ansteigen. *enok* wird also an mindestens einem Zeitpunkt während der Larvalentwicklung durch ein entwicklungs-spezifisches Signal - vielleicht Ecdyson - transkriptionell induziert.

### 3.5 Nur mitotische Gewebe zeigen *enok*-Expression

Während der Larvalentwicklung wird *enok* unter anderem in der Augenantennen-Imaginalscheibe exprimiert. Die Überexpression von *enok* unter der *glass*-Enhancer-Kontrolle führt zu glatten Augen. Der *glass*-Enhancer ist in allen Augenzellen ab der morphogenetischen Rinne aktiv (Moses und Rubin, 1991). Das bedeutete für die *enok*-Überexpression, dass sie in bereits vordifferenzierten Zellen stattfindet, die auf der Posterior-Seite der Rinne zu Clustern formiert werden und sich in mehreren Teilungen zu den verschiedenen Ommatidien-Zelltypen ausdifferenzieren (Wolff und Ready, 1993). Die Glätte der Oberfläche scheint bei der *enok*-Überexpression durch fehlerhaftes Wachstum des oberen Ommatidien-Bereichs, vielleicht durch Überwachsen der Cornea, verursacht zu werden, da in versuchsbedingt kollabierten Bereichen eine runde Struktur sichtbar wurde, die von Kristallkegel und Pigmentzellen stammen kann. Ein solcher glatter Augen-Phänotyp (*smooth eye*) wird auch in Mutanten von *lz* gefunden (Daga et al., 1996). Interessanterweise kann dieser *lz*-Phänotyp durch Überexpression von *lz* unter dem *glass*-Enhancer gerettet werden. Zusätzlich zeigen einige *lz*-Allele neben dem *smooth eye* auch Wachstumsdefekte in den Augenborsten (Flores et al., 1998). Ein menschliches *Lz*-Homolog ist AML1b, das mit MOZ interagiert. MOZ wiederum zeigt hohe Homologie zu Enok. Es kann also spekuliert werden, dass auch *Lz* und Enok interagieren. Weitere Hinweise auf eine Rolle von *enok* in der Augenentwicklung sind der Rettungsphänotyp von *res2* (Abb 2.10), in denen die Augen unpigmentiert sind, und Daten von Gahmon und Dickson (Scott et al., 2001), die einen Defekt in der Augenprojektion mit *enok* in Verbindung bringen. *Enok* zeigt also eine Funktion in der Augenentwicklung. Effekte auf die Antennenentwicklung wurden bisher nicht untersucht. Scott und Kollegen (2001) haben gezeigt, dass Mushroom Body Neuroblasten (MBNs), in denen *enok* mutiert ist, Proliferationsdefekte zeigen. Ebenso sehen sie *enok*-Expression in den Flügel-Imaginalscheiben. *Enok* wird also in mehreren mitotischen Geweben (Imaginalscheiben) exprimiert. Sowohl bei der Mutation von

*enok* in MBNs als auch bei der *enok*-Überexpression in Augen-Imaginalscheiben zeigen sich in diesen Geweben Wachstumsdefekte. Außerdem sterben *rot*<sup>60</sup>-Tiere, die nicht den starken Fress-Phänotyp zeigen und sich verpuppen, während der Metamorphose. Dies alles sind Hinweise darauf, dass *enok* eine Rolle bei der Entwicklung von mitotischen Geweben spielt. Die *in situ* Hybridisierungen gaben keine Hinweise darauf, dass *enok* in endoreplikatorischen Larvengewebe exprimiert wird. Dies deutet darauf hin, dass die Wachstumsdefekte in *rot*-Allelen oder *enok*-Überexpressions-Larven auf Fehler in den Imaginalgewebe zurückzuführen sind.

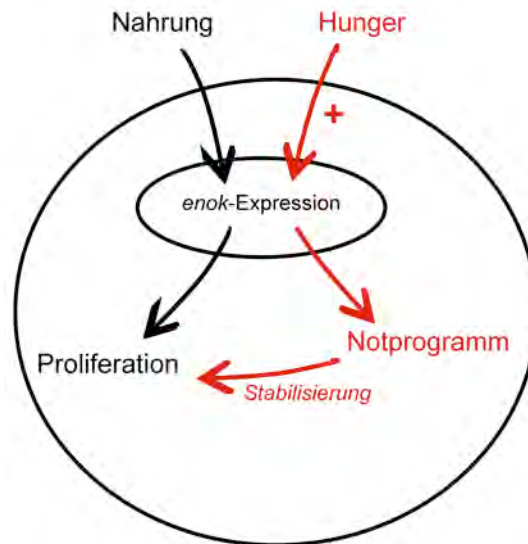
### 3.5 Die *enok*-Expression wird von Nahrungssignalen beeinflusst

Neben einer Entwicklungs-abhängigen Änderung der basalen *enok*-Expression während der Larvalentwicklung erfolgt eine weitere unter Hungerbedingungen. Die *enok*-Aktivität ist schon zwei Stunden nach Beginn des Hungerns signifikant erhöht. Hierbei können Kohlenhydrate als Signalquelle ausgeschlossen werden, da die Fütterung von Zucker alleine die *enok*-Induktion nicht verhindert. Obwohl die getesteten Aminosäuren die Larvalentwicklung verzögern, zu Wachstumsdefiziten führen und hohe Lysinkonzentrationen sogar den *rotkehlchen/pumpless*-Fressdefekt kopieren (Zinke et al., 1999), kommen sie einzeln als Signalquelle ebenfalls nicht in Frage. Ob also das Vorhandensein eines bestimmten Nahrungsbestandteils die *enok*-Induktion unterdrückt oder ob das Fehlen mehrerer Komponenten (besonders Aminosäuren) die *enok*-Induktion verursacht, bleibt zu untersuchen. Britton und Edgar (1998) haben gezeigt, dass die Endoreplikation in Larvengewebe abhängig von Nahrungssignalen, besonders Aminosäuren, ist. Anders dagegen ist es in Imaginal-Gewebe, aus denen letztendlich die adulte Fliege hervorgeht. Für Neuroblasten (imaginale Nervenzellen) wurde in dieser Untersuchung gezeigt, dass mitogene Signale aus dem Fettkörper, die auch den Ernährungsstatus wiedergeben, die Proliferation auslösen. Proliferierende Neuroblasten scheinen dann unabhängig von diesen mitogenen Startsignalen zu sein, das heißt sie proliferieren auch ohne Nahrung für einige Zyklen weiter. Interessant sind in diesem Zusammenhang die MBNs. Sie scheinen besonders unabhängig von Nahrungsbedingungen zu sein (Britton und Edgar, 1998), zum einen da ihre Proliferation nicht wie in Neuroblasten durch

Mitogene aktiviert wird (die Proliferation startet Nahrungs-unabhängig bereits während der Embryonalentwicklung), und zum anderen da sie wie andere Neuroblasten auch unter Zuckerbedingungen weiterproliferieren. Die *enok*-Transkription im Gehirn und vielleicht auch in den Imaginalscheiben wird unter Hunger verstärkt. Dies könnte bedeuten, dass die *enok*-Funktion Bestandteil des Anpassungsmechanismus in mitotischen Zellen an wechselnde Ernährungsbedingungen ist, der diese Gewebe Nahrungs-unabhängig proliferieren lässt. Dafür spricht auch die Tatsache, dass diese Regulation schon nach zwei Stunden signifikant ist (allerdings nicht für das Gehirn, sondern für Larven gezeigt). Dieser Anpassungsmechanismus könnte sogar beinhalten, dass das allgemeine Wachstum von endoreplikativem Larvengewebe gestoppt wird, wie es in gehungerten oder Zucker-behandelten Larven, in denen *enok* induziert wird, zu sehen ist, während mitotische Gewebe relativ unabhängig eine bestimmte Größe erreichen (Stern und Emlen, 1999). Diese Unabhängigkeit ist aber nicht vollständig, da die Imaginalgewebe für die Zellteilungen ein bestimmtes minimales Proteinsynthese-Programm und somit einen Aminosäurevorrat benötigen. Es scheint so zu sein, dass dieser Aminosäure-Vorrat besonders aus dem Abbau von Larven-Serum-Proteinen (Lsp), dem Proteinvorratsspeicher in Larven, hervorgeht (Britton und Edgar, 1998). Wir haben in Affymetrix-Chipanalysen gesehen, dass die Transkription von *Lsp1* unter Hunger- und Zuckerbedingungen stark reduziert, man kann sogar sagen ausgeschaltet wird (Zinke et al., 2002). Dies ist auch sinnvoll, da sich besonders die Imaginal-Gewebe ohne Unterbrechung entwickeln sollen, so dass unter Hungerbedingungen zuerst endoreplikatives Gewebe das Wachstum einstellt und somit Nährstoffreserven sowie Energie voll dem Imaginal-Gewebe-Wachstum zur Verfügung stehen. Dies scheint auch gut zu funktionieren, da selbst aus lange gehungerten Larven, die wieder auf Futter gesetzt werden, fruchtbare adulte Fliegen hervorgehen.

Zusammenfassend wird folgendes Modell für die Funktion von *enok* in mitotischen Geweben aufgestellt (Abb 3.1). *enok* wird in einigen mitotischen Geweben wie MBNs und Augenantennen-Imaginalscheibe der Larve exprimiert. Unter normalen Bedingungen spielt *enok* eine Rolle bei der Zellproliferation (Scott et al., 2001). Unter Hungerbedingungen (rote Pfeile in Abb 3.1) wird die *enok*-Expression verstärkt. Hierfür können Aminosäure-abhängige Signale (Britton und Edgar, 1998; Zinke et al., 1999) oder IDGFs (*imaginal disc growth factors*;





**Abb 3.1** Modell für die Rolle von *enok* in mitotischen Imaginalgeweben. Details im Text. +, Induktion.

Kawamura et al., 1999) verantwortlich sein. Diese Veränderungen in der *enok*-Expression können ein Notprogramm beinhalten, vor allem in Hinsicht auf veränderte Nahrungsbedingungen. Die Ergebnisse der Kevin-White-Chip-Analyse zeigen zum Beispiel, dass in *G2-enok* das Gen *pcl* (Tab 2.5, *pepsinogen-like*) hochreguliert wird. Dieses Gen zeigt die höchste Homologie zu Cathepsinen, intrazelluläre Proteasen, die für einen schnellen unspezifischen Proteinabbau bekannt sind (Voet und Voet, 1994) und somit vermehrt freie Aminosäuren für die Proteinsynthese bereitstellen. *Enok* könnte also Bestandteil eines Kontrollmechanismus sein, der es mitotischen Zellen ermöglicht, sich ändernden Nahrungsbedingungen anzupassen und ihr so stabilisiertes Proliferationsprogramm relativ Nahrungs-unabhängig zu durchlaufen.

### 3.6 ***Enok* spielt eine Rolle bei der Kontrolle von Wachstum und bei der Reaktion auf sich ändernde Nahrungsbedingungen**

Wie das Verhältnis von Organgröße zu Gesamtgröße des Organismus (statische Allometrie) reguliert ist, wird schon seit vielen Jahren diskutiert. Zwei Modelle kommen dafür am wahrscheinlichsten in Frage: erstens, dass ein zentrales System Informationen über Ressourcen (auch durch Nahrungs-

aufnahme) und/oder Körpergröße erhält und diese Information in Form eines Signals an Organe weitergibt, oder zweitens, dass das Wachstum der Organe direkt von Nährstoffen abhängt, die Organe aber direkt oder indirekt kommunizieren und ihr Wachstum koordinieren (Stern und Emlen, 1999). Sowohl in *rot<sup>60</sup>*-Larven als auch in *G2-enok*-Larven ist ein eindeutiger Wachstumsdefekt in Bezug auf die Larvengröße zu erkennen. In *hs-enok* ist die Situation noch deutlicher, die Larven wachsen nicht, sie zeigen ein Wanderverhalten und sie beenden die Nahrungsaufnahme. Nun stellt sich die Frage, welche dieser Vorgänge primär auf die Überexpression zurückzuführen ist. Wenn die Nahrungsaufnahme primär betroffen wäre, sollten in diesen Larven Gene reguliert werden, die eine Hungerreaktion anzeigen. Dies war aber nicht der Fall. Der Hunger-Marker *lip3* zeigt in *G2-enok* keine Veränderung der Transkription, selbst wenn diesen Larven gänzlich die Nahrung entzogen wird. Und auch in *hs-enok* zeigt sich keine Regulation von *lip3*. Betrachtet man sich die Expression von *lip3* in den Affymetrix-Untersuchung (Zinke et al., 2002), so ist es immer (nach 4 Stunden und nach 12 Stunden Hunger) eines der am stärksten induzierten Gene des gesamten Genoms. *Lip3* zeigt die höchste Homologie zu lysosomalen Triacylglycerol-Lipasen und wird vor allem im Fettkörper exprimiert (Pistillo et al., 1998). Seine Funktion scheint im Fettmetabolismus eine Rolle zu spielen, da durch die Mutation des menschlichen Homologs lysosomale saure Lipase die Wolman-Krankheit verursacht wird, bei der es zur Akkumulation von Cholesterol und Triglyceriden in Lysosomen kommt (Anderson et al., 1994). Es liegt also eine paradoxe Situation unter *enok*-Überexpression vor: obwohl diese Tiere die Nahrungsaufnahme beenden und hungern, ist die Reaktion auf diesen Nahrungsentzug nicht vollständig. Selbst, wenn diese Tiere komplett der Nahrung entzogen werden, scheint der Fettmetabolismus nicht so reguliert zu werden, wie es in gehungerten Tieren zu sehen ist. Eine Erklärung dafür kann sein, dass die Larven auf ein anderes Metabolismus-Programm umschalten, zum Beispiel auf eines, das direkt vor der Verpuppung benutzt wird.

Echtes Wanderverhalten, wie es vor der Verpuppung in Larven zu beobachten ist, wird durch Ecdyson ausgelöst (Riddiford, 1993). Dabei wurde in *Manduca sexta* gezeigt, dass Ecdyson im Gehirn neuronale Aktivität erzeugt, die über das suboesophageale Ganglion Bewegungen auslöst (Dominick und Truman, 1985). Sollte also primär Wanderverhalten durch *enok*-Überexpression ausgelöst

werden, hieße dies, dass Ecdyson in der Wildtyp-Situation vermittelt durch *enok*-Expression das Wanderverhalten steuert. Sollte die Funktion von Enok wichtig für die Auslösung des Wanderverhaltens sein, so sollten *enok*-Mutanten kein Wanderverhalten zeigen. Dagegen spricht aber, dass sich *rot<sup>60</sup>*-Tiere verpuppen und sich dabei außerhalb des Futters befinden. Desweiteren scheint *enok*-Überexpression einen Wachstumsstillstand in Larven zu verursachen.

In der Wildtyp-Situation soll unter Hungerbedingungen vor allem mitotisches Gewebe mit Nährstoffreserven versorgt werden und weiterwachsen. In gehungerten oder Zucker-behandelten Larven, in denen *enok* hochreguliert ist, ist ein Wachstumsdefizit in der Larvalentwicklung zu sehen, der auf ein Wachstums-Stop der endoreplikativen Gewebe zurückgeführt werden kann (Britton und Edgar, 1998).

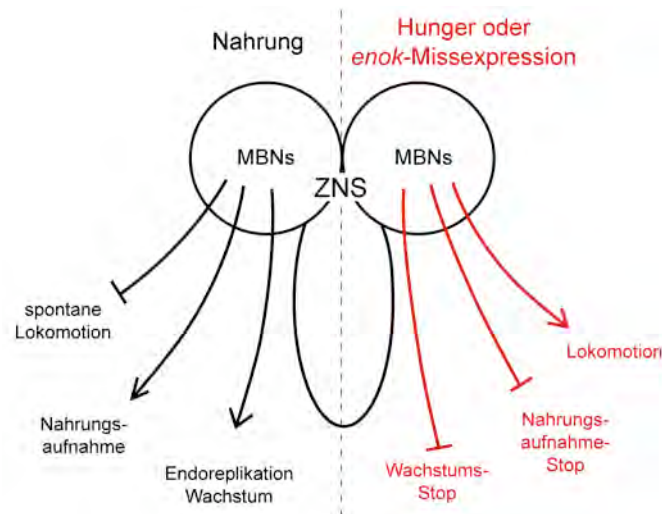
Immer, wenn die *enok*-Expression verändert wird, ist in Larven ein Wachstumsdefizit zu beobachten. *Enok* scheint also direkt oder indirekt daran beteiligt zu sein, durch kontinuierliche Expression in mitotischen Geweben ein Wachstums-Signal für endoreplikative Gewebe zu erzeugen. Ein Organ, das solche Signale erzeugt, sollte endokrine Eigenschaften haben oder mit endokrinen Organen in Kontakt stehen. Zwei in der Kevin-White-Chip-Analyse identifizierte Gene könnten auf eine solche Weise beeinflusst werden und das Wachstum stoppen. Zum einen wird in *G2-enok ImpL2* hochreguliert (Tab 2.5). *ImpL2* ist durch Ecdyson induzierbar und wird in Embryos in verschiedenen Nervengeweben exprimiert (Garbe et al., 1993), außerdem wird das Protein sekretiert und kann mit Insulin interagieren (Sloth Andersen et al., 2000). Es könnte also sein, dass so der Insulin-Signaltransduktionsweg beeinflusst wird, der für Wachstumskontrolle bekannt ist (Johnston und Gallant, 2002). Das zweite Beispiel von den Kevin-White-Chips, das in ähnlicher Weise reguliert werden könnte, ist *Thor*, das *Drosophila*-Homolog von 4E-BP (Bernal und Kimbrell, 2000), welches wichtig bei der Kontrolle der Translationsinitiation ist. Sowohl in *rot<sup>60</sup>* als auch in *G2-enok* ist es stark hochreguliert (Tab 2.7). *Thor* wurde in der Affymetrix-Analyse von verschiedenen Nahrungsbedingungen in eine Gruppe von Genen eingestuft, die sowohl unter Hunger- als auch unter Zucker-Bedingungen schnell und stark hochreguliert sind (Zinke et al., 2002). Auf eine solche Weise regulierte Gene, deren Transkription Aminosäure-abhängig sein kann, scheinen an Wachstumsprozessen beteiligt zu sein. Für *Thor* wurde gezeigt, dass es zum einen durch den

Insulin-Signaltransduktionsweg (Miron et al., 2001) und zum anderen durch *Tor*-Signaltransduktion (*Target of Rapamycin*, für mTOR gezeigt), einem weiteren an der Wachstumskontrolle beteiligten Stoffwechselweg, der auch Aminosäure-abhängig ist (Oldham et al., 2000; Zhang et al., 2000), reguliert wird. Da *enok* im Gehirn exprimiert wird und da Defekte in MBNs durch die Mutation von *enok* verursacht werden (Scott et al., 2001), könnten die MBs bei der Erzeugung eines Wachstums-Signals eine Rolle spielen.

### **3.7 Eine Hypothese: die Mushroom Bodies sind vielleicht an der Regulation von Wachstum und Nahrungsaufnahme beteiligt**

Die MBs erhalten Informationen von Geruchs- und Geschmacks-Sinneszellen (Ito et al., 1998; Jefferis et al., 2002) und haben über das Protocerebrum Verbindungen zum suboesophagialen Ganglion (Ito et al., 1998) und zur Ringdrüse (Siegmund und Korge, 2001), dem endokrinen Steuerorgan in *Drosophila*. Den MBs wurde eine wichtige Rolle beim Geruchs-Lernen zugesprochen (Davis, 1996; Heisenberg, 1998). Sowohl Larven als auch adulte Fliegen können riechen (Jefferis et al., 2002), aber wie die Verbindungen zwischen Geruchssinneszellen und MBs in Larven aussehen, ist unklar. Die MB-Entwicklung beginnt im Embryonalstadium und es ist denkbar, dass auch Geruchs- und Geschmackssignale im larvalen MB verarbeitet werden (Kurusu et al., 2002). In frühen Larvenstadien wird der MB aus  $\square$ -Neuronen gebildet, die Verbindung zum Protocerebrum haben (Lee et al., 1999). Diese  $\square$ -Neuronen sind die oben beschriebenen besonders Nahrungs-unabhängigen MBNs (Britton und Edgar, 1998). Der *rot*-Phänotyp und die beobachteten Phänotypen unter *enok*-Missexpression können vielleicht helfen, eine Verbindung der MBs mit der Regulation von Wachstum und Nahrungsaufnahme zu sehen.

Neben dem zuvor besprochenen Wachstumsdefekt zeigen *hs-enok*-Larven auch fehlende Nahrungsaufnahme und wie auch *G2-enok*-Larven ein Wanderverhalten. Dabei könnten über die Verbindungen des MB zum suboesophagialen Ganglion die Fressbewegungen unterbrochen und spontane Lokomotion ausgelöst werden. Spontane Lokomotion wird in adulten Fliegen mit defekten MBs beobachtet (Martin et al., 1998). Wanderverhalten, wie es vor der



**Abb 3.2** Mögliche Funktionen der MBNs bei der Kontrolle von Nahrungsaufnahme und Wachstum. Details im Text.

Verpuppung zu sehen ist, scheint unter *enok*-Überexpression wie oben diskutiert nicht vorzuliegen. Die Larven sterben, weil sie Verhungern. Sie fressen nicht mehr und wandern solange umher, bis die Energiereserven und Nährstoffvorräte verbraucht sind. Für diese Erklärung spricht auch der *rot*<sup>60</sup> sterben Larven mit einer Fressblockade sehr schnell, während sich einige Tiere (Kategorie zwei), die noch Nahrung aufnehmen können, mit Verzögerung verpuppen und erst während der Metamorphose aufgrund von Proliferations-Defekten in den Imaginalscheiben, die durch die *enok*-Mutation verursacht werden, sterben. Die Fressblockade in *rot*<sup>60</sup>-Larven der Kategorie eins kommt vielleicht dadurch zustande, dass efferente Verbindungen aus den MBs zum suboesophagealen Ganglion aufgrund dieser Proliferations-Defekte fehlen.

Die Hypothese ist also, dass ausgehend von den MBs vermittelt durch endokrine Gewebe ein stetiges Wachstums-Signal an endoreplikatives Larvengewebe ausgesendet wird (Abb 3.2). Unter Hungerbedingungen oder *enok*-Überexpression wird dieses Signal verändert und führte zum Wachstums-Stillstand. In diesem Zusammenhang zeigen sich auch Defekte bei der Reaktion auf Hungersituationen in Larven, in denen *enok* überexprimiert wird. Gleichzeitig werden aber auch bestimmte Bewegungsverhaltensweisen gesteuert, die beim Wanderverhalten eine Rolle spielen oder vielleicht sogar unter Hungerbeding-

ungen bei der Futtersuche wichtig sind. Und auch die Nahrungsaufnahme, die in Larven kontinuierlich ist, kann eventuell abhängig von Nahrungsangebot (Geruch, Geschmack) reguliert werden. Diese Hypothese entspricht also eher dem ersten Modell für die Regulation von statischer Allometrie, bei dem ein zentrales Organ (MB/Gehirn) externe und interne Nahrungs- und Wachstumssignale koordiniert und ein Signal für Organwachstum entsprechend anpassen kann.

### 3.8 Perspektiven

In der vorliegenden Arbeit wurde *enok* molekularbiologisch charakterisiert. Außerdem wurden Tiere, die *enok* unter Hungerbedingungen exprimieren oder *enok* missexprimieren, verhaltensphysiologisch untersucht. Dabei zeigte sich, dass die Veränderung der *enok*-Expression einen starken Einfluss auf das Larvenwachstum hat und Fressdefekte sowie Fehler bei der Reaktion auf Hunger auslöst. Um zu verstehen, wie *enok* einerseits als MYST-HAT und als Bestandteil eines Komplexes funktioniert und andererseits wie die *enok*-Expression die Transkription und Chromatinstruktur in Gehirn und in Imaginalgewebe, also auf zellulärer Ebene, beeinflusst, müssen weitere Untersuchungen durchgeführt werden.

Ein Ansatz, der bereits gestartet wurde, ist die Suche nach Zielgenkandidaten des Enok-Komplexes. In Kollaboration mit Kevin White sollen in cDNS-Chip-Analysen *hs-enok*-Larven untersucht werden, in denen Sekundäreffekte so weit wie möglich ausgeschlossen werden. Die Kenntnis solcher Zielgenkandidaten eröffnet weitere Untersuchungsmöglichkeiten. Handelt es sich dabei um bekannte Gene, können sie Hinweise auf Vorgänge liefern, die zu den beschriebenen Phänotypen führen. Von Zielgenkandidaten können Expressionsmuster untersucht werden, um zu sehen, ob sie als primäre Zielgene in den selben Zellen wie *enok* exprimiert werden. In diesem Zusammenhang sollte in Tieren, die *enok* missexprimieren, die Proliferation in Geweben untersucht werden, in denen *enok* unter normalen Bedingungen exprimiert wird, da Proliferationsdefekte in *enok*-Mutanten beschrieben werden (Scott et al., 2001). Diese Erkenntnisse würden also helfen, Vorgänge nach der Veränderung der *enok*-Expression zu verstehen, die zu Verhaltensänderungen und Wachstumsdefekten führen.

Wie aber wird die *enok*-Expression unter Wildtyp-Bedingungen verändert? In diesem Zusammenhang wird es interessant sein, inwiefern Ecdyson dabei eine Rolle spielt. Ist *enok* zum Beispiel an der Auslösung von Wanderverhalten oder an Entwicklungs-bedingten Proliferationsvorgängen in Imaginalscheiben beteiligt und übermittelt dabei Ecdyson-Signale? Desweiteren beeinflusst die *enok*-Expression in jedem untersuchten Fall das Larvenwachstum. Speziell unter Hungerbedingungen sollte untersucht werden, welches Nahrungssignal die *enok*-Expression verstärkt. Auch Promotorstudien können hierbei hilfreich sein, da der Promotor, wie in Rettungsexperimenten gezeigt, bereits identifiziert ist. Können zum Beispiel *rot<sup>60</sup>*-Larven, deren Fress- und Wachstumsdefekt gerettet wird, für eine bestimmte Zeit hungern und sich danach dennoch verpuppen?

Ein weiterer Untersuchungsansatz betrifft Fragen der Protein-Funktion. Hier haben wir Antikörper als Werkzeuge in der Hand, um das Enok-Protein biochemisch unter die Lupe zu nehmen. Es sollte geklärt werden, ob Enok HAT-Aktivität zeigt, mit welchen Faktoren Enok interagiert und wie sich die transkriptionelle Überexpression von *enok* auf das Genprodukt auswirkt.

Mit der Aufklärung dieser Fragestellungen können schrittweise weitere Einblicke erlangt werden, wie *enok* Wachstum und verschiedene Verhaltensweisen beeinflusst. Außerdem können interessante Verbindungen zwischen Ernährungs- bzw. Entwicklungs-Signalen und den daraus resultierenden Folgen auf Verhaltensweisen und Wachstumskontrolle hergestellt werden.





## 4 Material

### 4.1 Bezugsquellen für Verbrauchsmaterialien und Chemikalien

<b>Name</b>	<b>Abkürzung</b>	<b>Bezugsquelle</b>
[ $\alpha$ - <sup>32</sup> P]-dCTP		Amersham Pharmacia Biotech, Little Chalfont, Großbritannien
[ $\alpha$ ]-Mercaptoethanol		Roth, Karlsruhe
[ <sup>3</sup> H] Acetyl CoA		Amersham Pharmacia Biotech, Little Chalfont, Großbritannien
3-(N-Morpholino)-propansulfonsäure	MOPS	Roth, Karlsruhe
5-Bromo-4-chloro-3-indolyl-[ $\alpha$ ]-D-galactopyranosid	X-Gal	Roth, Karlsruhe
5-Bromo-4-chloro-3-indolyl-Phosphat	X-Phos	Roth, Karlsruhe
Aceton		Roth, Karlsruhe
Agar		Difco Laboratories, Augsburg
Agarose		PeqLab, Erlangen
Alanin		Sigma, Saint Louis, Missouri, USA
Ammoniumperoxydisulfat	APS	Sigma, Saint Louis, Missouri, USA
Ampicillin	Amp	Roth, Karlsruhe
Apfelsaft		Bitterfelder, Bittenfeld
Azaserin-Hypoxanthin 50x		Sigma, Saint Louis, Missouri, USA
Bacto Trypton, Select Pepton		Difco, Detroit, Michigan, USA
Bakterienplatten		Greiner, Frickenhausen
Bierhefe		Brecht, Eggenstein
Blaukappengefäße (15 ml und 50 ml)		Greiner, Frickenhausen
Borsäure	H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	Roth, Karlsruhe
Bromphenolblau		Serva, Heidelberg
Calciumchlorid	CaCl <sub>2</sub>	Merck, Darmstadt
Chloroform	CHCl <sub>3</sub>	Merck, Darmstadt
Coomassie Brilliant Blau R250		Serva, Heidelberg
Desoxyadenosintri-phosphat	dATP	Promega, Mannheim
Desoxycytosintri-phosphat	dCTP	Promega, Mannheim
Desoxyguanosintri-phosphat	dGTP	Promega, Mannheim
Desoxythymidintri-phosphat	dTTP	Promega, Mannheim
Dinatriumhydrogenphosphat	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	Roth, Karlsruhe
Diethylpyrocarbonat	DEPC	Merck, Darmstadt
Dithiotreitol; Threo-1,4-dimercapto-2,3-butandiol; Cleland's Reagenz	DTT	Gibco BRL Lifetechnologies (Deutschland), Karlsruhe
DNA-Längenmarker, 1 kb-Leiter		Gibco BRL Lifetechnologies (Deutschland), Karlsruhe
DNA-Längenmarker, 100 bp-Leiter		PeqLab, Erlangen
Econo-Pack Säulen		BioRad, München
EGTA		Roth, Karlsruhe
Endothelialer Zellwachstums-Zusatz		Sigma, Saint Louis, Missouri, USA
Essigsäure, 100%, p.A.		Merck, Darmstadt

Ethanol, p.A.		Roth, Karlsruhe
Ethanol, technisch		Roth, Karlsruhe
Ethidiumbromid		Roth, Karlsruhe
Ethylendiamintertaessigsäure, Titrierkomplex 3	EDTA	Roth, Karlsruhe
Ethyl Methansulfonat	EMS	Sigma, Saint Louis, Missouri, USA
Fadenagar		Brecht, Eggenstein
Ficoll 400		Roth, Karlsruhe
FluoroLink™Cy3-dUTP FluoroLink™Cy5-dUTP		Amersham Pharmacia Biotech, Little Chalfont, Großbritannien
Fötiales Kälberserum	FCS	Gibco BRL Lifetechnologies (Deutschland), Karlsruhe
Formaldehyd 37 %		Merck, Darmstadt
Formamid		Roth, Karlsruhe
Frischhefe		Fala, Straßburg, Frankreich
Gel Blotting Papier (GB002)		Schleicher&Schuell, Dassel
Glucose		Roth, Karlsruhe
Glutathion red.		Sigma, Saint Louis, Missouri, USA
Glutathion-Agarose-Beads		Sigma, Saint Louis, Missouri, USA
Glycerol, Glycerin		Roth, Karlsruhe
Glycin		Roth, Karlsruhe
Guanidiniumthiocyanat		Roth, Karlsruhe
Halocarbonöl		Voltalef, Hamburg
Hefe-Extrakt		Gibco BRL Lifetechnologies (Deutschland), Karlsruhe
Heparin		Gibco BRL Lifetechnologies (Deutschland), Karlsruhe
HEPES		Roth, Karlsruhe
Hering-Sperma Einzelstrang-DNS	ssDNS	Boehringer, Mannheim
Hybridisierungsröhren		Amersham Pharmacia Biotech, Little Chalfont, Großbritannien
Hybridisierungsschale (Metall, verschließbar)		Neolab, Heidelberg
Immobilon-P Transfer Membranen		Millipore, Eschbronn
Isoamylalkohol		Roth, Karlsruhe
Isopropanol, 2-Propanol		Merck, Darmstadt
Kaliumchlorid	KCl	Roth, Karlsruhe
Kaliumdihydrogenphosphat	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Roth, Karlsruhe
Kanada Balsam		Serva, Heidelberg
Kanamycin A Monosulfat	Km	Sigma, Saint Louis, Missouri, USA
Karminsäure		Sigma, Saint Louis, Missouri, USA
Klorix (Hypochloridlösung)		Colgate-Palmolive, Heidelberg
Levamisol		Sigma, Saint Louis, Missouri, USA
Litiumchlorid	LiCl	Sigma, Saint Louis, Missouri, USA
Lysin		Sigma, Saint Louis, Missouri, USA
Magnesiumchlorid	MgCl <sub>2</sub>	Roth, Karlsruhe
Magnesiumsulfat	MgSO <sub>4</sub>	Roth, Karlsruhe
Maismehl		Friedrichstal Mühle, Stutensee
Methanol		Roth, Karlsruhe

Mikrozentrifugenreaktionsgefäße (1,6; 2,0 ml)		Eppendorff, Hamburg
N,N,N',N'-Tetramethyldiamin	TEMED	Roth, Karlsruhe
N,N'-Methylen-bis-acrylamid		Roth, Karlsruhe
Natriumacetat, p.A.	NaAc	Roth, Karlsruhe
Natriumcarbonat	NaCO <sub>3</sub>	Roth, Karlsruhe
Natriumchlorid	NaCl	Roth, Karlsruhe
Natriumcitrat		Merck, Darmstadt
Natriumdodecylsulfat, p.A.	SDS	Roth, Karlsruhe
Natriumhydroxid, Plätzchen, p.A	NaOH	Roth, Karlsruhe
Natriumphosphat		Merck, Darmstadt
Natriumthiosulfat	Na <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	Roth, Karlsruhe
n-Heptan		Merck, Darmstadt
Nipagin		Sigma, Saint Louis, Missouri, USA
Nitro Blau Tetrazoliumchlorid	NBT	Boehringer, Mannheim
Nylonmembranen ( <i>Hybond</i> )		Amersham Pharmacia Biotech, Little Chalfont, Großbritannien
Nylonmembranen ( <i>porablot NY amp</i> )		Macherey-Nagel, Düren
Oligo-d(T) <sub>12-18</sub>		Amersham Pharmacia Biotech, Little Chalfont, Großbritannien
Oligonukleotide		MWG-Biotech, Ebersberg
OPI Medienzusatz		Sigma, Saint Louis, Missouri, USA
P81-Filterpapier		Schleicher&Schuell, Dassel
Phenol		Roth, Karlsruhe
Phosphat gepufferte Salzlösung	PBS	Gibco BRL Lifetechnologies (Deutschland), Karlsruhe
Poly(A) DNS		Amersham Pharmacia Biotech, Little Chalfont, Großbritannien
Polyethylenglykol	PEG	Sigma, Saint Louis, Missouri, USA
Poly-Prep Chromatography Columns		BioRad, München
Prolin		Sigma, Saint Louis, Missouri, USA
Protein G Agarose		Dianova, Hamburg
PS-Röhrchen mit Ceaprenstopfen		Greiner, Frickenhausen
Random Hexamers		Amersham Pharmacia Biotech, Little Chalfont, Großbritannien
Rinderserum-Albumin	BSA	NEB, Frankfurt
RNA-Längenmarker		Sigma, Saint Louis, Missouri, USA
RNA sample loading buffer		Sigma, Saint Louis, Missouri, USA
Röntgenfilme ( <i>Hyperfilm<sup>TM</sup>MP + ECL</i> )		Amersham Pharmacia Biotech, Little Chalfont, Großbritannien
RPMI-1640-Kulturmedium		Gibco BRL Lifetechnologies (Deutschland), Karlsruhe
Saccharose		Roth, Karlsruhe
Salzsäure, 37%, p.A.	HCl	Merck, Darmstadt
Sarcosyl, L-Lauroyl-Sarcosin		Sigma, Saint Louis, Missouri, USA
Serin		Sigma, Saint Louis, Missouri, USA
Silbernitrat	AgNO <sub>3</sub>	Roth, Karlsruhe
Texas Red SP6/T7 Primer		Amersham Pharmacia Biotech, Little Chalfont, Großbritannien

Thioglycolsäure		Sigma, Saint Louis, Missouri, USA
Triton X-100		Sigma, Saint Louis, Missouri, USA
Tris(hydroxymethyl)aminomethan	Tris	Roth, Karlsruhe
tRNA		Boehringer, Mannheim
Tween20		Roth, Karlsruhe
Whatman 3MM-Filterpapier		Schleicher&Schuell, Dassel
Xylencyanol FF		Serva, Heidelberg
Zellkulturartikel		Greiner, Frickenhausen
Zinksulfat	ZnSO <sub>4</sub>	Roth, Karlsruhe
Zuckerrübensirup		Grafschafter, Meckenheim

## 4.2 Bezugsquellen für Enzyme

<b>Name</b>	<b>Abkürzung</b>	<b>Bezugsquelle</b>
Calf Intestine Phosphatase	CIP	NEB, Frankfurt
Desoxyribonuklease	DNaseI	Promega, Mannheim
Lysozym		Boehringer, Mannheim
Proteinase K		Sigma, Saint Louis, Missouri, USA
Restriktionsendonucleasen		Gibco BRL - Lifetechnologies (Deutschland), Karlsruhe NEB, Frankfurt
Ribonuklease	RNase	Promega, Mannheim
Shrimp Alkaline Phosphatase	SAP	Promega, Mannheim
SuperScript™II RNase H <sup>-</sup> Reverse Transcriptase	RT	Gibco BRL Lifetechnologies (Deutschland), Karlsruhe
T4 DNS-Ligase		Gibco BRL Lifetechnologies (Deutschland), Karlsruhe
Taq-Polymerase	Taq	Gibco BRL Lifetechnologies (Deutschland), Karlsruhe

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

## 4.3 Bezugsquellen für Kits

<b>Name</b>	<b>Bezugsquelle</b>
Anti-His Antibody Selector Kit	Qiagen, Hilden
Dig RNA Labeling Kit	Boehringer, Mannheim
Digoxigenin Detection Kit	Boehringer, Mannheim
<i>Drosophila</i> Expression System	Invitrogen, Groningen, Niederlande
ECL Western blotting detection reagents	Amersham Pharmacia Biotech, Little Chalfont, Großbritannien

IsoStrip Mouse Monoclonal Antibody Isotyping Kit	Roche, Indianapolis, USA
Lambda FIX <sup>®</sup> II Library	Stratagene, Heidelberg
NucleoSpin <sup>®</sup> Extract 2 in 1 Kit	Macherey-Nagel, Düren
NucleoSpin <sup>®</sup> RNA II Kit	Macherey-Nagel, Düren
NucleoSpin <sup>®</sup> RNA L Kit	Macherey-Nagel, Düren
Microcon <sup>®</sup> 30 Centrifugal Filter Devices	Millipore, Eschbronn
QIAamp Tissue Kit	Qiagen, Hilden
QIAexpress Type IV Kit	Qiagen, Hilden
Qiagen Lambda Midi Kit	Qiagen, Hilden
Qiagen Oligotex mRNA Kit	Qiagen, Hilden
Qiagen Plasmid Maxi Kit	Qiagen, Hilden
QIAquick Gel Extraction Kit	Qiagen, Hilden
QIAquick Nucleotide Removal Kit	Qiagen, Hilden
QIAquick PCR Purification Kit	Qiagen, Hilden
QuikHyb <sup>®</sup> Hybridization Solution	Stratagene, Heidelberg
Rapid Gel XL 6%	Amersham Pharmacia Biotech, Little Chalfont, Großbritannien
rediprime <sup>™</sup> II	Amersham Pharmacia Biotech, Little Chalfont, Großbritannien
RNeasy Mini Kit	Qiagen, Hilden
Thermo Sequenase core sequencing kit with 7-deaza-dGTP	Amersham Pharmacia Biotech, Little Chalfont, Großbritannien
TOPO TA Cloning <sup>®</sup> Kit	Invitrogen, Groningen, Niederlande

#### 4.4 Bezugsquellen für Geräte

<b>Gerät</b>	<b>Typ</b>	<b>Hersteller</b>
Brutschränke mit Schüttler	HT	Infors, Bottmingen, Schweiz
Entwicklungskassetten	Suprema	Dr. Goos, Heidelberg
Filmentwickler	M35 X-OMAT Processor	Kodak, Stuttgart
Heizblock	ThermoStat Plus	Eppendorf, Hamburg
Heizblock mit Schüttler	ThermoMixer 5436	Eppendorf, Hamburg
Hybridisierungssofen		Biometra, Göttingen
Netzgerät für Elektrophorese	(stabilisiert)	Fischer, Heidelberg
Netzgerät für Elektrophorese	200/2.0	BioRad, Hercules, Kalifornien, USA
Netzgerät für Elektrophorese	E844	Consort
pH-Meter	766 Calimatic	Knick, Berlin
Photometer	BioPhotometer	Eppendorf, Hamburg
Pipetten	Pipetman	Gilson (Deutschland), Langenfeld
Scanner	GenePix4000B	Axon Instruments, USA
Schwenktisch	Polymax 2040	Heidolph, Nürnberg
Sequenziermaschine	Vistra DNA Sequencer 725	Amersham Pharmacia Biotech, Little Chalfont, Großbritannien

Szintillationsmessgerät	BETAmatic	Kontron, Gonsheim
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
UV-Ofen	UV Stratalinker 2400	Stratagene, Amsterdam, Niederlande
Vakuum-Zentrifuge	Speed Vac Concentrator, Savant	Bachofer, Reutlingen
Vakuum-Zentrifuge	Speed Vac SC 110, Savant	Bachofer, Reutlingen
Vortexer	Vortex Genie 2	Scientific Industries, Bohemia, New York, USA
Wasserbad		Köttermann, Hänigsen
Wasserbad	HAAKE E2	Haake, Karlsruhe
Zentrifuge	Avanti J-20	Beckman, Fullerton, Kalifornien, USA
Zentrifuge	Centricon H401	Kontron Hermle, München
Zentrifuge	Centrifuge 5403	Eppendorf, Hamburg
Zentrifuge	Megafuge 1.0	Heraeus, Hanau

#### 4.5 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
Bindungspuffer	50 mM Tris, pH 8,0, 150 mM KCl, 5 mM DTT, 50 µM ZnSO <sub>4</sub> , 1 % (v/v) Triton X-100
Blockierungs-Lösung	4 % (w/v) Magermilchpulver, 0,5 % (v/v) Tween20 in PBS-T
Chip-Hybridisierungspuffer	6 x SSC, 1 mg/ml Poly(A) DNS, 0,4 % (w/v) SDS
Coomassie-Brilliant-Blau-Entfärbelösung	50 % (v/v) Methanol, 10 % (v/v) Essigsäure
Coomassie-Brilliant-Blau-Färbelösung	0,2 % (w/v) Coomassie-Brilliant-Blau R250, 50 % (v/v) Methanol, 7,5 % (v/v) Essigsäure
Dekontaminationslösung	4 l H <sub>2</sub> O, 160 g NaOH, 50 ml Thioglycolsäure
Denaturierungspuffer	1,5 M NaCl, 0,5 M NaOH
DNA-Ladepuffer (10 x)	25 % (w/v) Ficoll 400, 0,15 % (w/v) Bromphenolblau, 0,15 % (w/v) Xylen Cyanol FF
Einfriermedium	RPMI mit 20 % (v/v) FCS und 10 % (v/v) DMSO
EMS-Zucker-Lösung	20, 25 oder 29 mM EMS in 2 % (w/v) Saccharose-Lösung
Fix1-Lösung	100 mM HEPES, 2 mM MgSO <sub>4</sub> , 1 mM EGTA, pH 6,9

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)
HAT-Puffer (10 x)	100 mM Tris-HCl, pH 8,0, 1 mM EDTA, pH 8,0, 10 mM DTT, 10 mM PMSF, 100 mM Natriumbutyrat, pH 8,0, 50 % (v/v) Glycerol
Hybe	50 % (v/v) Formamid, 5 x SSC, 200 µg/ml ssDNA, 100 µg/ml tRNA, 25 µg/ml Heparin, pH 5,0
Hybe-B	50 % (v/v) Formamid, 5 x SSC
Hybridisierungspuffer	6 x SSC, 0,5 % (w/v) SDS, 100 µg/ml ssDNA
Hybridisierungswaschlösung	0,2 x SSC, 0,1 % (w/v) SDS
Hybridoma-Medium	500 ml RPMI-Medium, 20 % (v/v) FCS, 1 Flasche OPI Medienzusatz, 1 Flasche Azaserin-Hypoxanthin, 1 Flasche Endothelialer Zellwachstums-Zusatz
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
Neutralisierungspuffer	1,5 M NaCl, 0,5 M Tris, pH 8,0
PBS-T (10 x)	5 l H <sub>2</sub> O, 151,4 g Tris, 450 g NaCl, pH 8,1
PBT	0,1 % (v/v) Tween20 in PBS
Phagenpuffer	10 mM Tris-Base, 10 mM MgCl <sub>2</sub> , 10 mM NaCl, pH 7,5
Polyacrylamid-Sammelgel	4 % (v/v) Acrylamid, 0,1 % (v/v) N,N'-Methylenbisacrylamid, 125 mM Tris-HCl pH 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, pH 8,8, 0,1 % (w/v) SDS, 0,1 % (v/v) APS, 0,1 % (v/v) TEMED
Rote Hefesuspension	0,4 g Karminsäure in 40 g Frischhefe
SDS-Probenpuffer (2 x)	25 mM Tris-HCl, pH 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
SSC (20 x)	3 M NaCl, 300 mM Na <sub>3</sub> Citrat, pH 7,0
Strip-Puffer	0,05 x SSC, 0,1 % (w/v) SDS
TBE (5 x)	445 mM Tris-Base, 520 mM H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub> , 10 mM EDTA, pH 8,2
TE-Puffer	10 mM Tris, pH 8,0, 1 mM EDTA
TELT-Puffer	50 mM Tris, pH 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	48 mM Tris-Base, 39 mM Glycin, 10 % (v/v) Methanol

## 4.6 Fliegenlinien

<b>Linienbezeichnung</b>	<b>Genotyp (Chromosom)</b>	<b>Liniennummer / Bezugsquelle</b>
24B-gal4	w*; P{w <sup>+mW.hs</sup> =GawB}how <sup>24B</sup> / TM3, Sb1 (X; 3)	BL-1767 / Bloomington
D/TM3	w/y; ; D/TM3, Sb, Ser	eigene Linie
elav-gal4	P{w <sup>+mW.hs</sup> =GawB}elav <sup>C155</sup> (X)	BL-458 / Bloomington
G2-gal4	G2-gal4 (X)	Mz-1032.hx / R. Paro
GB	w*; L <sup>2</sup> Pin <sup>1</sup> /CyO, P{w <sup>+mC</sup> =GAL4-Kr.C}DC3, P{w <sup>+mC</sup> =UAS-GFP.S65T}DC7	BL-5194 / Bloomington
GMR-gal4	w*; P{w <sup>+mC</sup> =GAL4-ninaE.GMR} (X; 2)	BL-1104 / Bloomington
hs-gal4	P{ry <sup>+7.2</sup> =GAL4-Hsp70.sev}2/CyO; ry* (2, 3)	BL-2023 / Bloomington
Pka-C1 <sup>H2</sup>	Pka-C1 <sup>H2</sup> / CyO (2)	BL-4101 / Bloomington
pr cn bw	pr cn bw / pr cn bw (2)	A234 / C. Nüsslein-Volhard
Red3	w <sup>1118</sup> ; P{w <sup>+mC</sup> =enok(Red3).UAST} (X; ?)	eigene Linien
rot-Allele	rot <sup>x</sup> pr cn bw / CyO (2)	eigene Linien
rot <sup>9373</sup>	P{ry <sup>+7.2</sup> =PZ}gek <sup>09373</sup> cn1 / CyO; ry506 (2; 3)	BL-12361 / Bloomington
rot1 <sup>12C</sup>	w <sup>1118</sup> ; P{w <sup>+mC</sup> =Rot1.CaSpeR-4} (X; 3)	eigene Linie
rot3 <sup>26B</sup>	w <sup>1118</sup> ; P{w <sup>+mC</sup> =Rot3.CaSpeR-4} (X; 3)	eigene Linie
sal/CyO	w; sal/CyO (X; 2)	eigene Linie
Sp/CyO; Dr/TM3	w/y; Sp/CyO; Dr/TM3, Sb (X, 2, 3)	eigene Linie
T35	P{gek.T35} (3)	gek <sup>T35</sup> / L. Luo
Wildtyp	Oregon R	
W <sup>1118</sup>	w <sup>1118</sup> (X)	BL-3605 / Bloomington

Weitere Informationen über Marker und Balancer sind im Internet unter [www.flybase.org](http://www.flybase.org) zu erhalten (Flybase, 1999).

## 4.7 Vektoren und Plasmide

<b>Name</b>	<b>Klonierungsmethode oder Bezugsquelle</b>
pAS1	1,1 kb BamHI/Sall-Fragment aus pMax10 in pQE30
pBEX2	1,5 kb SphI/SacI-Fragment aus pMax10 in pQE32
pBEX3	1,8 kb SphI/Sall-Fragment aus pMax10 in pQE32
pBst	pBluescript KS, Stratagene
pcDNA	pcDNA3.1(-), Invitrogen
pCR II	pCR <sup>®</sup> II-TOPO-Vektor aus dem TOPO <sup>™</sup> TA Cloning <sup>®</sup> Kit
pDel1	3,7 kb HindIII/XbaI-Fragment aus $\square$ -8 in pBst
pDel2	2,5 kb XbaI/Sall-Fragment aus $\square$ -11 in pBst
pDel5	1,3 kb HindIII-Fragment aus $\square$ -8 in pBst
pDel6	3 kb HindIII-Fragment aus $\square$ -8 in pBst
pDel7	1,5 kb Sall-Fragment aus pDel6 in pBst



pDel9	1,8 kb EcoRI/HindIII-Fragment aus pDel6 in pBst
pDel10	2,8 kb NsiI/XbaI-Fragment aus pDel1 und 2,5 kb XbaI/SalI-Fragment aus pDel2 in pBst (PstI/SalI-geschnitten)
pDel11	2,8 kb NsiI/XbaI-Fragment aus pDel1 und 4,3 kb XbaI/EcoRI-Fragment aus $\square$ -8 in pBst (PstI/EcoRI-geschnitten)
pDel15	7,1 kb SmaI/EcoRI-Fragment aus pDel11 und 1,8 kb EcoRI/XbaI-Fragment aus $\square$ -8 in pBst (SmaI/XbaI-geschnitten)
pDel17	7,2 kb NotI/EcoRI-Fragment aus pDel11 und 1,8 kb EcoRI/HindIII-Fragment aus pDel9 in pBst (NotI/HindIII-geschnitten)
pDel19	1,7 kb ClaI/XhoI-Fragment aus pDel2 in pBst
pGEK1	1,75 kb PCR-Produkt <i>Drosophila</i> Wildtyp genomische DNS (Primer GK1+/GK3-) in pCR II
pGEX4T-1, 2, 3	GST-Expressions-Vektoren, Amersham-Pharmacia
pMax5	Nukleotide 595 bis 7159 der <i>enok</i> -cDNS in pNB40
pMax10	Nukleotide 1 bis 7159 der <i>enok</i> -cDNS in pNB40
pMax14	Nukleotide 3210 bis 7159 der <i>enok</i> -cDNS in pNB40
pMB1	2,8 kb BamHI/HindIII-Fragment aus pMax10 in pQE32
pMB2	1,3 kb Scal/HindIII-Fragment aus pDel10 in pQE32
pMT-Rot1	9 kb KpnI/NotI-Fragment aus pDel15 in pMT/V5-His A
pMT-Rot2	7,1 kb SmaI/EcoRI-Fragment aus pDel11 und 1,3 kb EcoRI/SalI-Fragment aus pDel9 in pMT/V5-His B (EcoRV/XhoI-geschnitten)
pMT/V5-His A, B, C	His-Expressions-Vektoren aus dem <i>Drosophila</i> Expression System
pMyb2, 4	Intein-Expressions-Vektoren von Dr. Axel Imhof
pNB40	pNB40cDNA-Vektor, mit dem die NB40-cDNS-Bibliothek kloniert wurde
pP{CaSpeR-4}	P-Element-Vektor
pP{UAST}	P-Element-Vektor
pQE30,31,32	His-Expressions-Vektoren aus dem QIAexpress Type IV Kit
pRed1	1,3 kb HindIII/XbaI-Fragment aus pMax10 und 5,9 kb XbaI/NotI-Fragment aus pMax10 in pcDNA (HindIII/NotI-geschnitten)
pRed2	7,3 PmeI-Fragment aus pRed1 in pBst
pRed3	7,3 NotI-Fragment aus pRed2 in pP{UAST}
pRex1	1,7 kb EcoRI/XhoI-Fragment aus pDel19 in pGEX4T-1
pRex2	1,1 kb BamHI/SalI-Fragment aus pAS1 in pGEX4T-1
pRex3	1,2 kb EcoRI/SalI-Fragment aus pMax10 in pGEX4T-3
pRex4	7,1 kb XhoI-Fragment aus pRed2 in pGEX4T-1
pRoi1	2,5 kb XbaI/SalI-Fragment aus pMax10 in pMyb2 (NheI/SalI-geschnitten)
pRoi3	3,5 kb EcoRV/SalI-Fragment aus pMax10 in pMyb4 (NruI/SalI-geschnitten)
prot60.05	0,8 kb PCR-Produkt genomische DNS aus <i>rot</i> <sup>60</sup> (Primer Del4703+/Del5481-) in pCR II
prot60.06	0,7 kb PCR-Produkt genomische DNS aus <i>rot</i> <sup>60</sup> (Primer Del5109+/Del5814-) in pCR II
prot60.05/06	0,4 kb PCR-Produkt genomische DNS aus <i>rot</i> <sup>60</sup> (Primer Del5109+/Del5481-) in pCR II
prot104.05	0,8 kb PCR-Produkt genomische DNS aus <i>rot</i> <sup>104</sup> (Primer Del4703+/Del5481-) in pCR II

prot104.06	0,7 kb PCR-Produkt genomische DNS aus <i>rot</i> <sup>104</sup> (Primer Del5109+/Del5814-) in pCR II
prot104.05/06	0,4 kb PCR-Produkt genomische DNS aus <i>rot</i> <sup>104</sup> (Primer Del5109+/Del5481-) in pCR II
pRot1	9 kb NotI/KpnI-Fragment aus pDel17 in pP{CaSpeR-4}
pRot2	8,9 kb SmaI/KpnI-Fragment aus pDel17 in pP{CaSpeR-4} (HpaI/KpnI-geschnitten)
pRot3	9 kb KpnI/NotI-Fragment aus pDel15 in pP{CaSpeR-4}

#### 4.8 Bakterienstämme

Stamm	Genotyp oder Herstellerangabe
<i>Escheria coli</i> BL21	<i>F- ompT hsdS (r<sub>B</sub><sup>-</sup>, m<sub>B</sub><sup>-</sup>) gal</i>
<i>E.coli</i> DH5α	<i>supE44 lacU169 (λ 80lacZ M15) hsdR17 recA1 endA1 gyrA96 thi-1 relA1</i>
<i>E.coli</i> TOP10	Genotyp siehe TOPO TA Cloning Kit
<i>E.coli</i> XL1 blue MRA	Genotyp siehe Lambda Fix II Library
<i>E.coli</i> XL1 blue MRA(P2)	Genotyp siehe Lambda Fix II Library
<i>E.coli</i> M15	Genotyp siehe QIAexpress Type IV Kit

#### 4.9 Hybridisierungs-Sonden

Name	Ursprung und Anwendung
<i>act5C</i>	0,8 kb PCR-Produkt aus <i>Drosophila</i> Wildtyp genomische DNS (Primer Act5+/Act7-) für Northern Transfer Hybridisierung
<i>enok</i>	1,3 kb HindIII/XbaI-Fragment aus pMax10 für Northern Transfer Hybridisierung
enok-Dig	pDel7 linearisiert mit XhoI (T7-Polymerase) für <i>in situ</i> Hybridisierung
GEK1	1,75 kb PCR-Produkt <i>Drosophila</i> Wildtyp genomische DNS (Primer GK1+/GK3-)
GEK340	340 bp NsiI-Fragment aus pGEK1 für Southern Transfer Hybridisierung
H/S750	750 bp HindIII/SalI-Fragment aus pDel2 für Southern Transfer Hybridisierung
H/X1,8	1,8 kb HindIII/XbaI-Fragment aus pDel2 für Southern Transfer Hybridisierung
X/S2,5	2,5 kb XbaI/SalI-Fragment aus pDel2 für NB40-Screen

#### 4.10 RT-PCR Primer

<b>Probe</b>	<b>Primerpaar</b>	<b>Produktgröße und Beschreibung</b>	<b>Zyklen</b>	<b>Annealing-Temperatur (°C)</b>
<i>act5C</i>	Act5+/Act7-	840 bp, Exon 3, im offenen Leseraster von <i>actin5C</i>	18, 19, 20	52, 54
CG7459	CG7459F/ CG7459R	450 bp, 3'-Bereich des offenen Leseraster	24, 25	54
CG8628	CG8628F/ CG8628R	250 bp, 3'-Bereich des offenen Leseraster	24	54
CG10918	CG10918F/ CG10918R	450 bp, 3'-Bereich des offenen Leseraster	24, 28	58
CG14935	CG14935F/ CG14935R	500 bp, 3'-Bereich des offenen Leseraster	22, 24, 28	54
<i>enok1</i>	Del8944+/ Del9685-	730 bp, Exon 5 von <i>enok</i>	27, 28	54
<i>enok2</i>	Del5710+/ Del6259-	550 bp, Mittelbereich in Exon 4 von <i>enok</i>	29, 30	52
<i>lip3</i>	Lip2+/Lip4-	700 bp, 3'-Bereich aus <i>lipase3</i>	23, 24, 25	54
<i>ppl</i>	ACS7/ACS21	400 bp, Mittelbereich	24	54
<i>Thor</i>	Phas1F/ Phas1R	400 bp, 3'-Bereich aus <i>Thor</i>	22, 24	54

Alle Primersequenzen sind im Anhang (7.3) aufgeführt. Dass die Zyklenzahl von Experiment zu Experiment variiert werden musste, lag in den unterschiedlichen experimentellen Bedingungen oder in der variablen Qualität der Erst-Strang-Reaktion begründet.



## 5 Methoden

### 5.1 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.

Zur Sammlung von Embryos oder Larven wurden die adulten Fliegen in Populationskäfige umgesetzt und auf Apfelsaftagar mit einem Tropfen Frischhefesuspension gezogen. So konnte man für *in-situ*-Hybridisierungen, für Versuche auf verschiedenen Nahrungsquellen oder für RNS-Isolierungen Eier bzw. Larven für einen bestimmten Zeitraum sammeln.

### 5.2 Fütterungsexperimente

Für Experimente mit verschiedenen Nahrungsbedingungen wurden Eier in einem Lege-Zeitraum von vier 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. Tabelle 5.1 zeigt die verschiedenen Futterbedingungen. Nach entsprechender Versuchszeit bei 25 °C wurden nur solche Larven für eine RNS-Isolierung benutzt, die zu diesem Zeitpunkt auf dem Filter der entsprechenden Nahrungsbedingung ausgesetzt waren bzw. in der Kontrollsituation sich in der Hefe befanden. Während Versuchen, die mehrere Stunden dauerten, wurden die Larven regelmäßig belüftet. Bevor eine dem RNS-Isolierungs-Protokoll entsprechende Menge (siehe dort) Larven in den Lysispuffer überführt wurde, wurden sie sorgfältig wie oben beschrieben gewaschen.

<b>Nahrungsbedingung</b>	<b>Behandlung</b>
Normal	Faltenfilter (Ff) mit 1 x PBS + Frischhefe
Hunger	Ff mit 1xPBS
Zucker	Ff mit 20 % Saccharose in 1 x PBS
Glycin	Ff mit 0,4 M Glycin in 1xPBS
Zucker + Glycin	Ff mit 20 % Saccharose/0,4 M Glycin in 1 x PBS
Zucker + Alanin	Ff mit 20 % Saccharose/0,4 M Alanin in 1 x PBS
Zucker + Lysin	Ff mit 20 % Saccharose/0,4 M Lysin in 1 x PBS
Zucker + Prolin	Ff mit 20 % Saccharose/0,4 M Prolin in 1 x PBS
Zucker + Serin	Ff mit 20 % Saccharose/0,4 M Serin in 1 x PBS

**Tab 5.1** Nahrungszusammensetzung in Futterexperimenten mit Larven

### 5.3 Phänotypische Untersuchung von *Drosophila*-Larven

Um Fressdefekte in *rot*-Allelen zu untersuchen, wurden Larven beginnend mit dem Schlüpfen mit *rot* gefärbter Hefe (Karminsäure) gefüttert. Ungefähr zwölf Stunden nach dem Schlüpfen (Mitte erstes Instar) wurden die Larven einem Waschschrift unterzogen. Unter dem Fluoreszenz-Mikroskop wurden *rot/GB*- und *rot/rot*-Larven getrennt, gezählt und auf frisches rotes Futter gebracht. In *rot/rot*-Larven wurden außerdem Tiere mit Fressdefekt (Kategorie eins) von Tieren ohne Fressdefekt (Kategorie zwei) getrennt weiterbeobachtet. Tiere der Kategorie zwei wurden eine Woche lang zwei mal täglich auf neu auftretende Fressdefekte kontrolliert.

Um das Wanderverhalten in *G2-gal4/UAS-enok*- und *G2-gal4/G2-gal4*-Larven zu dokumentieren, wurde eine definierte Anzahl Larven auf Apfelsaftagar mit Frischhefe gehalten. Larven, die bei stündlichen Tests außerhalb der Hefe entdeckt wurden, wurden gezählt und entfernt.

Die Nahrungsaufnahme in *hs-gal4/UAS-enok*- und *hs-gal4/hs-gal4*-Larven wurde ebenfalls mit roter Hefe getestet. Vier, acht oder 22 Stunden (h) nach dem Hitzeschock, der in allen Hitzeschockexperimenten 72 h nach der Eiablage für 40 Minuten (min) bei 37 °C erfolgte, wurden mit ungefärbter Hefe gefütterte Tiere gewaschen und dann eine Stunde lang mit roter Hefe gefüttert. Damit konnte untersucht werden, ob die Larven zu diesem Zeitpunkt noch

Nahrung aufnehmen. Mit Ausnahme des Hitzeschock-Versuchs wurden die Tiere in diesen Experimenten bei 18 °C gehalten.

Um die Phänotypen zu dokumentieren, wurden die Larven in einem Wasserbad durch eine Hitzebehandlung (5 min, 70 °C) getötet, auf Apfelsaftagar aufgereiht und unter dem Binokular mit einer Digitalkamera fotografiert.

## 5.4 Genetik

### 5.4.1 Fliegenkreuzungen

Grundsätzlich wurde so vorgegangen, dass bei Etablierungs- oder Einzelkreuzungen Weibchen mit einem dreifachen Überschuss an Männchen verpaart wurden. Bei der Einzelverpaarung von Männchen wurden je vier bis fünf Weibchen verwendet. Weibchen, die in Kreuzungen verwendet werden sollten, wurden immer spätestens acht Stunden (bei 25 °C) nach dem Schlüpfen von den Männchen getrennt. Für Kreuzungen, in denen jungfräuliche Weibchen kritisch waren, wurden nur Weibchen verwendet, die nach der Trennung von Männchen vier Tage in separaten Futtergefäßen auf Eiablage kontrolliert wurden.

Überexpressionskreuzungen wurden mit jeweils homozygoten transgenen *gal4*- bzw. *UAS*-Linien angesetzt, um in der F1-Generation in jedem Tier eine Gal4-abhängige UAS-Aktivität zu erhalten.

### 5.4.2 Ethyl-Methan-Sulfonat (EMS) Mutagenese-Screen

Bei der Arbeit mit dem Mutagen EMS muss mit äußerster Vorsicht vorgegangen werden. Alle Gegenstände, die mit EMS in Kontakt gekommen sein konnten (auch z.B. die Arbeitshandschuhe), wurden mindestens für 24 h in Dekontaminationslösung inkubiert.

Zunächst wurden ungefähr 600 *pr cn bw*-Männchen sechs Stunden auf 1 x PBS gehungert. Diese wurden dann in drei Gruppen zu 200 Tieren mit unterschiedlichen EMS-Konzentrationen mutagenisiert (20 mM, 25 mM oder 29 mM EMS in 2 % Saccharoselösung). Nach 24 h wurden die Fliegen in ein leeres Gefäß überführt (dieser Zwischenschritt sollte verhindern, dass EMS-Lösung in die normalen Futtergefäße gelangt) und dann direkt zur Erholung 18 h lang auf

normales Fliegenfutter gebracht. Für die Kreuzungen wurden je 25 mutagenisierte *pr cn bw*-Männchen (*pr cn bw*<sup>\*</sup>) mit ungefähr 50 *Pka-C1<sup>H2</sup>/CyO pr cn*-Weibchen verpaart und jeden Tag in neue Futtergefäße umsetzen. Nach vier Tagen wurden die Männchen entfernt. Bis Tag Sieben wurden auch die verbliebenen Weibchen täglich, ab dann bis Tag 14 alle zwei Tage umgesetzt. Aus der F1-Generation wurden ungefähr 5800 Männchen des Genotyps *pr cn bw*<sup>\*</sup>/*CyO pr cn* isoliert und einzeln mit je drei bis vier *rot<sup>9373</sup> cn/CyO pr cn*-Weibchen gekreuzt. Die F1-Nachkommenschaft dieser 5800 Kreuzungen wurde auf Komplementation der Deletion in *rot<sup>9373</sup>* untersucht. Aus Linien, die nur adulte *Cy*<sup>-</sup>-Fliegen in der F1 aufwiesen, wurden Tiere des Genotyps *pr cn bw*<sup>\*</sup>/*CyO pr cn* isoliert und unter sich gekreuzt, um stabile Linien zu etablieren. Von den zunächst zehn isolierten Linien wurden nach weiteren Tests fünf Linien als *rot*-Allele definiert. Dabei stammen die Allele *rot<sup>2</sup>* und *rot<sup>104</sup>* aus der Mutagenese mit 20 mM EMS, die Allele *rot<sup>60</sup>* und *rot<sup>76</sup>* aus der Mutagenese mit 25 mM EMS und das Allel *rot<sup>26</sup>* aus der Mutagenese mit 29 mM EMS.

### 5.4.3 Erzeugung transgener Fliegen

Das Grundprotokoll wurde wie bei Voie und Cohen (1998) beschrieben übernommen. Da ausschließlich P-Element-Konstrukte mit dem *white*-Marker verwendet wurden, wurde immer in *W<sup>1118</sup>*-Embryos injiziert. Nach der Injektion wurden die Embryos bis zum Schlüpfen bei 18 °C in Halocarbonöl belassen und dann die geschlüpften Larven (nach zwei bis drei Tagen) auf Standardfliegenfutter gebracht. Die daraus hervorgehenden Adulten wurden einzeln mit *W<sup>1118</sup>* rückgekreuzt. Die F1 dieser Kreuzungen wurde nach *w*<sup>+</sup>-Fliegen durchsucht. Gingen aus einer Kreuzung transgene Tiere hervor, wurden die ersten vier Transgenen aus diesem Gefäß einzeln isoliert und mit *W<sup>1118</sup>* 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.



#### 5.4.4 Bestimmung des P-Element-Insertions-Chromosoms in transgenen Fliegen

Besonders für die Rettung des *rot*-Phänotyps in *rot*<sup>60</sup> sollte festgestellt werden, auf welchem Chromosom die Insertion der genomischen Rettungskonstrukte Rot1, Rot2 und Rot3 erfolgt war. Gesucht wurde ein Treffer auf dem dritten Chromosom, da der *enok*-Lokus auf dem zweiten Chromosom liegt. Getestet wurden Linien, in denen das Transgen homozygot vorzuliegen schien. Davon wurde ausgegangen, wenn nach zwei Generationen im entsprechenden Fliegenstamm keine Augenfarben-Variationen innerhalb eines Geschlechts auftraten.

Der erste Test erfolgte jeweils für das X-Chromosom. Werden transgene Männchen mit einer beliebigen *w*<sup>-</sup>-Linie gekreuzt und dabei in der F1 nur weibliche transgene Nachkommen (*w*<sup>+</sup>) erhalten, so muss das Transgen auf dem X-Chromosom inseriert sein.

Um zu testen, ob die Insertion auf dem zweiten oder dritten Chromosom erfolgte, wurden zwei *w*<sup>-</sup>-Linien benutzt, in denen entweder das

Linie	Insertion auf Chromosom
<i>Rot1</i> <sup>4B</sup>	X
<i>Rot1</i> <sup>12C</sup>	3
<i>Rot1</i> <sup>21B</sup>	X
<i>Rot1</i> <sup>32B</sup>	X
<i>Rot2</i>	X
<i>Rot3</i> <sup>8B</sup>	Mehrfach-Treffer
<i>Rot3</i> <sup>11D</sup>	2
<i>Rot3</i> <sup>26B</sup>	3
<i>Rot3</i> <sup>35B</sup>	Mehrfach-Treffer
<i>Rot3</i> <sup>41C</sup>	Mehrfach-Treffer
<i>Rot3</i> <sup>45C</sup>	2

**Tab 5.2** Insertions-Chromosomen verschiedener transgener Linien. 2, zweites Chromosom; 3, drittes Chromosom; X, X-Chromosom.

zweite oder das dritte Chromosom markiert ist: *w* ; *sal/CyO* und *w* ; ; *D/TM3,Sb*. Zunächst wurden die Transgenen mit *w* ; *sal/CyO* und *w* ; ; *D/TM3,Sb* gekreuzt. Aus der F1 wurden *w*<sup>+</sup> *Cy*<sup>-</sup> bzw. *w*<sup>+</sup> *Sb*<sup>-</sup> Fliegen *inter se* verpaart und deren Nachkommen phänotypisch untersucht. Wurden in der F1 der *w*<sup>+</sup> *Cy*<sup>-</sup> *inter se*-Kreuzung nur *w*<sup>+</sup>-Fliegen und in der F1 der *w*<sup>+</sup> *Sb*<sup>-</sup> *inter se*-Kreuzung *w*<sup>+</sup>- und *w*<sup>-</sup>-Fliegen gefunden, so musste die

Insertion auf dem zweiten Chromosom stattgefunden haben. Wurde dagegen in der F1 der *w*<sup>+</sup> *Cy*<sup>-</sup> *inter se*-Kreuzung *w*<sup>+</sup>- und *w*<sup>-</sup>-Fliegen und in der F1 der *w*<sup>+</sup> *Sb*<sup>-</sup> *inter se*-Kreuzung nur *w*<sup>+</sup>-Fliegen gefunden, so musste die Insertion auf dem dritten Chromosom stattgefunden haben. War das Ergebnis nicht eindeutig, wurde von einem Mehrfach-Treffer ausgegangen. Tabelle 5.2 zeigt für alle getesteten transgenen Linien jeweils das Chromosom, in

das die Insertion stattfand. Für die Rettungskreuzung wurden letztendlich zwei transgene Linien (*Rot1*<sup>12C</sup>, *Rot3*<sup>26B</sup>) identifiziert, deren P-Element auf dem dritten Chromosom inseriert hatte.

#### 5.4.5 Rettungskreuzungen

Im ersten Rettungsexperiment sollte die transgene Fliegenlinie *T35* den *rot*-Phänotyp in *rot*<sup>9373</sup> (*rot*<sup>9373</sup>/*CyO*; +/+) retten. In *T35* befindet sich das transgene genomische Konstrukt auf Chromosom drei (+/+; *T35/T35*). Um in den beiden Ausgangslinien das jeweilige Wildtyp-Chromosom zu markieren und zu balancieren, wurde eine Linie des Genotyps *Sp/CyO*; *Dr/TM3 Sb* (zweites Chromosom; drittes Chromosom) verwendet. Nach je zwei Kreuzungen wurde zum einen die Linie *rot*<sup>9373</sup>/*CyO*; *Dr/TM3 Sb* und zum anderen die Linie *Sp/CyO*; *T35/T35* etabliert. In zwei weiteren Kreuzungen mit diesen beiden Fliegenstämmen wurde dann die Linie *rot*<sup>9373</sup>/*CyO*; *T35/T35* gezüchtet. Diese Linie wurde *inter se* gekreuzt und gezeigt, dass der *rot*-Phänotyp nicht mehr auftrat.

Im zweiten Experiment sollten die transgenen Linien *Rot1*<sup>12C</sup> und *Rot3*<sup>26B</sup> (allgemein +/+; *res2/res2*) den *rot*-Phänotyp in *rot*<sup>60</sup> (*rot*<sup>60</sup>/*CyO*; +/+) retten. Es wurde genau so verfahren wie im ersten Rettungsexperiment und letztendlich Stammlinien des Genotyps *rot*<sup>60</sup>/*CyO*; *res2/res2* etabliert.

### 5.5 Molekularbiologische und biochemische Methoden

#### 5.5.1 Screen einer genomischen DNS-Bibliothek

Es wurde bis auf die aufgeführten Ausnahmen nach Herstellerangaben mit der *Lambda FIX*<sup>®</sup> *II Library* gearbeitet (*Lambda FIX*<sup>®</sup> *II Library instruction manual: Preparing the Host Strains, Preparing the Plating Cultures, Titering Procedure, Performing Plaque Lifts*). Anstelle des SM-Puffers wurde Phagenpuffer und anstelle der NZY-Agarplatten wurden LB-Agarplatten verwendet. Für die erste Untersuchung (Screen) der Bibliothek wurden zwölf 150 mm LB-Agarplatten mit je 10 ml Topagar benutzt. Die Plaques wurden auf runde *Hybond-N* Nylonmembranen (Amersham) transferiert. Wurde von einer Platte ein zweiter Plaquefilter gemacht, so dauerte der Transfer 4 min. Nach Denaturierung und

Neutralisierung der Plauefilter erfolgte der Waschschrift 30 Sekunden (sek) in 2 x SSC.

Nach Hybridisierung (mit GEK1) und Autoradiographie wurden 20 positive Plaques gestochen und in Phagenpuffer überführt. Mit sechs der 20 Klone wurde ein Zweit-Screen auf 90 mm LB-Agarplatten mit 4 ml Topagar durchgeführt (ebenso wurde für einen Dritt-Screen verfahren). Phagenlösungen (Plaue in Phagenpuffer) wurden, versehen mit 0,3 % Chloroform, bei 4 °C aufbewahrt. Letztendlich wurden zwei positive  $\lambda$ -Phagen-Klone isoliert und weiterverwendet ( $\lambda$ 8 und  $\lambda$ 11).

### 5.5.2 Isolierung von $\lambda$ -Phagen-DNS

Um die positiven  $\lambda$ -Phagen  $\lambda$ 8 und  $\lambda$ 11 des dritten Screens zu vermehren, wurden Flüssigkulturen hergestellt. Dazu wurden in 50 ml LB-Medium, das 10 mM MgSO<sub>4</sub> enthält, 250  $\mu$ l Wirtszellen (*E.coli XL-1 blue MRA*, OD<sub>600</sub> = 0,5) mit 5 x 10<sup>6</sup> Plaue-bildenden Einheiten (pfu) von  $\lambda$ 8 bzw.  $\lambda$ 11 versetzt (Titration notwendig). Nach 12 bis 24 h (37 °C, Schüttler) konnte man an den lysierten Bakterien (Zelltrümmer) eine erfolgreiche Flüssigkultur erkennen. Aus dieser Kultur wurde mit Hilfe des *QIAGEN Lambda Midi Preparation Kit* nach Herstellerangaben (*Comments on QIAGEN Lambda Protocols: Lambda DNA Midi preparation*)  $\lambda$ -DNS isoliert.

### 5.5.3 Screen einer cDNS-Bibliothek

Die NB-40-cDNS-Bibliothek wurde titriert und mit je ca. 20000 Kolonie-bildenden Einheiten auf zwölf 150 mm LB-Amp-Agarplatten ausplattiert. Der Transfer dieser Kolonien auf Nylon-Membranen (*porablot NY amp*, Macherey-Nagel) erfolgte, indem die Membran nur solange auf die Kolonienplatte gelegt wurde, bis sie sich angesaugt hatte. Nach Markierung wurde die Membran abgezogen und davon mit einer weiteren Membran ein Duplikat erstellt. Die Membranen wurden dann 5 min in Denaturierungspuffer, 5 min in Neutralisierungspuffer und 5 min in 2 x SSC inkubiert und 30 min an der Luft

trocknen gelassen. Nach einem UV-Crosslink wurden vor dem weiteren Gebrauch Bakterienreste in 5 x SSC, 0,5 % SDS von den cDNS-Membranen abgerieben.

Nach Hybridisierung (mit 2,5 kb XbaI-SalI-Fragment aus pDel2) und Autoradiographie wurden 14 positive Klone gepickt. Mit diesen wurde in ähnlicher Weise wie oben beschrieben (aber auf 90 mm LB-Amp-Agarplatten) für den Zweit-Screen verfahren. Dabei wurden keine Duplikate angefertigt. Mit acht positiven Klonen des Zweit-Screens wurde ein Dritt-Screen durchgeführt. Letztendlich wurden drei positive Klone für die weitere Analyse verwendet (pMax5, pMax10 und pMax14).

#### 5.5.4 Isolierung von Plasmid-DNS aus Bakterien

Plasmid-DNS wurde je nach Anforderung durch Mini-Präparation (TELT-Methode) oder Maxi-Präparation (*Qiagen Plasmid Maxi Kit*) aus Bakterien isoliert. Für die erste Überprüfung von Bakterienklonen nach Ligationen wurde eine Mini-Präparation (Minipräp) durchgeführt. Die gewünschten Bakterienkolonien wurden in 3 ml LB-Medium mit dem entsprechenden Selektions-Antibiotikum (Kanamycin 10 mg/ml und/oder Ampicillin 100 mg/ml) über Nacht bei 37 °C geschüttelt. 1,6 ml der Über-Nacht-Kultur wurden in ein Mikrozentrifugenröhrchen überführt und 30 sek bei 10000 x g pelletiert. Das Bakterien-Pellet wurde mit 200 µl TELT-Puffer und 20 µl Lysozymlösung (10 mg/ml in TE) versetzt und so lange gevortext, bis es resuspendiert war. 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, 10000 x g) pelletiert. Der Überstand wurde anschließend mit 100 µl Isopropanol versetzt, gevortext und dadurch die Plasmid-DNS ausgefällt. Nach 5 min Zentrifugation (10000 x g) konnte das DNS-Pellet mit 70 % Ethanol gewaschen, erneut abzentrifugiert und getrocknet werden. Die Plasmid-DNS wurde dann in 50 µl 10 mM Tris (pH 8,0) gelöst. 5 bis 10 µl dieser Minipräp-DNS konnten dann für Restriktionsverdauung verwendet werden. Positive Klone wurden erneut selektiv ausplattiert (aus der 3 ml Über-Nacht-Kultur) und bei 37 °C über Nacht inkubiert.

Wurden für spezielle Applikationen größere Mengen oder höhere Reinheit (z.B. Sequenzierung) der Plasmid-DNS benötigt, wurden Maxi-Präparation mit dem *Qiagen Plasmid Maxi Kit* durchgeführt. Aus 200 ml

Bakterienkulturen, die in selektivem LB-Medium mit dem gewünschten Klon angeimpft und über Nacht bei 37 °C geschüttelt wurden, erfolgte die Plasmid-DNS-Isolierung nach Herstellerangaben (*QIAGEN Plasmid Purification Handbook: Qiagen Maxi Protocol*).

### 5.5.5 Isolierung von RNS aus *Drosophila*

Je nach benötigter Menge wurde Gesamt-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 entsprechende Menge Embryos oder Larven wurden vor der Homogenisierung in Zellkulturnetzen gewaschen und in den Lysis-Puffer (im Kit enthalten) überführt. Die Homogenisierung erfolgte mit einem elektrischen mechanischen Homogenisator. Zur Verbesserung der Lyse wurden die homogenisierten Proben vor der RNS-Isolierung 30 bis 60 min bei Raumtemperatur (RT) geschüttelt. Die Menge an isolierter Gesamt-RNS wurde spektralphotometrisch ermittelt (BioPhotometer) und die Qualität mittels Agarosegel-Elektrophorese überprüft. Die so gewonnene Gesamt-RNS wurde für Northern-Transfer-Analysen und Reverse-Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktionen (RT-PCRs) verwendet. Der Einsatz in RT-PCRs war durch eine im *NucleoSpin<sup>®</sup>*-Isolierungs-Protokoll enthaltene *DNaseI*-Behandlung möglich.

Für die Kevin-White-Chip-Hybridisierung wurde polyA<sup>+</sup>-RNS verwendet. Die Isolierung von polyA<sup>+</sup>-RNS aus Gesamt-RNS wurde mit dem *Qiagen Oligotex mRNA Kit* nach Herstellerangaben (*Oligotex Handbook: Oligotex mRNA Spin-Column Protocol*) durchgeführt. Auch hier wurde die Menge an isolierter RNS spektralphotometrisch ermittelt und die Qualität mittels Agarosegel-Elektrophorese überprüft.

### 5.5.6 Restriktionsverdau von DNS

Für den Verdau von 1 µg DNS wurden abhängig vom jeweiligen Enzym fünf bis 20 Enzymeinheiten (Units, eine Unit entspricht der Enzymmenge, die in einer Stunde 1 µg DNS des Phagen Lambda bei optimaler Temperatur- und Pufferbedingung vollständig verdaut) verwendet. Das Reaktionsvolumen betrug

dabei mindestens das Zwanzigfache des Volumens der zugesetzten Enzym/Glycerin-Lösung und die Inkubationszeit ein bis zwei Stunden bei optimaler Reaktionstemperatur 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. Nach Zugabe von DNS-Ladepuffer (1 x) wurde die Verdaulösung zur Größenbestimmung und Reinigung der Fragmente in einem DNS-Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt.

### 5.5.7 Agarosegel-Elektrophorese

Je nach Größe der aufzutrennenden DNS-Fragmente wurden 0,8 - 1,2 % Agarose in 0,5 x TBE durch Erhitzen im Mikrowellenherd gelöst. Der Gellösung wurden 0,4 µg/ml Ethidiumbromid zugesetzt, bevor sie in die Gelkammer gegossen wurde. Mit Hilfe eines Kammes wurden Taschen für die aufzutragenden Proben ausgespart. Nach Erhärten der Agarose, Herausziehen des Kammes und Überschichten des Gels mit Laufpuffer (0,5 x TBE), konnten die DNS-Proben in DNS-Ladepuffer geladen und die Gelkammer an die Elektroden angeschlossen werden. Die Auftrennung erfolgte bei 50 - 120 V. Danach konnten die DNS-Fragmente in einem Gel-Dokumentations-System (E.A.S.Y Win32) mittels UV-Fluoreszenz sichtbar gemacht und dokumentiert werden.

Um die Qualität von präparierter RNS zu testen oder RNS für Northern Transfers aufzutrennen, wurde ein Gel mit 1,2 % *RNase*-freier Agarose in 1 x MOPS-Puffer hergestellt (Laufpuffer ebenfalls 1 x MOPS-Puffer). Vor der Gelherstellung wurden die Gelkammer, der Gelschlitten und der Gelkamm 30 min in 0,25 M NaOH inkubiert. Die Proben wurden in 1:3-verdünntem *RNA sample loading buffer* denaturiert (10 min, 60 °C), in die Geltaschen geladen und bei 20 V (Northern Transfer) oder 50 - 70 V (Qualitätstest) aufgetrennt.

### 5.5.8 Isolierung von DNS-Fragmenten aus Agarosegelen

Nach Identifizierung der interessierenden DNS-Bande unter UV-Licht, wurde diese mit einem Skalpell ausgeschnitten. Die Extraktion der DNS aus dem Gel erfolgte mit dem *NucleoSpin® Extract 2 in 1* Kit. Die Extraktion erfolgte nach

Herstellerangaben (*Protocol for DNA extraction from agarose gels*). Die Extraktions-Effizienz und Konzentration der Eluate wurden danach auf einem DNS-Agarosegel überprüft.

### 5.5.9 Klonierung und Transformation von DNS

Dem Verdau eines Vektors folgte immer eine 5'-Dephosphorylierung mit *Shrimp Alkaline Phosphatase* (SAP) oder *Calf intestinal Alkaline Phosphatase* (CIP), um die Religation des Vektors zu verhindern. Die Dephosphorylierungsreaktion wurde mit 1 U Phosphatase pro  $\mu\text{g}$  Vektor bei idealen Pufferbedingungen (Herstellerangaben) angesetzt und für 1 h bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde das Enzym bei 70 °C (20 min) inaktiviert und danach die Vektor-DNS gefällt. Dafür wurde die Lösung mit NaAc (300 mM NaAc, pH 6,0) und mit dem 1,5-fachen Volumen an 100 %-igem Ethanol versetzt, gemischt und zentrifugiert (10000 x g). Das DNS-Pellet wurde getrocknet und in ddH<sub>2</sub>O gelöst. Insertfragmente wurden nach dem Verdau in einem Agarosegel gereinigt und dann extrahiert.

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

Um kompetente Bakterien herzustellen, wurden 2 ml einer Über-Nacht-Kultur des gewünschten *E.coli*-Stammes zu 200 ml LB-Medium gegeben und bis OD<sub>600</sub>=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 auf 4 °C vorgekühlter 0,1 M CaCl<sub>2</sub>-Lösung (frisch angesetzt) resuspendiert und 1 h 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 CaCl<sub>2</sub>-Lösung (vorbehandelt wie oben) resuspendiert und mit je 1,5 ml Glycerin versehen und vorsichtig gemischt. Diese Bakterien wurden entweder direkt zur Transformation eingesetzt oder in vorgekühlte Gefäße aliquotiert, mit flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C aufbewahrt.

Für eine Transformation wurde pro Volumen Plasmid-DNS (5 - 10 ng/ $\mu$ l) das 20- bis 40-fache Volumen an kompeteten Bakterien verwendet. Plasmid und Bakterien wurden 20 min auf Eis inkubiert, 2 min einem 42 °C Hitzeschock unterzogen und erneut auf Eis gestellt. Um je nach Bedarf eine Resistenz gegen Antibiotika zu entwickeln, wurden die transformierten Bakterien in 2- bis 4-fachem Volumen LB-Medium 30 bis 60 min bei 37 °C leicht schüttelnd inkubiert, bevor sie auf LB-Agar ausgestrichen wurden. Je nach Plasmid wurden die LB-Agar-Platten mit Kanamycin (10 mg/ml) und/oder Ampicillin (100 mg/ml) versetzt und mit 4 % X-Gal-DMSO-Lösung (für Blau-Weiß Selektion) bestrichen. Nach dem Trocknen der Bakteriensuspension wurden die Platten mit der Oberseite nach unten bei 37 °C 12 bis 24 h inkubiert.

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

#### 5.5.10 Southern-Transfer

Um in den isolierten  $\lambda$ -DNS-Klonen die inserierte genomische *Drosophila*-DNS zu charakterisieren, wurde sie mit verschiedenen Restriktionsenzymen verdaut, die DNS-Fragmente elektrophoretisch aufgetrennt und schließlich auf eine *Hybond-N*<sup>+</sup>-Nylonmembran (Amersham) transferiert. Dafür wurde das Agarosegel zunächst in Denaturierungspuffer 30 min äquilibriert. Auf drei Lagen Filterpapier, das Kontakt zum Transferpuffer (Denaturierungspuffer) hat, wurde mit der Oberseite nach unten das Gel aufgelegt. Darauf kam die Membran, dann drei weitere Lagen Filterpapier und zuletzt mehrere Schichten Zellstoff. Mit einer Glasplatte und einem Gewicht beschwert dauerte der Transfer 2 h, wobei alle 30 min das Zellstoffpapier gewechselt wurde. Die Nylonmembran wurde anschließend 2 min in 2 x SSC gewaschen und zuletzt durch UV-Crosslink die DNS fixiert. Die Transfereffizienz wurde vor und nach dem Transfer durch Kontrolle des Agarosegels unter UV-Licht überprüft.



### 5.5.11 Northern-Transfer

Der Transfer von aufgetrennter RNS aus einem Agarosegel auf eine Nylonmembran (*Hybond N<sup>+</sup>*) erfolgte mit derselben Methode wie der Southern Transfer, nur dass hier der Laufpuffer 20 x SSC war und das Gel vorher in 2 x SSC äquilibriert wurde. Der Transfer dauerte mindestens 4 h. Nach beendetem Transfer wurde die Membran 2 min in 2 x SSC gewaschen, kurz auf Filterpapier getrocknet und dann mit UV-Bestrahlung (Crosslink) die RNS kovalent fixiert. Die Transfereffizienz wurde auch hier vor und nach dem Transfer durch Kontrolle des Agarosegels unter UV-Licht überprüft.

### 5.5.12 Herstellung radioaktiv markierter DNS-Sonden

Zur Hybridisierung Nylonmembran-gebundener DNS oder RNS (Plaque-Filter, cDNS-Membranen, Southern-Transfer-Membranen, Northern-Transfer-Membranen) wurden radioaktiv markierte DNS-Sonden hergestellt. Dazu wurde die benötigte DNS-Probe aus dem entsprechenden Plasmid ausgeschnitten, mittels Elektrophorese vom Vektor getrennt und aus dem Gel extrahiert. Verwendet wurden auch PCR-Produkte. Die radioaktive Markierung erfolgte mit *rediprime<sup>TM</sup>II* nach Herstellerangaben (*rediprime<sup>TM</sup>II random prime labelling system protocol*) unter Verwendung von [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]-dCTP (Amersham).

Zur Reinigung der Sonde von Primern (< 10 bp), Enzymen, Salzen und nicht eingebauten Nukleotiden wurde das *QIAquick Nucleotide Removal Kit* verwendet. Die Durchführung erfolgte nach Herstellerangaben (*QIAquick Spin Handbook: QIAquick Nucleotide Removal Kit Protocol*). Anschließend wurde die markierte DNS-Sonde durch Zugabe von NaOH (30 mM) denaturiert.

### 5.5.13 Hybridisierung mit radioaktiven DNS-Sonden und Autoradiographie

Plaquefilter und cDNS-Membranen wurden 1 bis 2 h in 50 ml Hybridisierungspuffer bei 65 °C in einer Hybridisierungsschale schüttelnd prähybridisiert. Dann wurde die radioaktiv markierte DNS-Sonde dazugegeben und über Nacht bei 65 °C hybridisiert. Das Waschen der Membranen erfolgte

viermal 15 min bei 65 °C mit je 50 ml der vorgewärmten Hybridisierungswaschlösung.

Die Hybridisierung von Souther-Transfer- und Northern-Transfer-Membranen wurde mit der *QuikHyb<sup>®</sup> Hybridization Solution* nach Herstellerangaben (*QuikHyb<sup>®</sup> Hybridization Solution: radioactive hybridization double-stranded Probes*) durchgeführt. Die Hybridisierung erfolgte in Hybridisierungsröhren. Zur Entfernung unspezifisch gebundener Sonde wurde die Membran nach der Inkubation viermal 15 min mit je 15 bis 20 ml Hybridisierungswaschlösung bei 60 °C gewaschen (Abweichung vom Herstellerprotokoll). Bei Bedarf wurden für weitere Hybridisierungen die gebundenen Sonden von den Membranen durch Kochen in Strippuffer und Waschen in 60 °C ddH<sub>2</sub>O entfernt (Strippen).

Nach kurzem Trocknen auf Filterpapier wurde den Membranen (eingeschweißt in transparente Plastikfolie) in einer Filmkassette ein Röntgenfilm (*Hyperfilm<sup>TM</sup>MP*) aufgelegt. Die Exposition erfolgte je nach Stärke des mit einem Handmonitor gemessenen Signals bei -80 °C für wenige Minuten bis mehrere Tage. Die Filmentwicklung erfolgte im Kodak-Filmentwickler.

#### 5.5.14 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Abschnitte von genomischer *Drosophila*-DNS, von  $\lambda$ -Klonen oder *Drosophila*-cDNS wurden mit Hilfe der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) isoliert und amplifiziert. Pro Ansatz wurden in 50  $\mu$ l Volumen 200  $\mu$ M dNTP-Mix, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 x PCR-Puffer, 1 U *Taq*-Polymerase, 10-100 ng Template-DNS und je 1  $\mu$ M Vorwärts-Primer (Primer+) und Rückwärts-Primer (Primer-) eingesetzt. Für jedes Primerpaar wurde auch eine Reaktion ohne Template-DNS angesetzt, um zu testen, ob Reagenzien mit Fremd-DNS kontaminiert waren (H<sub>2</sub>O-Kontrolle). Die PCR-Temperaturprofile wurden je nach Primerpaarung und PCR-Produktgröße festgelegt. Gestartet wurde mit einem Denaturierungsschritt (3 min 94 °C), gefolgt von 30 bis 35 Zyklen erstens 30 sek 94 °C (DNS-Denaturierung), zweitens 30 sek Annealingtemperatur (4 °C unter dem Schmelzpunkt der Primer) und drittens pro 1 kb PCR-Produktgröße 1 min 72 °C (optimale Temperatur für die *Taq*-Polymerase-Aktivität). Abschließend wurde die Reaktion erneut abhängig von der Produktgröße 5 bis 15 min bei 72 °C inkubiert und dann bis zur Weiterverarbeitung

auf 4 oder 8 °C abgekühlt. Die Überprüfung der PCR erfolgte durch Gelelektrophorese. Die PCR-Reaktionen wurden in einem *PTC-200 Peltier Thermal Cycler* durchgeführt.

#### 5.5.15 Reverse-Transkriptase-PCR (RT-PCR)

Die reverse Transkription (Erststrang-Synthese) von mRNA zu cDNA erfolgte mit der *SuperScript™II RNase H<sup>-</sup> Reverse Transcriptase* (RT). Pro Reaktion wurde 1 µg Gesamt-RNS eingesetzt. Für jede neu isolierte RNS wurde außerdem eine Reaktion ohne RT (-RT-Kontrolle) angesetzt, um zu testen, ob die Gesamt-RNS trotz *DnaseI*-Behandlung mit genomischer DNA kontaminiert war. Zur Gesamt-RNS wurde pro Ansatz 1 µl 500 ng/µl Oligo(dT)<sub>12-18</sub> in 11,75 µl Volumen (12,75 µl Volumen in -RT-Kontrollen) gegeben und 10 min bei 72 °C und 5 min bei 4 °C inkubiert. Dann wurden pro Ansatz 4 µl 5 x *First-Strand Buffer* (mitgeliefert zur *SuperScript™II*), 2 µl 0,1 M DTT (mitgeliefert zur *SuperScript™II*), 1 µl 10 mM dNTP-Mix, 0,25 µl *RNasin* (40 U/µl) und 1 µl RT (200 U/µl) zugegeben. Die Reaktion erfolgte 50 min bei 42 °C mit anschließender RT-Inaktivierung (15 min, 75 °C). Die gewonnene cDNA wurde in einem Endvolumen von 100 µl aufgenommen. Von dieser cDNA-Lösung konnten jeweils 5 µl als Template-DNA in PCRs verwendet werden. Diese PCRs wurden in 25 µl Reaktionsvolumen durchgeführt. Je nach verwendetem Primerpaar variierte die Anzahl an Zyklen und die Annealingtemperatur. Beide Variablen sind in 4.10 aufgeführt. Nach einer PCR konnte die DNA in einer Gelelektrophorese semiquantitativ analysiert werden.

#### 5.5.16 Sequenzierung von DNA

Die Sequenzierung der Inserts in den genomischen Klonen (pDel1, pDel2, pDel5 und pDel6), im cDNA-Klon pMax10, in pRed3 und des 5'-Endes des Inserts in pRex4 erfolgte durch den MWG-Biotech Sequenzierservice.

Die Sequenzierung der Insert-5'-Enden verschiedener Expressionskonstrukte (pMB1, pMB2, pBEX2, pBEX3 und pRex1), der Insert-5'- und 3'-Enden von cDNA-Klonen (pMax5, pMax10 und pMax14) und der Inserts der genomischen Klone aus *rot<sup>60</sup>* und *rot<sup>104</sup>* erfolgte nach der Kettenabbruch-Methode von

Sanger mit Fluoreszenz-markierten Primern. Die Plasmide lagen dabei immer in Maxipräp-Qualität vor. Die Expressionsplasmide wurden mit dem Texas-Red-QE-forward1-Primer (pMB1, pMB2, pBEX2 und pBEX3) oder dem Texas-Red-GEX-forward1-Primer (pRex1) sequenziert (Sequenzierprimer-Sequenzen siehe 7.3). Für die anderen Plasmide wurden jeweils *Texas Red SP6 primer* und *Texas Red T7 primer* verwendet. Die Sequenzierung erfolgte mit dem *Thermo Sequenase core sequencing kit with 7-deaza-dGTP*, dem Sequenziergel-System *Rapid Gel XL 6%* und einer Sequenziermaschine (Vistra DNA Sequencer 725). Vorgegangen wurde nach Herstellerangaben (*Thermo Sequenase core sequencing kit with 7-deaza-dGTP: Protocol 3. Dye-primer cycle sequencing Standard protocol*). Bei Punkt 7 dieses Protokolls wurden folgende Zyklen programmiert: (1) 5 min 95 °C (2) 20 x 30 sek 95 °C + 30 sek 60 °C + 30 sek 72 °C (3) 5 min 72 °C.

#### **5.5.17 Herstellung Fluoreszenz-markierter Targets für Microarray-Hybridisierungen**

Die Markierung erfolgte durch eine Erststrang-Reaktion (*SuperScript<sup>TM</sup> II RNase H<sup>-</sup> Reverse Transcriptase*) an PolyA<sup>+</sup>-RNS. Es wurden immer die auf einem Microarray zu vergleichenden Proben parallel markiert (Wildtyp-RNS immer mit Cy3, *rot<sup>60</sup>*- oder *G2-enok*-RNS immer mit Cy5). Zunächst wurden 4 µg PolyA<sup>+</sup>-RNS, 3 µg *Random Hexamers* und 3 µg Oligo-d(T)-Primer in 15 µl Volumen 10 min bei 70 °C inkubiert. Auf Eis wurden dann jeweils 6 µl 5 x *First-Strand Buffer*, 3 µl 0,1 M DTT, 3 µl *FluoroLink<sup>TM</sup> Cy3-dUTP* oder *FluoroLink<sup>TM</sup> Cy5-dUTP* (Amersham), 0,6 µl dNTP-Spezialmix (25 mM dATP, 25 mM dCTP, 25 mM dGTP, 10 mM dTTP) und 2 µl RT hinzugegeben und 2 h bei 42 °C inkubiert. Danach wurden 1,5 µl 1 M NaOH, 20 mM EDTA hinzugefügt und 10 min bei 65 °C inkubiert. Dann wurden beide Ansätze (Cy3 und Cy5) vereinigt, auf 100 µl Volumen gebracht und mit 10 µl 3 M NaAc (pH 5,0) versetzt. Diese Mischung wurde dann mit dem *QIAquick PCR Purification Kit* nach Herstellerangaben (*QIAquick<sup>TM</sup> Spin Handbook: QIAquick PCR Purification Kit Protocol using a microcentrifuge*) aufgereinigt und anschließend mit *Microcon<sup>®</sup>30*-Säulen nach Herstellerangabe eingeeengt.

### 5.5.18 Hybridisierung von Kevin-White-Chips

Die eingeeingte Probe wurde in 21 bis 35 µl Chip-Hybridisierungspuffer aufgenommen und denaturiert (2 min, 100 °C). Die gesammte Probe wurde dann

	<i>WtA</i>	<i>WtB</i>	<i>WtD</i>
<b><i>G2-enokA</i></b>	+	+	
<b><i>G2-enokB</i></b>			+
<b><i>G2-enokC</i></b>			+
<b><i>rot<sup>60</sup>A</i></b>		+	+
<b><i>rot<sup>60</sup>B</i></b>		+	

**Tab 5.3** Probenkombinationen für die Microarray-Hybridisierungen

blasenfrees auf ein 22 x 50 mm Deckglas pipettiert und mit einem Microarray (DNS nach unten) bedeckt. Die Hybridisierung erfolgte in einer luftdichten Feucht-Kammer bei 65 °C für 18 bis 24 h. Danach wurde der Microarray jeweils für einige Sekunden in 200 ml 3 x SSC, 0,2 % SDS, in 200 ml 0,2 x SSC und in 200 ml 0,1 x SSC gewaschen und anschließend trocken

zentrifugiert. Das Auslesen der Fluoreszenz-Signale erfolgte mit einem *GenePix™4000B*-Scanner. Tabelle 5.3 zeigt, in welchen Kombinationen die drei unabhängigen Wildtyp-RNS-Proben mit den drei unabhängigen *G2-enok*- bzw den zwei unabhängigen *rot<sup>60</sup>*-RNS-Proben verglichen wurden.

### 5.5.19 Herstellung von Digoxigenin-markierten RNS-Sonden

Für *in situ*-Hybridisierungen wurden Digoxigenin-markierte Gegensinn-RNS-Sonden verwendet. Dazu wurde das Plasmid, das die entsprechende DNS-Probe enthielt, mit einem Restriktionsenzym linearisiert. Die Schnittstelle wurde dabei so gewählt, dass entweder mittels einer *SP6-RNS-Polymerase* oder einer *T7-RNS-Polymerase* eine markierte Gegensinn-RNS transkribiert werden konnte. Zur Aufreinigung des linearisierten Plasmids wurde das *QIAquick Nucleotide Removal Kit* verwendet. Die Durchführung erfolgte nach Herstellerprotokoll (*QIAquick Spin Handbook: QIAquick Nucleotide Removal Kit Protocol*). 1 µg linearisiertes Plasmid wurde dann im *Dig RNA Labeling Kit* nach Herstellerangaben eingesetzt. Die Reinigung der Dig-RNS-Sonde erfolgte mit dem *NucleoSpin® RNA II Kit (protocol for RNA clean-up)*. Die Dig-RNS-Sonde wurde versehen mit 80 µl HybeB-Puffer bei -20 °C gelagert.

### 5.5.20 *in-situ*-Hybridisierungen

Die räumliche und zeitliche Verteilung von Transkripten während der Embryonalentwicklung und der Larvalentwicklung von *Drosophila* wurde durch *in situ*-Hybridisierungen an ganzen Embryonen oder dissektierten Larven des zweiten Instar untersucht.

Auf Apfelsaftagar abgelegte Embryonen (nicht älter als 17 h) wurden gewaschen (dH<sub>2</sub>O), dechorioniert (3 bis 5 min in 50 % Klorix-Lösung) und erneut gewaschen (dreimal mit dH<sub>2</sub>O). Die Fixierung erfolgte in einer Mischung aus 4 ml Fix1-Lösung, 5 ml n-Heptan und 0,5 ml Formaldehyd (20 bis 30 min schütteln bei RT). Danach wurde die untere Phase abgenommen. Nach Zugabe desselben Volumens Methanol und kräftigem Schütteln wurden die Embryonen devitellinisiert (osmotischer Schock). Nach Überführung in ein 1,5 ml Gefäß erfolgten drei weitere Methanol-Waschschritte. Die fixierten Embryonen konnten danach bei -20 °C in Methanol aufbewahrt werden. In 1 x PBS dissektierte Larven wurden nur mit Methanol gewaschen und nicht fixiert.

Soweit nicht anders erwähnt, wurden alle folgenden Schritte unter Rottieren auf einem Drehrad bei RT durchgeführt. Die Embryonen/Larven wurden nach Waschen mit PBT (viermal) 2 min mit Proteinase K (20 µg/ml in PBT) behandelt. Die Reaktion wurde durch Zugabe von Glycin (2 mg/ml in PBT) und zweimaligem Waschen mit PBT gestoppt. Danach erfolgte eine Refixierung in 3,4 % Formaldehyd (in PBT) für 20 min und erneutes viermaliges Waschen in PBT. Nun wurden die Embryonen/Larven schrittweise über Hybe-B in Hybe überführt (1. 1:1 PBT:Hybe-B, 2. Hybe-B, 3. Hybe, 4. 20 min Hybe bei 70 °C). Nach Abnahme des Überstandes wurden die Embryonen/Larven im verbleibenden Volumen über Nacht bei 70 °C mit 1 µl Dig-RNA-Sonde hybridisiert. Anschließend wurden die Embryonen/Larven wieder schrittweise in PBT überführt (1. Hybe bei 70 °C, 2. zweimal Hybe-B je 15 min bei 70 °C, 3. PBT bei RT). Nach fünfmaligem Waschen in PBT erfolgte die Signaldetektion durch einstündige Inkubation mit anti-Digoxigenin-alkalische-Phosphatase-Konjugat (1:2000 in PBT, *Digoxigenin Detection Kit*). Erneut wurde fünfmal in PBT gewaschen und dann die Embryonen/Larven in AP-Puffer überführt (zweimal Waschen). Anschließend wurde die Färbung durch Zugabe von 4,5 µl NBT und 3,5 µl X-Phosphat gestartet. Nach 15 bis 60 min wurde die Färbereaktion, die im Dunkeln ablief, mit PBT

gestoppt (dreimal Waschen). Die Dehydratisierung erfolgte schrittweise mit 70 % und 100 % Ethanol, bevor die Embryonen in Kanada Balsam und die Larven in 10 % Glycerol (in PBS) eingebettet wurden.

### 5.5.21 Expression und Aufreinigung von rekombinanten Proteinen

Die Expression und Aufreinigung von His-*tag*-Proteinen erfolgte mit dem *QIAexpress Type IV Kit* (Expressionsvektor pQE-30, -31, -32) nach Herstellerangaben (*The QIAexpressionist*) mit der *E.coli* M15-Linie.

Für die Expression von GST-*tag*-Proteinen wurden die pGEX-4T-Vektoren (Pharmacia) in *E.coli* BL21 verwendet. 200 ml LB-Amp-Medium (mit 10  $\mu\text{M}$   $\text{ZnSO}_4$ ) wurden 1:20 mit einer über-Nacht-Kultur angeimpft und bis  $\text{OD}_{600}=0,5$  schüttelnd bei 37 °C wachsen gelassen. Die Induktion erfolgte durch Zugabe von 0,2 mM IPTG. Nach 2 bis 4 h schüttelnd bei 37 °C wurden die Bakterien abzentrifugiert (15 min, 4 °C, 2000 x g), in 4 ml 1 x Bindungspuffer resuspendiert, mit 1 mg/ml Lysozym versetzt und 30 min auf Eis inkubiert. Danach wurden die Bakterien sonifiziert (4 x 10 Pulse mit 50 % Leistung auf Eis, zwischen den Pulsen 10 sek warten). Die Bakterientrümmen wurden abzentrifugiert (20 min, 4 °C, 10000 x g) und der Überstand mit 1 ml Glutathion-Beads (vorher mit 1 x Bindungspuffer gewaschen) 1 h bei 4 °C drehend/schüttelnd inkubiert. Dann wurden die Beads 4 x mit 20 ml 1 x Bindungspuffer gewaschen, auf Poly-Prep-Säulen überführt und acht bis zehn Fraktionen mit je 100  $\mu\text{l}$  Bindungspuffer (mit 10 mM reduziertem Glutathion) eluiert. Zur Analyse in einem Proteingel wurden 10  $\mu\text{l}$  von jeder Fraktion entnommen und der Rest mit 10 % Glycerol versetzt schockgefroren ( $\text{N}_2$ ) und bei -80 °C gelagert. Die Proteinkonzentrationen wurden im Gel mit einer definierten Menge Rinderserum-Albumin verglichen und in dieser Weise bestimmt.

### 5.5.22 Auftrennung von Proteinen in SDS-Polyacrylamidgelen (SDS-PAGE)

Proteine oder Bakterienlysate wurden mit Hilfe der diskontinuierlichen SDS-Gelelektrophorese analysiert. Dabei wurden sie zunächst in einem niederprozentigen Sammelgel fokussiert und in einem sich direkt anschließenden, höherprozentigen Trenngel ihrem Molekulargewicht entsprechend aufgetrennt. Die

Trenngel-Lösung wurde nach vorsichtigem Mischen zwischen zwei durch 1,5 mm dicke Abstandshalter voneinander getrennte Glasplatten gegossen. Nach Überschichten mit Isopropanol polymerisierte das Gel in vertikaler Lage. Nach erfolgter Polymerisation wurde das Isopropanol entfernt und die Sammelgel-Lösung direkt auf das Trenngel gegossen. Nach Einsetzen eines Kammes polymerisierte das Sammelgel in vertikaler Lage. Anschließend wurde das Gel in eine Vertikalapparatur eingespannt und die Reservoirs mit 1 x Lämmli-Puffer gefüllt. Die Proteinproben oder Bakterienkultur wurden mit 1 x SDS-Probenpuffer versetzt, zum Denaturieren 5 min auf 100°C erhitzt und in die Taschen des Gels transferiert. Die Elektrophorese erfolgte in der Regel bei einer Stromstärke von 80 mA. Zur Größenbestimmung wurde ein Proteinmarker mitgeführt.

### **5.5.23 Coomassie-Färbung von Proteinen nach SDS-PAGE**

In SDS-PAGE aufgetrennte Proteine wurden durch Coomassie-Färbung sichtbar gemacht. Dazu wurde das Gel 30 min in 50 ml Coomassie-Färbelösung und danach in den Coomassie-Entfärbelösung inkubiert, bis die Proteinbanden gut sichtbar wurden.

### **5.5.24 Silberfärbung von Proteinen nach SDS-PAGE**

Die Silberfärbung ist etwa um den Faktor 10 bis 100 sensitiver als die Coomassie-Färbung. Zunächst wurde das Proteingel 1 h schüttelnd in 100 ml Silber-Fixlösung fixiert, 1 h 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 waren. Die Entwicklung wurde durch zweimaliges Waschen mit dH<sub>2</sub>O gestoppt.



### 5.5.25 Western-Transfer

Proteine in SDS-Polyacrylamidgelen wurden durch Elektrotransfer mit Hilfe einer Nass-Transferkammer auf eine PVDF-Membran (*Immobilon-P*) übertragen. Zuvor wurde die Membran 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 3 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.

### 5.5.26 Hybridisierung von Western-Transfers

Der Nachweis von His-tag-Proteinen erfolgte mit dem *Anti-His Antibody Selector Kit* nach Herstellerangaben (*QIAexpress Detection and Assay Handbook: Detection of 6xHis-tagged proteins*). Ab der Sekundär-Antikörper-Hybridisierung wurde wie unten beschrieben fortgefahren.

Das Absättigen der unspezifischen Bindungsstellen erfolgte durch Inkubation der Membran für mindestens 1 h in der Blockierungs-Lösung bei RT. Nach dem Abschütten der Blockierungs-Lösung wurde der Primär-Antikörper in 10 ml frischer Blockierungslösung zugegeben und 1 h eingeschweißt in Kunststoff-Folie bei RT inkubiert. Nach dreimaligem Waschen für jeweils 10 min mit je 20 ml PBS-T wurde genauso mit dem Sekundär-Antikörper verfahren, der spezifisch den Primär-Antikörper bindet und mit Meerrettich-Peroxidase gekoppelt ist. Die Detektion der Proteine erfolgte mit dem *ECL Western blotting detection reagents* mit *Hyperfilm<sup>TM</sup>ECL* nach Herstellerangaben.

### 5.5.27 HAT-Filterassay

Für diesen Assay wurden 100 ng aufgereinigtes rekombinantes Protein mit 1 x HAT-Puffer, 40 µg/ml Core-Histonen und 36 mCi/mmol [<sup>3</sup>H]-Acetyl-CoA (Amersham) in 50 µl Volumen 30 min bei 37 °C inkubiert. Anschließend wird der

Reaktionsansatz auf P81-Filterpapier (1,5 x 1,5 cm) pipettiert. Diese Filter wurden dreimal in einem großen Volumen 50 mM NaCO<sub>3</sub> (pH 9,2) gewaschen, mit Aceton gespült und luftgetrocknet. Die Filter wurden schließlich mit 2 ml Szintillationsflüssigkeit überdeckt und die Radioaktivität in einem Szintillationsmessgerät gemessen.

### **5.5.28 Zellkultur**

Alle eukaryotischen Zelllinien wurden in einem Brutschrank in befeuchteter Atmosphäre bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> in Zellkulturflaschen kultiviert. Die verwendeten Zelllinien wuchsen nicht adhärent und wurden vor Erreichen der Konfluenz in geringerer Dichte weiter kultiviert. Hierzu wurden alle Lösungen auf 37 °C vorgewärmt. Die Zellen wurden je nach Größe der Kulturflasche in 5 bis 10 ml Kulturmedium aufgenommen und vor dem Ausplattieren 3 min bei 300 x g abzentrifugiert. Die Zellen wurden in frischem Medium resuspendiert und in der jeweils gewünschten Verdünnung auf neue Kulturflaschen verteilt.

Zur Langzeit-Lagerung der positiven Hybridoma-Klone wurden die Zellen 3 min bei 400 x g zentrifugiert. Das Pellet wurde in eiskaltem Einfriermedium resuspendiert (1 ml pro 5 x 10<sup>6</sup> Zellen). Jeweils 1 ml wurde in ein Einfrierröhrchen gegeben und 45 min auf Eis inkubiert. In einem Styroporbehälter wurden die Zellen über Nacht auf -80 °C abgekühlt und schließlich in flüssigem Stickstoff (-196 °C) aufbewahrt.

### **5.5.29 Herstellung monoklonaler Antikörper**

Alle hier beschriebenen Tierversuche wurden gemäß den Richtlinien des deutschen Tierschutzgesetzes durchgeführt. Die Experimente sind alle vom Regierungspräsidium genehmigt worden. Alle hier beschriebenen Mausstämme sind aus dem Tierhaus des ITG.

Für die Herstellung von monoklonalen Antikörpern gegen Enok wurde die Immunisierung nach Niebuhr et al. (1998) durchgeführt. Dabei wurden Balb/C-Mäuse immunisiert. Das Antigen war rekombinantes His-1813-2197 aus pAS1. Für die Hybridoma-Bildung wurden SP2/0-Maus-Myelomazellen in Kultur genommen und in ausreichender Menge produziert (etwa 5 x 10<sup>8</sup>). Am Tag vor der

eigentlichen Hybridoma-Bildung wurden Feeder-Zellen aus dem Peritoneum von Mäusen mittels einer 0,34 M Saccharose-Ausspülung isoliert. Die Zellen wurden in Hybridoma-Medium aufgenommen und auf zehn 96-Well-Platten verteilt.

Die immunisierten Mäuse wurden nach der Tötung in Ethanol getaucht, um sie steril zu halten. Dann wurden unter der Sterilbank die poplitealen Lymphknoten aus der Kniekehle entnommen und in RPMI-Medium überführt. Mittels zweier steriler Nadeln wurden die B-Zellen aus den Lymphknoten gerieben. Danach wurden die Zellen möglichst ohne Organreste in ein 50 ml Falcon-Röhrchen transferiert und die B-Zellen und die Myelomazellen dreimal in RPMI-Medium gewaschen (5 min, 400 x g). Nach dem letzten Waschschrift wurden die Myeloma- und B-Zellen vereinigt, nochmals zentrifugiert und der Überstand abgesaugt. Nun erfolgte die Fusionierung mittel Polyethylenglykol (PEG). Dazu wurden die vereinigten Zellen in 400 µl RPMI-Medium aufgenommen und 600 µl PEG hinzugegeben. Durch leichtes Schütteln wurde gemischt und dann bei 800 x g für 5 min zentrifugiert. 500 µl des Überstands wurden abgenommen und durch leichtes Klopfen die Zellen wieder resuspendiert. Es wurden nun vorsichtig 5 ml RPMI-Medium und dann 10 ml Hybridoma-Medium hinzugegeben, um die Fusionierungsreaktion zu stoppen. Nach erneutem vorsichtigem Mischen wurden die Zellen abzentrifugiert, der Überstand abgesaugt und die Zellen in 100 ml Hybridoma-Medium aufgenommen. Letztendlich wurden die Hybridoma-Zellen auf den zuvor mit Feeder-Zellen bestückten 96-well-Platten verteilt.

Die 96-Well-Platten wurden ab dem siebten Tag nach der Hybridoma-Bildung täglich auf wachsende Hybridoma-Klone untersucht. Bei Klonen, die etwa ein Drittel des wells ausfüllten, wurde das Medium ausgetauscht. Am folgenden Tag wurde bei diesen Wells etwa 100 µl Medium abgenommen und dieses Medium mit den enthaltenen Antikörpern mittels ELISA (*Enzyme-linked Immunosorbent Assay*) getestet.

Dafür wurden 96-well-Immulon II-Platten mit 1 µg/Well rekombinantem GST-1813-2197 aus pRex2 beschickt und über Nacht in einer feuchten Kammer inkubiert. Die überschüssige Proteinlösung wurde abgeschüttet und alle nichtbesetzten Bindestellen mittels 10 % FCS in PBS geblockt.

Für den ELISA wurde pro Hybridoma-Klon ein Well mit dem Überstand 1 h inkubiert. Nach dreimaligem Waschen in PBS wurde für 30 min mit HRP-gekoppeltem Sekundär-Antikörper inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit PBS

wurde die ABTS-Färbereaktion nach Herstellerangabe durchgeführt. Die Farb-Reaktion wurde dokumentiert. Durch diesen Screen wurden acht positive Hybridoma-Klone isoliert und deren Antikörper-Klasse mittels *IsoStrip Mouse Monoclonal Antibody Isotyping Kit* festgestellt. Weitere Tests dieser Klone erfolgten in Western Transfer Hybridisierungen.

Um Antikörper aufzureinigen, wurden zwei Hybridoma-Klone (7-B5 und 9-A11) in je zwei Litern RPMI-Medium in Rollflaschen bis zur Konfluenz kultiviert. Die Zellen wurden abzentrifugiert (4000 x g, 10 min) und 313 g/l festes Ammoniumsulfat bei RT unter Rühren dazugegeben und über Nacht bei 4 °C unter Rühren inkubiert. Das Präzipitat wurde 10 min bei 5000 x g pelletiert, in 20 ml Antikörperpuffer resuspendiert und gegen vier Liter Antikörperpuffer über Nacht bei 4 °C dialysiert. Die dialysierte Lösung wurde zentrifugiert (10 min, 10000 x g) und der Überstand mit 2 ml 50 % Protein G plus Agarose über Nacht bei 4 °C inkubiert. Die Agarose wurde danach abzentrifugiert (3000 x g, 5 min) und viermal mit Antikörperpuffer gewaschen. Die Agarose wurde dann auf Econo-Pack-Säulen überführt und zehnmal mit je 0,5 ml 100 mM Glycinlösung (pH 2,5) eluiert. Jede Fraktion wurde mit 50 µl 1 M Tris (pH 9,6) neutralisiert und gekühlt. Die Proteinkonzentration der Fraktionen wurden spektralphotometrisch (OD<sub>280</sub>) gemessen und die Fraktionen mit den höchsten Konzentrationen vereinigt.

## 5.6 Sequenzanalysen und Datenbanken

Die Proteinsequenz von Enok wurde neben der Homologie-Suche bei NCBI vor allem mit HUSAR (*Heidelberg Unix Sequence Analysis Resources*) untersucht. HUSAR wird von der *Biocomputing Service Group* des Deutschen Krebsforschungszentrums in Heidelberg online angeboten. Die dort angebotenen Programme *pileup*, *PepStats*, *BestFit*, *Gap*, *TmHMM*, *Reformat*, *Prosite*, *Motifs*, *PsiPred* und *Psort* wurden für die Untersuchung der Enok-Sequenz verwendet.

Um für die Primer-Planung die Nukleotid-Sequenzen von *Drosophila*-Genen, die in Microarray-Analysen identifiziert wurden, zu erhalten, wurde die *BDGP / Celera / flybase*-Datenbank (<http://www.flybase.org>) benutzt.

## 6 Literatur

**Aasland R, Gibson TJ, Stewart AF.**

The PHD finger: implications for chromatin-mediated transcriptional regulation. *Trends Biochem Sci.* 1995 Feb;20(2):56-9.

**Akhtar A, Becker PB.**

Activation of transcription through histone H4 acetylation by MOF, an acetyltransferase essential for dosage compensation in *Drosophila*. *Mol Cell.* 2000 Feb;5(2):367-75.

**Akhtar A, Becker PB.**

The histone H4 acetyltransferase MOF uses a C2HC zinc finger for substrate recognition. *EMBO Rep.* 2001 Feb;2(2):113-8.

**Altschul SF, Madden TL, Schaffer AA, Zhang J, Zhang Z, Miller W, Lipman DJ.**

Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.* 1997 Sep 1;25(17):3389-402.

**Anderson RA, Byrum RS, Coates PM, Sando GN.**

Mutations at the lysosomal acid cholesteryl ester hydrolase gene locus in Wolman disease. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1994 Mar 29;91(7):2718-22.

**Bernal A, Kimbrell DA.**

*Drosophila* Thor participates in host immune defense and connects a translational regulator with innate immunity. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2000 May 23;97(11):6019-24.

**Böhni R, Riesgo-Escovar J, Oldham S, Brogiolo W, Stocker H, Andruss BF, Beckingham K, Hafen E.**

Autonomous control of cell and organ size by CHICO, a *Drosophila* homolog of vertebrate IRS1-4. *Cell.* 1999 Jun 25;97(7):865-75.

**Borrow J, Stanton VP Jr, Andresen JM, Becher R, Behm FG, Chaganti RS, Civin CI, Distech C, Dube I, Frischauf AM, Horsman D, Mitelman F, Volinia S, Watmore AE, Housman DE.**

The translocation t(8;16)(p11;p13) of acute myeloid leukaemia fuses a putative acetyltransferase to the CREB-binding protein. *Nat Genet.* 1996 Sep;14(1):33-41.

**Brand AH, Perrimon N.**

Targeted gene expression as a means of altering cell fates and generating dominant phenotypes. *Development.* 1993 Jun;118(2):401-15.

**Britton JS, Edgar BA.**

Environmental control of the cell cycle in *Drosophila*: nutrition activates mitotic and endoreplicative cells by distinct mechanisms. *Development*. 1998 Jun;125(11):2149-58.

**Brown NH, Kafatos FC.**

Functional cDNA libraries from *Drosophila* embryos. *J Mol Biol*. 1988 Sep 20;203(2):425-37.

**Bryant PJ, Simpson P.**

Intrinsic and extrinsic control of growth in developing organs. *Q Rev Biol*. 1984 Dec;59(4):387-415.

**Carapeti M, Aguiar RC, Goldman JM, Cross NC.**

A novel fusion between MOZ and the nuclear receptor coactivator TIF2 in acute myeloid leukemia. *Blood*. 1998 May 1;91(9):3127-33.

**Casso D, Ramirez-Weber FA, Kornberg TB.**

GFP-tagged balancer chromosomes for *Drosophila melanogaster*. *Mech Dev*. 1999 Nov;88(2):229-32.

**Chaffanet M, Gressin L, Preudhomme C, Soenen-Cornu V, Birnbaum D, Pebusque MJ.**

MOZ is fused to p300 in an acute monocytic leukemia with t(8;22). *Genes Chromosomes Cancer*. 2000 Jun;28(2):138-44.

**Champagne N, Bertos NR, Pelletier N, Wang AH, Vezmar M, Yang Y, Heng HH, Yang XJ.**

Identification of a human histone acetyltransferase related to monocytic leukemia zinc finger protein. *J Biol Chem*. 1999 Oct 1;274(40):28528-36.

**Champagne N, Pelletier N, Yang XJ.**

The monocytic leukemia zinc finger protein MOZ is a histone acetyltransferase. *Oncogene*. 2001 Jan 18;20(3):404-9.

**Christie GR, Hajduch E, Hundal HS, Proud CG, Taylor PM.**

Intracellular sensing of amino acids in *Xenopus laevis* oocytes stimulates p70 S6 kinase in a target of rapamycin-dependent manner. *J Biol Chem*. 2002 Mar 22;277(12):9952-7.

**Clarke AS, Lowell JE, Jacobson SJ, Pillus L.**

Esa1p is an essential histone acetyltransferase required for cell cycle progression. *Mol Cell Biol*. 1999 Apr;19(4):2515-26.

**Coulondre C, Miller JH.**

Genetic studies of the lac repressor. III. Additional correlation of mutational sites with specific amino acid residues. *J Mol Biol*. 1977 Dec 15;117(3):525-67.

**Daga A, Karlovich CA, Dumstrei K, Banerjee U.**

Patterning of cells in the *Drosophila* eye by Lozenge, which shares homologous domains with AML1.

Genes Dev. 1996 May 15;10(10):1194-205.

**Davis RL.**

Physiology and biochemistry of *Drosophila* learning mutants.

Physiol Rev. 1996 Apr;76(2):299-317.

**Dominick OS, Truman JW.**

The physiology of wandering behaviour in *Manduca sexta*. II. The endocrine control of wandering behaviour.

J Exp Biol. 1985 Jul;117:45-68.

**Dutnall RN, Tafrov ST, Sternglanz R, Ramakrishnan V.**

Structure of the histone acetyltransferase Hat1: a paradigm for the GCN5-related N-acetyltransferase superfamily.

Cell. 1998 Aug 21;94(4):427-38.

**Firtel RA.**

Signal transduction pathways controlling multicellular development in Dictyostelium.

Trends Genet. 1991 Nov-Dec;7(11-12):381-8.

**Flores GV, Daga A, Kalhor HR, Banerjee U.**

Lozenge is expressed in pluripotent precursor cells and patterns multiple cell types in the *Drosophila* eye through the control of cell-specific transcription factors.

Development. 1998 Sep;125(18):3681-7.

**Flybase.**

The FlyBase database of the *Drosophila* Genome Projects and community literature. The FlyBase Consortium.

Nucleic Acids Res. 1999 Jan 1;27(1):85-8.

**Garbe JC, Yang E, Fristrom JW.**

IMP-L2: an essential secreted immunoglobulin family member implicated in neural and ectodermal development in *Drosophila*.

Development. 1993 Dec;119(4):1237-50.

**Grant P, Sharma P, Pant HC.**

Cyclin-dependent protein kinase 5 (Cdk5) and the regulation of neurofilament metabolism.

Eur J Biochem. 2001 Mar;268(6):1534-46.

**Gupta BP, Flores GV, Banerjee U, Rodrigues V.**

Patterning an epidermal field: *Drosophila* lozenge, a member of the AML-1/Runt family of transcription factors, specifies olfactory sense organ type in a dose-dependent manner.

Dev Biol. 1998 Nov 15;203(2):400-11.

**Hanai K.**

In situ potentiation of the glutathione-binding protein for the tentacle ball formation by a protease and efficient ingestion of prey in hydra.

Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol. 1998 Jan;119(1):333-9.

**Hayes JJ, Wolffe AP.**

Preferential and asymmetric interaction of linker histones with 5S DNA in the nucleosome.

Proc Natl Acad Sci U S A. 1993 Jul 15;90(14):6415-9.

**Heisenberg M.**

What do the mushroom bodies do for the insect brain? an introduction.

Learn Mem. 1998 May-Jun;5(1-2):1-10.

**Hesterlee S, Morton DB.**

Insect physiology: the emerging story of ecdysis.

Curr Biol. 1996 Jun 1;6(6):648-50.

**Hilfiker A, Hilfiker-Kleiner D, Pannuti A, Lucchesi JC.**

mof, a putative acetyl transferase gene related to the Tip60 and MOZ human genes and to the SAS genes of yeast, is required for dosage compensation in *Drosophila*.

EMBO J. 1997 Apr 15;16(8):2054-60.

**Iizuka M, Stillman B.**

Histone acetyltransferase HBO1 interacts with the ORC1 subunit of the human initiator protein.

J Biol Chem. 1999 Aug 13;274(33):23027-34.

**Ikura T, Ogryzko VV, Grigoriev M, Groisman R, Wang J, Horikoshi M, Scully R, Qin J, Nakatani Y.**

Involvement of the TIP60 histone acetylase complex in DNA repair and apoptosis.

Cell. 2000 Aug 18;102(4):463-73.

**Ito K, Suzuki K, Estes P, Ramaswami M, Yamamoto D, Strausfeld NJ.**

The organization of extrinsic neurons and their implications in the functional roles of the mushroom bodies in *Drosophila melanogaster* Meigen.

Learn Mem. 1998 May-Jun;5(1-2):52-77.

**Jefferis GS, Marin EC, Watts RJ, Luo L.**

Development of neuronal connectivity in *Drosophila* antennal lobes and mushroom bodies.

Curr Opin Neurobiol. 2002 Feb;12(1):80-6.

**Johnston LA, Gallant P.**

Control of growth and organ size in *Drosophila*.

Bioessays. 2002 Jan;24(1):54-64.



**Kaminker JS, Singh R, Lebestky T, Yan H, Banerjee U.**

Redundant function of Runt Domain binding partners, Big brother and Brother, during *Drosophila* development.  
Development. 2001 Jul;128(14):2639-48.

**Kawamura K, Shibata T, Saget O, Peel D, Bryant PJ.**

A new family of growth factors produced by the fat body and active on *Drosophila* imaginal disc cells.  
Development. 1999 Jan;126(2):211-9.

**Kitabayashi I, Aikawa Y, Yokoyama A, Hosoda F, Nagai M, Kakazu N, Abe T, Ohki M.**

Fusion of MOZ and p300 histone acetyltransferases in acute monocytic leukemia with a t(8;22)(p11;q13) chromosome translocation.  
Leukemia. 2001a Jan;15(1):89-94.

**Kitabayashi I, Aikawa Y, Nguyen LA, Yokoyama A, Ohki M.**

Activation of AML1-mediated transcription by MOZ and inhibition by the MOZ-CBP fusion protein.  
EMBO J. 2001b Dec 17;20(24):7184-96.

**Kurusu M, Awasaki T, Masuda-Nakagawa LM, Kawauchi H, Ito K, Furukubo-Tokunaga K.**

Embryonic and larval development of the *Drosophila* mushroom bodies: concentric layer subdivisions and the role of fasciclin II.  
Development. 2002 Jan;129(2):409-19.

**Lee T, Lee A, Luo L.**

Development of the *Drosophila* mushroom bodies: sequential generation of three distinct types of neurons from a neuroblast.  
Development. 1999 Sep;126(18):4065-76.

**Lewis EB.**

A gene complex controlling segmentation in *Drosophila*.  
Nature. 1978 Dec 7;276(5688):565-70.

**Li T, Bender M.**

A conditional rescue system reveals essential functions for the ecdysone receptor (EcR) gene during molting and metamorphosis in *Drosophila*.  
Development. 2000 Jul;127(13):2897-905.

**Liang J, Prouty L, Williams BJ, Dayton MA, Blanchard KL.**

Acute mixed lineage leukemia with an inv(8)(p11q13) resulting in fusion of the genes for MOZ and TIF2.  
Blood. 1998 Sep 15;92(6):2118-22.

**Luo L, Lee T, Tsai L, Tang G, Jan LY, Jan YN.**

Genghis Khan (Gek) as a putative effector for *Drosophila* Cdc42 and regulator of actin polymerization.

Proc Natl Acad Sci U S A. 1997 Nov 25;94(24):12963-8.

**Lyko F, Ramsahoye BH, Kashevsky H, Tudor M, Mastrangelo MA, Orr-Weaver TL, Jaenisch R.**

Mammalian (cytosine-5) methyltransferases cause genomic DNA methylation and lethality in *Drosophila*.

Nat Genet. 1999 Nov;23(3):363-6.

**Marmorstein R, Roth SY.**

Histone acetyltransferases: function, structure, and catalysis.

Curr Opin Genet Dev. 2001 Apr;11(2):155-61.

**Martin JR, Ernst R, Heisenberg M.**

Mushroom bodies suppress locomotor activity in *Drosophila melanogaster*.

Learn Mem. 1998 May-Jun;5(1-2):179-91.

**Mesce KA, Fahrbach SE.**

Integration of endocrine signals that regulate insect ecdysis.

Front Neuroendocrinol. 2002 Apr;23(2):179-99.

**Meyers S, Downing JR, Hiebert SW.**

Identification of AML-1 and the (8;21) translocation protein (AML-1/ETO) as sequence-specific DNA-binding proteins: the runt homology domain is required for DNA binding and protein-protein interactions.

Mol Cell Biol. 1993 Oct;13(10):6336-45.

**Miron M, Verdu J, Lachance PE, Birnbaum MJ, Lasko PF, Sonenberg N.**

The translational inhibitor 4E-BP is an effector of PI(3)K/Akt signalling and cell growth in *Drosophila*.

Nat Cell Biol. 2001 Jun;3(6):596-601.

**Moses K, Rubin GM.**

Glass encodes a site-specific DNA-binding protein that is regulated in response to positional signals in the developing *Drosophila* eye.

Genes Dev. 1991 Apr;5(4):583-93.

**Neuwald AF, Landsman D.**

GCN5-related histone N-acetyltransferases belong to a diverse superfamily that includes the yeast SPT10 protein.

Trends Biochem Sci. 1997 May;22(5):154-5.

**Niebuhr K, Lingnau A, Frank R, Wehland J.**

Rapid procedures for preparing monoclonal antibodies and identifying their epitopes. In Cell biology: A laboratory handbook.

Academic Press. 1998; second edition vol.2: 398-403.

**Oldham S, Montagne J, Radimerski T, Thomas G, Hafen E.**

Genetic and biochemical characterization of dTOR, the *Drosophila* homolog of the target of rapamycin.

Genes Dev. 2000 Nov 1;14(21):2689-94.

**Panagopoulos I, Fioretos T, Isaksson M, Samuelsson U, Billstrom R, Strombeck B, Mitelman F, Johansson B.**

Fusion of the MORF and CBP genes in acute myeloid leukemia with the t(10;16) (q22;p13).

Hum Mol Genet. 2001 Feb 15;10(4):395-404.

**Pistillo D, Manzi A, Tino A, Boyl PP, Graziani F, Malva C.**

The *Drosophila melanogaster* lipase homologs: a gene family with tissue and developmental specific expression.

J Mol Biol. 1998 Mar 13;276(5):877-85.

**Ramakrishnan V, Finch JT, Graziano V, Lee PL, Sweet RM.**

Crystal structure of globular domain of histone H5 and its implications for nucleosome binding.

Nature. 1993 Mar 18;362(6417):219-23.

**Reifsnyder C, Lowell J, Clarke A, Pillus L.**

Yeast SAS silencing genes and human genes associated with AML and HIV-1 Tat interactions are homologous with acetyltransferases.

Nat Genet. 1996 Sep;14(1):42-9.

**Renner M, Storch V, Welsch U.**

Kükenthals Leitfaden für das Zoologische Praktikum.

Gustav Fischer Verlag. 1991; Stuttgart, Jena.

**Riddiford LM.**

Hormones and *Drosophila* development. In The development of *Drosophila melanogaster*.

Bate M, Martinez Arias A. 1993; ed New York, Cold Spring Harbour Laboratory Press:899-940

**Sanjuan R, Marin I.**

Tracing the origin of the compensasome: evolutionary history of DEAH helicase and MYST acetyltransferase gene families.

Mol Biol Evol. 2001 Mar;18(3):330-43.

**Schmelzle T, Hall MN.**

TOR, a central controller of cell growth.

Cell. 2000 Oct 13;103(2):253-62.

**Scott EK, Lee T, Luo L.**

enok encodes a *Drosophila* putative histone acetyltransferase required for mushroom body neuroblast proliferation.

Curr Biol. 2001 Jan 23;11(2):99-104.

**Shah JV, Cleveland DW.**

Slow axonal transport: fast motors in the slow lane.  
Curr Opin Cell Biol. 2002 Feb;14(1):58-62.

**Shea TB, Flanagan LA.**

Kinesin, dynein and neurofilament transport.  
Trends Neurosci. 2001 Nov;24(11):644-8.

**Shetty KT, Link WT, Pant HC.**

cdc2-like kinase from rat spinal cord specifically phosphorylates KSPXK motifs in neurofilament proteins: isolation and characterization.  
Proc Natl Acad Sci U S A. 1993 Jul 15;90(14):6844-8.

**Siegmund T, Korge G.**

Innervation of the ring gland of *Drosophila melanogaster*.  
J Comp Neurol. 2001 Mar 19;431(4):481-91.

**Sloth Andersen A, Hertz Hansen P, Schaffer L, Kristensen C.**

A new secreted insect protein belonging to the immunoglobulin superfamily binds insulin and related peptides and inhibits their activities.  
J Biol Chem. 2000 Jun 2;275(22):16948-53.

**Smith ER, Eisen A, Gu W, Sattah M, Pannuti A, Zhou J, Cook RG, Lucchesi JC, Allis CD.**

ESA1 is a histone acetyltransferase that is essential for growth in yeast.  
Proc Natl Acad Sci U S A. 1998 Mar 31;95(7):3561-5.

**Rubin GM, Spradling AC.**

Vectors for P element-mediated gene transfer in *Drosophila*.  
Nucleic Acids Res. 1983 Sep 24;11(18):6341-51.

**Stern DL, Emlen DJ.**

The developmental basis for allometry in insects.  
Development. 1999 Mar;126(6):1091-101.

**Sterner DE, Berger SL.**

Acetylation of histones and transcription-related factors.  
Microbiol Mol Biol Rev. 2000 Jun;64(2):435-59.

**Tautz D, Pfeifle C.**

A non-radioactive in situ hybridization method for the localization of specific RNAs in *Drosophila* embryos reveals translational control of the segmentation gene hunchback.  
Chromosoma. 1989 Aug;98(2):81-5.

**Thomas T, Voss AK, Chowdhury K, Gruss P.**

Querkopf, a MYST family histone acetyltransferase, is required for normal cerebral cortex development.  
Development. 2000 Jun;127(12):2537-48.

**Twitty VC, Schwind JL.**

The growth of eyes and limbs transplanted heteroplastically between two species of *Amblystoma*.

J.Exp.Zool. 1931;59:61-86.

**Van Houten J.**

Chemosensory transduction in eukaryotic microorganisms: trends for neuroscience?

Trends Neurosci. 1994 Feb;17(2):62-71.

**Voet D, VoetJG.**

Biochemie.

VCH Verlagsgesellschaft mbH, Weinheim, 1994.

**Voie A-M, Cohen S.**

Germ-line Transformation of *Drosophila melanogaster*. In Cell biology: A laboratory handbook.

Academic Press. 1998; second edition vol.3: 510-17.

**Wolf E, Vassilev A, Makino Y, Sali A, Nakatani Y, Burley SK.**

Crystal structure of a GCN5-related N-acetyltransferase: *Serratia marcescens* aminoglycoside 3-N-acetyltransferase.

Cell. 1998 Aug 21;94(4):439-49.

**Yan Y, Barlev NA, Haley RH, Berger SL, Marmorstein R.**

Crystal structure of yeast Esa1 suggests a unified mechanism for catalysis and substrate binding by histone acetyltransferases.

Mol Cell. 2000 Nov;6(5):1195-205.

**Zhang H, Stallock JP, Ng JC, Reinhard C, Neufeld TP.**

Regulation of cellular growth by the *Drosophila* target of rapamycin dTOR.

Genes Dev. 2000 Nov 1;14(21):2712-24.

**Zinke I.**

Zur genetischen Regulation der Nahrungsaufnahme und des Wachstums in *Drosophila melanogaster* (Meigen).

Diplomarbeit, 1999.

**Zinke I, Kirchner C, Chao LC, Tetzlaff MT, Pankratz MJ.**

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. 1999 Dec;126(23):5275-84.

**Zinke I, Schütz CS, Katzenberger JD, Bauer M, Pankratz MJ.**

Nutrient control of gene expression in *Drosophila*: microarray analysis of starvation and sugar-dependent response.

EMBO J. 2002 Nov 15;21(22):6162-73.

**Zitnan D, Sehnal F, Bryant PJ.**

Neurons producing specific neuropeptides in the central nervous system of normal and pupariation-delayed *Drosophila*.

Dev Biol. 1993 Mar;156(1):117-35.

## 7 Anhang

### 7.1 genomische DNS-Sequenz des *enok*-Lokus

Der *enok*-Lokus befindet sich auf Chromosome 2R bei 60-B5. Diese Sequenz wurde zusammengefügt aus den Einzelsequenzen von pDel1, pDel2, pDel5 und pDel6. Dieser Abschnitt repräsentiert die genomische DNS-Sequenz aus dem *Drosophila* Wildtypstamm Canton, mit dem die genomische DNS-Bibliothek hergestellt wurde. Daher zeigen sich beim Vergleich dieser genomischen Sequenz mit der cDNS-Sequenz (siehe 7.2), die aus einem Oregon-Stamm hervorging, einige Polymorphismen. Die Sequenz nach der HindIII-Stelle (Position 9810) stammt aus der BDGP-Datenbank. Die Restriktionsstellen für HindIII (rot), EcoRI (blau), XbaI (grün) und Sall (violett) sind markiert. Die fünf Exons des *enok*-Gens sind unterstrichen. Start- und Stopcodons sind durch einen grauen Kasten hervorgehoben. In der offiziellen Zählung entspricht Position 1 in dieser Sequenz der Genom-Nukleotidposition 19021768 (nach BDGP / Celera / flybase Release 2 vom 10. Juli 2001).

```

1  AAGCTTTCGC ACTATGTGCA CGAAGGTTTG GCTGTGGGGT AATTCAGGTT TTAAGTACTC
61  GATAGCACAT CTGGTTTGTA CTAAGCATAG TTACATAGTT TGAGGAAATC AGAGACGCCC
121 TTCTCCCTGC GCAGGGAGGA GTTGCTGCAC TCGTCATAGA GAACGATGAA GGTGTCCAGC
181 AGATAGTCCA ACGAAAAC TG ATGTCCTTCC GTGTCTCGC CGAACTCGGC CGCCCATTTT
241 TGATCGCTTG TGGTGTGCT TAGAATACAT TTCAGAAATG TGAGCCTTTT CTTCGAGCTT
301 CCTGTGGTTA TATCTGCAAC GTAGAATTTG GTGCGTGAGT CACTAAAAGA TATAACCACT
361 TTTGATGCTC GAATAGTTAC GTATTAAATA ATATATCGTT AAAAGTATTT GATGAGTAGG
421 TACTTTTTTT TAAC TCAACG CTTAGATATT TAAAGTGCTG TGAAACCTA ATACGTAAGT
481 ATCCTTGCA TCATTAATA ACACATATGT ATGTAAGCTG ATAAAACTC GGAGACTGTC
541 CTCCTTTGGC CAAGAGCGC AGCAATTGTT GTATTACCC AAAAAGCCGA CCAACACATG
601 CATCGCAAAC ATTTGCCAGC CCGCAACAAT GCCGCACCA CTGACGTCGC AGACACCTGG
661 CTCCTTCAA TTCAGAAATG CGGCTCGGG GGCAGAAATC AGCTCAAACG GGTGGGTTAT
721 GGCTGTGGCT ATGGCTATGG AAAACCAAGA TGAAACGTGG GGAAGGTAG ACCGGAGAAC
781 AATGGGCGCA AGCAGAAGGC CGTACTCCTA ATGGATTCCG CTATATTTCC AAGCATGCAC
841 AGCTTTCCCA TATTTCCGC ATTCTCTAT TGGCCACCAC TATTTACGAT TCATATTCGG
901 GCCATTTCCA TTTTCAAAC ATGTATGCGG GACATGCATG TGTGTTGGAC CGACCCCCG
961 TACAGGAGGA TATATTAGGT ATGGAGCCGT ACCCTACGCT CAGCATGCCA AATACACCCG
1021 AATCTCGCCT ATATGGCTGG TTCTCCGCA CAGATATAAA TAAATAATTG TTTATATGCG
1081 TGTATGTATG TATGGTTGGC AGAATGCGAA ACAACAAATG CTCAATTGGG AAACAAGCAC
1141 GGCCTCAAAC TGCCGATTTT GGTGTCAGCG AACCGCGCGT ATTACCACTG ATTTCGGAAG

```

1201 ATTCGTATTC CATCTTAGTT ATTGCTCCGT CTGGCCTAAA CCATATTTAT CCGAAATAGT  
1261 GCAAAAAGAA AAGCCGAAC TTTGTGCAAT TGTAGTGTTC CGTTTCGTTG GGAAAACAGA  
1321 GTGGCCCTAT AGACTTTTAA AATAAGCCTA TAAATACCAC AATTTTCATC GGTATTTTGG  
1381 CTTTTTTAAG AGCGGTCACA CCGCCTTTAT CAGCTGATAT TATTACAAGA AATATAATAA  
1441 ATATTTTATA TATTTTTTAT ATATTTTATA TATATATAAT ATATTATATA TAATATATAT  
1501 AATATAATAA TATAATATAA TATTATTTTA TATAATATAT ATTTATATAT ATTATGATTA  
1561 CAAACATATA TAGAAGATCC AAAATACAGG CTGCTTGCTC AGCGGCATTA AAAGATATAT  
1621 TCTCAGCTAT TTAATCTAAG ATAATGATAA ATATCTTGTT AGCTGGTAAA TAGTTATTTAA  
1681 GTCTCTGAGA ATTATATTCT AAGATAAATT GATATAAAGA TTTAAAGAGA TTAAGATATA  
1741 AAGATATAAA GATGTTTTCT TCTATCTAAA AACATATAAT TTAACGTGGC CCTCTTCGTG  
1801 TTCCATTCCA TCACTCCAAA TCGCAGCCG CCGTATTTAA CCGCGTTTTT GTTATGGCGT  
1861 AGTGACATA GGCCTTCAAT AAAGCCTTCT AATACTCAGT AGCGATCAA CTTCATTGCA  
1921 AAATTAATAT TTGTTATTGT TTTCGCGATA CTAAATGCCT TCCGATGCGT TCTTCACCAA  
1981 AAGTGTAACG CGGAGCTGAG ATAAATTCGC GCATCGCATT AAAATTGCGC TTACTTTCAC  
2041 CGCACTCGAA TTGATAACG TATGTACATA CGAGCGTACT GGCTCGCATA TGTATCTGGA  
2101 TATGTGTGTA TGCAGCAGAT AGTTTCTGTA AAGTGGATAC GTACATAAAA TGGGATAGTT  
2161 GTGCGGAAAC GGCTCGAACT ACTCGAATTA CCGTCGCAA ATGTTTATCT TTGTGGCGTT  
2221 TCGAATTTTCG AATGGATGTA CTAAAAGGCC GGGGACTACT CATTTTACAA GTGCAAATAG  
2281 CCCATTGGTT TCGCTCGACT TCTTATAATC CAATCGAATT ATAAGCTCGT ATGTTTTTAC  
2341 AATATACCTA TAACAAATAC ATAGTTTCTT AAAGGCTGCT TCCTTGAGAT GCACCCATA  
2401 TCAAGCAGAT AAAGTACCTT TATATGTGTA TCTTGAAATA GAGTGCCTAT TGACTIONAA  
2461 AAAAGTTGAA CTATCTTACA TGAAAACAGA TTTACAGATT GAGAAAGGCC AGGCCGAGTT  
2521 TTCTATAGTG CAGCTACTAA CCTAATGTTT AATGCGTTTC AGTAAGCCAT GATGAGGGAA  
2581 TCGCGCATG ATATCAACAT GGACACCTGG AATCAGTGGT TCCTCGAGGC CATATCGAAG  
2641 ATCAGGTTCC AGAAGCAGAG GCCCTCCGTG CAGAGGATTT GCCAGGCGAT CCGCACACAC  
2701 CACAAGTTCC ACGAGGACAT TGTGGCAGAG AAGCTGGAAA AAGCTGTCTGA GTCGGGAGCC  
2761 GTCATCAAGG TCTACAACAA GGGACTGCAC TCCTACAAGG CACCAATGGC CAAGCGTCCG  
2821 GTCAAGGTGG ACAAGAACAC TAATCTGTAC AAATTGGTGG CCAAGGCGGT CCACGACCTG  
2881 GGCGAATGCG AGGGATCTAC CATCAAGAGC ATTGAGAACT ACATTAGAA GTTCAACTGT  
2941 ATCGACTTGT CGCCAATGT GGAATCAAG GCGGTCATTA AGGCTTCGAT CAAGAAGGCC  
3001 GTGGATGCCG GCTTTCTGAT CCAGGAGGGG AAGCTATATA AAAAGGGCAA ATCCTTGACA  
3061 ACCCACGGA AATGCGCACC CGTCTCGGAG GTGGTCATAA AGGGCGAGGA GTCCTGCACC  
3121 CACTGCTCGG GAAATTCGCA GAAGAACCCT AACCGAATCC CAGAGCCCTT GAGCTCTGCG  
3181 AAGCAGTGTG GGATCTCTT GCACACCACC TCGCCTAATA TCGCCGGCAG GTGCAAGTCC  
3241 CAATCTACG TGCTGCTCTA CATGCTCGTC ACCAAGGGCA CTATCTGGGA TTGCCAGAAC  
3301 TGCGCGGACT GCGCCGTTT CAAAATGAGA AATCGGGGCC CGTGCTTACT GCAGTGCTTC  
3361 GTGTGTAAGG ACCACTTTCA CTAAACGTGT CTTGATACGA TTCCAGACAA AAAGCCGAAG  
3421 CATCCATACA GGTGAGTCTG TGTAATTTG CCAGCTCAAC TTGACTTTAC CGTCTTTATA  
3481 CCCATTAG GTGTAAGACA TGCTCCAAGC AAGGCTTTGA TACTCCGAAG TTGGTTAAGA  
3541 AAGACAATTC AAGAATTTAA ATGGAAGCTG AGAGGTAATC TTAATACAT TTAACCTTAA  
3601 CTATTTATAT TGAAAGGAAA AACTATTATT TTAGAATGAC CCCCTCGTAT AAATATGCCT  
3661 CCAATAAGCG CCAATCCATC AAAAAGGATG GCAACATCGA GAGTCCTTCG ACCTCGAAAC  
3721 TTTGTGTCTA CAACGACGGC AACGGCCAGA GAAGGAAAGT GCCCGCCAGC TTAAGCTCTA  
3781 GAAAAATGAA CCACAGTCTG GACCAGTTCG AGTTCCCCAG CAAGCAAAAAG AGGTCGCAAA  
3841 TATTACAGGG AGGCTACTTG GCTAGCCAGG AAACGCGCAA GCGAACCTTT TCGGATCTGT



3901 CCTCCACGAG TTCGTCCAGC GAGAGTGAAG ACGAAGACGA TGAGGACGAC GACAGGAACA  
3961 GGAATGGCGA TGACAACGAC CAAGACGAGA GCACGTCGTC GGATTTCGTGC ACATCATCCA  
4021 GCTCAGATTC TGA CTCCAGC GAGAGT TCAA GCGACACCTC CGAATGGGAT GACGAATACG  
4081 ACGAGGAAGA AGACTACGAC ACAGATCGCA GCACGATAAG GGAGAAAAAT GTCTTTGAGA  
4141 GTGGCAAGCA GAGCTGCGCT AAACCTAGTA CTGGCGATGG CCTAGGCTCC CCGCAAAAACA  
4201 ATGAATTGGG TAGCGAGAAT TGGGGGTTTG CTGCCGTGGC AAAAAACCCC ATCGATATAT  
4261 TTGTGAAATC GAAACATAAT AGCAATGTCA AAGGAATTGG T TACTCCAAG CCAGCAGCAA  
4321 GCACGTTTGC CACGTCCCCC GCAGCCAATC GAGTGCAAAA GAGCACTCCA GTAGCTTCGT  
4381 CTACTCCCGA AAAAACTCT GCACCGATTG GCGGCATGAC AATTAAGCGT CAGACTGCCA  
4441 ATGGGCAGAA GAAAAAGATT GTTCCCTTGA AGAGCATGCC CCTCGAAGCG GGCAAGTCGT  
4501 ACGAAAAATG CGAGGACGAC ATTCGGTATC TAACAGAGGA GACTGTTATG AAAGTTCAAC  
4561 TGCTAGAGGA GATAGAACGC AGCAGAGAGA CCCACAGCCA AGCTGATGGA AAGCGGGAAA  
4621 TGAACAACGA CGAGGATGCG CCTGGGGAAA GTACAAAAGCG GGCCAATCCC TTTGAGAACC  
4681 AGCCCCCTCC GCCTGGTGTG ACCGCCACGG ATGTGGAATT GTATCAAGAG GTGCTCCATA  
4741 AGGCCGTCGT TCAAATGTCC AATAATCATA TAGAGAAGGT GAACGACGTA AGCCTGAAAT  
4801 CCGGACAGAA CACCCAGAGT CCAAAGTCGA TTCAAATTGG AAAGTGGGAC ATTGAAACCT  
4861 GGTACTCCAG CCCCTTCCG CAGGAGTACG CCAGGCTGCT GAAACTGTTT TTGTGCGAGT  
4921 TCTGCCTCAA GTACACAAAG AGTCGTTCTG TGCTGGACAG GCATCAGAAC AAATGCATTT  
4981 GGAAGCAGCC GCCAGGCACT GAAATATTCA GGCAGGGAAA CATATCGGTG TTCGAGGTGG  
5041 ATGGCAATGT CAACAAGATT TATTGCCAGA ACCTGTGCCT GCTGGCCAAG TTCTTTCTCG  
5101 ACCACAAAAC ACTCTACTAC GACGTAGAAC CCTTCTGTT CTATATTCTC ACTAAGAATG  
5161 ATCAAAGCGG GTGCCATTG GTTGGCTACT TCTCAAAGGA GAAGCACTGC ACCCAAAAGT  
5221 ACAATGTGTC CTGCATCTG ACGATGCCG AGTACCAGAG GCAAGGCTAC GGTGCTTCC  
5281 TGATCGACTT CAGCTACCTA TTGAGCCGAG AGGAGGGACA GCTGGGCACT CCGGAGAAGC  
5341 CTCTCTCCGA TCTGGGACGA CTTTCTACT TTTCTACTG GAAATCAGTC GTGTTGGAGT  
5401 ATTTGTACAA GCATCGCAAC TACACAAAGA TCACCTCAA GGACATCGCC ATTA AAAACAG  
5461 GTCTGGCTAT TTCCGACATC GCCCTGGCCT TCGAGTTATT GAACTTCATC **AAGCTT**AGAA  
5521 AGAACGACGG CGACATTAGG TATCAGATTA ATGTGAAAAT TGAGTGGAAA AAGGTTTTGG  
5581 CCCACCATAA CAAAATGGCG AATAGCAAGA CGCGAATAAT CATTGAACCC GACTGCTTGA  
5641 GGTGGAGTCC GTTGCTGTCG GTGTCGAAAT TACCCAACAT AATCAAGCCC ATTTCTAATC  
5701 GTGAATATTT GAGCAACCAA ATGGAGACAA ATTCTAGTTT CAAGGAAATT AATGAAGACA  
5761 AAATCAGCGT AAAGCAGGGT GTTCCACGT CCTCAAAGGT GAATCAGGAG TCTTCCGAGT  
5821 TGTCTACCAA GAATCGGGGA CCCAGCTCGG AAAAGTTAAT TGACGAAAGG GAAAACCAGC  
5881 GAAAACGTGC ATATCCGAG GAGTTCCTAA AGTCAGCGTC TAATGAGGCA AAGAAACCCA  
5941 AGTTGACTGC ACCTCAGCCG AACCTCGAGG ATCAGTCTTT CGGTGAGCTC TCCGACTCAT  
6001 CGGATTGCAA ATCTTCTAAA GATCTTTCGG AACAGTTGAC CAAAAGAGCT CAAAGGTTGG  
6061 CCAAACGCAA CGACCTCATC CCCCACACCA ACAAAGGAA GCATTTTCGAC CGGCCCTTG  
6121 AGAACAATAC TACTTCAACC GACCATAATC CGCCAGCTCA AAGTCAAGCG GATACTGCGG  
6181 GCACCGAAAA TGGCCACAAG TCGGAAGAAA CGGCTGCCAA GGAGAACTGC AAAAAATGTTG  
6241 TGGAAAAGGA GCAT**GTCGAC** AAGCCAGTCA ACATTATGCC CAAACTGCGG GGTAAGCAGT  
6301 CCAATGGTAA GCGTTCGAG GAGCCTCAGT TCAATGAAAA TCCTACATCA GACCCAGTCC  
6361 CAGTTGCCTC GCTGAGTCCA GCCAAGGAAA TAACTAGGGA GCCGGTTAAA GTGGCAAAAA  
6421 CGGAGAGTCC TGGCAAAAAC CAGGAGTCGG CCAAGCACGA TGCTGAACCC AATAGCGTCA  
6481 GCGATCAAGT GCTTGATGCA GTGGCCAAGA AGACGAAAAA GACGTTGTTC TCTGATGTAG  
6541 CATCGTACAA CACTGAGGAT GTAAAATATA ATTCAGAGGA AAAGCCAATG GCAATCGCGC

6601 AAGAGCCAAA AGAAAGTCCC ACGGAGGCTG GCATAAAGGA GACCAAGCCG CTTGAAGTTC  
6661 CTGAGCAGAA GGCCAAAGCA AAGAGTCCCG AGAAGCCGGC AACCGTTGCG GAGACAGTAT  
6721 TGCAGCACGT ACATGCTCCT GTGAATACGG AAAAGATCTC CACGGAAGAA AGTAAACTGG  
6781 AGTTGGATGT GCACTACTTA **AAGCTT**TTCGC CGGACTCCGC GCTCAATCCA CCAGTGGCCT  
6841 CAGTGCAGAA ACCAGTGCC GAGCCTCCAG CTCCGAAGGA GAAAGCTAAA GACCTCCAGG  
6901 CCGCTCAGCC AAGCGAAGCC TTGCAGAAGC AACCAGAAAT AGAGATGGTC AAAAAAACC  
6961 AAACCAAAAC CGAAACCCCT GTATCTAATC CGCCATCAA CCGTACTGAT GTTTCCTCTC  
7021 TCGTCGAGCA ACCAGTTAAG GCTGCGCCAG AAAAAGTGGA GCAGCCTATG GTCAAAGAAG  
7081 **CTGTCGACAT** CAAAGATAAG GCACTCAAAA AACCTGTGCC AGATGTGCCT GTCGTAAGC  
7141 CAGAGGCTAC TAGCTGCGAA AAGAAAATCG ATCACAGCAA GACGAAAGTG TTTCACGAAA  
7201 AGGAAGCCAT CAAAACCGAT CAACAAC TAGCAGGTTAA GGAGGAGGAA AAGTCAAATG  
7261 CGAGAGCGCC ATCGGCACCC ATTCCCATT CCGGACAAGAT CCAACTAAAG GGTAACGAAC  
7321 ACGCCCAGTT GCAGAACTCC ATTCCCTCCC AGTTCCCACT GAATCAGATG CCGAACTATC  
7381 ACACTTCGCA GTACTGGCAG TGGGAATACT ATGGCTACAA TCTCTCTCAC CTGGACGCAT  
7441 CGCAGAAGGG ACAGAAGCAG TTCCACAAGG ACCTGGCCAC GACAATGGCG TACACGCACA  
7501 ACTTTACGCA AAACCTTTAT CAGTCCGCCA ATCTGGCCAT GCAGCACGCC CATCACCAGA  
7561 TGCACCAGAC CAAGGAGAAG CACAAGGTGG AGCGCAAGAA CAGCGGCAAG AAGGAGGAGC  
7621 AGAACAAGGT GGTGTCCAGT GTCAATGTGG TCAGCACGGC TCGCGAGGAT GCCCATGTGC  
7681 AGCATTGCAA CGAGTACGCG GCCAACAACC AGGCGGCCCT GTACAACCAG AAATGCGCAA  
7741 GTCAGCAGAA GCAGGCGCAA CAAATGAAGT CTCTGGCCAA TGTCCAGAAC CCAGTGCACC  
7801 GGCAGAGCAA CTCCAACGCG CCAGAGTCGA CGGTTCTTAT GCCTAATCCA GTGATTTCCC  
7861 AGGCGGGATC TGTGCCGCC AAGCAAAAAG TCGAACCGG AGTCAACTCG ACATCGGTCA  
7921 TTTCGCGCGA GGGGAAGCTC AACAAGATTG GGCATTCTAA CATTACGCC ACCGCCCAGC  
7981 ACGTAATCT TCAAGTGGGA GCGGCCAGT CCGACGTCAA CCCGAACATG GTTTACAACA  
8041 CGGAGTCCTC **GGCGAATTCG** GCCATGCAGC ACTACGATTG CGGAATCAGT GCCCAGATTA  
8101 ACATGGACTC GCCGGCCAAC ATTGATCCG CCATCGCGCA CGGTCTCAG GAGATCTCAG  
8161 CCACGTCCAA TGTGCACATG CATCAGCCG ACAGGCAGTT CTCTGACTGC TCCATGCAGA  
8221 ACCAGCCGGT AACGACGCC ATGCACATGT CCATCCAAA CTCCACATG CAGCAGCAGA  
8281 ACAACCTGAA TTTGAATCTG GCGCCAGAAG GCTCGTCAA TATTAACCTC TTAAGTAATC  
8341 CACAGACCA GCACCAGAGC AGGAAACTCA ATGCCAGGT AATGCATTCC ACTTTGTTTT  
8401 TGCCGTGTGTC TCGTATTAAT TTCTATATAC TTCACTCTAC AGGCGGACAT TGCAGTTAGC  
8461 TCACCGACAC CTTGCACAG AGCCACGACG CCCAAGCAA TTCGGAGCG AAATACCCAG  
8521 CAACGCGACG CTAAGAACGC GCGCCACCC ACAACCACAA CAAATACTCA TCATCAGATT  
8581 CCCCAGGGCG GAGCAGCGC AAATATTTCC AAGTCGCATC ACGACTCCTT GCACAACCTG  
8641 CAGTTCTCGC AGCACGGACA CCAGCAGAAC ATGCAGCCCA TCGACTACGT GCCCATCCCC  
8701 CAAATCAGTC AGAACTTCTC GCGAATCCC TCGAACTATG ACATCGTGGG CATGCCGGCG  
8761 GTGATCCAGC AGCGGATGTC ACTGAACGGA TCGGTGCACT CGCTGGCCAA TTCGCACCAG  
8821 CGCATCGAGC AGCCATCGTC AGCGTGTGCC GTCAATAACT TTTACTTGCA AAACAACATG  
8881 CCGGCAGCTG AGAACGCGCC TCGTGTGCCG GTCTCCAGTT CTCTGGGCGG TCCGCCGACG  
8941 GCGGTAACA ATGATCAGCG GCAGGCAGGT CAGGACTCGA TAACCACGGC GAATAGTAGT  
9001 GGCGCAACAG CTTGCTGGC GGGCAATCTG TGTAGCCTGT CCAAGCTGCA GCAGCTGACC  
9061 AATTGTCTGG AGAGCCAGCC GTGTAACACG TCACCGGGG CCCAGGTGAA TCTGGCCCCC  
9121 TCTCCGACC ATCCAATTCC GCCCAACTCG ACACCTCCGC CGCACTTGCT CATGCAGAAC  
9181 AGGAACATCT CCACGCCACC CAACATGCTG CAAACGCAGG TAACGCCGCT GCAGTACAAG  
9241 TACTATCCGG GCAACATGAA CATCCCGCCA ATCACGTCGG CGAAAACAC GAGTCGGAAC

9301 ACCCGCAACA CACCCTCCGC CCCGGTGCAG CACACGTCGA CGCCGATGGG CAGCGGTAAC  
 9361 AATAGGACCG CCAATGTCCA CATCAGCCCG AACCTGATGG CCCCATACGG AGCGATCAAC  
 9421 AGCTACCGGA TGTCGCCGCA GCAATCCCCG CCCACTGGAA GCTACAGCTC GGGAGGCGAC  
 9481 TACCCCAACT CGCAGATTCC GATGCAGATG ATGAATATGC AATCTCAGTA CCAGGATGCC  
 9541 TGCGTGCTGC AGCGAGGCAC TCCATCGAAC CCGATGTACC CCACGTATTC CCCCTACTTA  
 9601 CCTCTCAACG GTTCTATTCG CAGATAAATAG ATGCGCACAT TTATATGTT ACTTTATTTAA  
 9661 GTATGCCTGT ACATAAATGT GTGCTGTAAA TAAATATATA TTACGTCAAT TTAACAATCC  
 9721 AATCCCCCAG TTTAAAATGA TTCAGCGTCG TTGGCGAGTC TGTGTTTTAA TACTTTTTCTT  
 9781 TATTGCTTAG ATCTAACATT GTTCAATCAA AGCTTGTTTA TTATTTTCGAA TCTGCTATAA  
 9841 GCTAGACTAA TGTCAATGTG TTCTTAGTTT CCTTCTGGGC ACGGCTGCC TTAACAAAAA  
 9901 GAGACCAATC TTCGAATGTT ATTCGGTATG AGTTTTTCTA TTCGTGGGTT TTATGTTAAA  
 9961 TACACTTGGG TAGAACGATC GATTGCTTAG ACGGTATGTT ACGAGCTATG AATATTTTATT  
 10021 TAGCTTTTGT TTGTTTTTCA GAATGAAAAC TAATAACTTA GCGTAGTTAT GCGTTTTAAAA  
 10081 GGAATTCACT ATGTTAAGAT AATAAATAAA TAGGTGGAAA ATAATGGTAA GGAATAAAGG  
 10141 CCGAGCTCTG TTTGTCCAGT CAAGGTGGCA CCTAAACGAC CTAACGACA AGATAAAATA  
 10201 AAACTTTTCT GATTGCAAG CGGCAGGAAA TGTAATTTA ATAAGTATAG GAAGCATTTA  
 10261 GTGGTTTTAT GATCACGTAT TGTATATGAT CTCATTAATT GTCTAATATA ATTAAGTTTA  
 10321 CTTTTTGGGC GAGGACAGAA CACAAATCAT GGCCATACA AACAACGAAC TTAAATACA  
 10381 TTCAAAAATG TAAGGGAAC AATTAGAAAA CTGCCTTTCG ACCAATCATC TATACAGTAC  
 10441 GTATATGTAC AAACATCGTT ACAAATCAAT TGCAAAGGCA AAGCAATACA ATTATCAATT  
 10501 ACTAATAATC TGAGTATATT TGAGCT 10526

## 7.2 cDNS- und Protein-Sequenz von *enok*

1 AATAAAGCCTTCTAATACTCAGTAGCGATCAAACCTTCATTGCAAAATTAATATTTGTTAT  
 61 TGTTTTTCGCGATACTAAATGCCTTCCGATGCGTTCTTCCACAAAAGTGTAAACGCGGAGCT  
 121 GAGATAAATTCGCGCATCGCATTAAAATTGCGCTTACTTTCACCCGACTCGAATTGATAA  
 181 ACTAAGCCATGATGAGGGAATCGGCGCATGATATCAACATGGACACCTGGAATCAGTGGA  
     1 M M R E S A H D I N M D T W N Q W I 18  
 241 TCCTCGAGGCCATATCAAAGATCAGGTCCCAGAAAGCAGAGGCCCTCCGTGCAGAGGATTT  
     L E A I S K I R S Q K Q R P S V Q R I C 38  
 301 GCCAGGCGATCGGCACACACCACAAGTTCACGAGGACATTGTGGCAGAGAAGCTGGAAA  
     Q A I G T H H K F H E D I V A E K L E K 58  
 361 AAGCTGTTCGAGTCGGGAGCCGTATAAAGGTCTACAACAAGGGACTGCACTCCTACAAGG  
     A V E S G A V I K V Y N K G L H S Y K A 78  
 421 CACCAATGGCCAAGCGTCGCGTCAAGGTGGACAAGAACACTAATCTGTACAAATTGGTGG  
     P M A K R R V K V D K N T N L Y K L V A 98  
 481 CCAAGGCGGTCCACGACCTGGGCGAATGCGAGGGATCTACCATCAAGAGCATTGAGA  
     K A V H D L G E C E G S T I K S I E N Y 118  
 541 ACATTGAGAAGTTCAACTGTATCGACTTGTTCGCCAATGTGGACTTCAAGGCGGTCATTA  
     I Q K F N C I D L S P N V D F K A V I K 138  
 601 AGGCTTCGATCAAGAAGGCCGTGGATGCCGGCTTTCTGATCCAGGAGGGGAAGCTATATA  
     A S I K K A V D A G F L I Q E G K L Y K 158  
 661 AAAAGGGCAAATCCTTGACAACCCACGGAAATGCGCACCCGTCTCGGAGGTGGTCATAA  
     K G K S L T T P R K C A P V S E V V I K 178  
 721 AGGGCGAGGAGTCTGCACCCACTGCTCGGGAAATTCGAGAAGAACCTCAACGGAATCC  
     G E E S C T H C S G N S Q K N L N G I P 198  
 781 CAGAGCCCTTGAGCTCCTGCAAGCAGTGTGGGATCTCATTGCACACCACCTGCGCCAACA  
     E P L S S C K Q C G I S L H T T C A N I 218

841	TCGCCGGCAGGTGCAAGTCGCAATCCTACGTGCTGCTCTACATGCTCGTCACCAAGGGCA A G R C K S Q S Y V L L Y M L V T K G T	238
901	CTATCTGGGATTGCCAGAAGTGC GCGGACTGCGCCGTTTGCAAAATGAGAAATCGGGGCC I W D C Q N C A D C A V C K M R N R G P	258
961	CGTGCTTACTGCAGTGTCTCGTGTGTAAGGACCACCTTTCACCTAACGTGTCTTGATACGA C L L Q C F V C K D H F H L T C L D T I	278
1021	TTCCAGACAAAAGCCGAAGCATCCATACAGGTGTAAGACATGCTCCAAGCAAGGCTTTG P D K K P K H P Y R C K T C S K Q G F D	298
1081	ATACTCCGAAGTTGGTTAAGAAAAGACAATTCAGAATTTAAAATGGAAGCTGAGAGAATGA T P K L V K K D N S R I K M E A E R M T	318
1141	CCCCCTCGTATAAAATGCTTCCAATAAGCGCCAATCCATCAAAAAGGATGGCAACATCG P S Y K Y A S N K R Q S I K K D G N I E	338
1201	AGAGTCCTTCGACCTCGAAACTTTGTGTCTACAACGACGGCAACGGCCAGAGAAGGAAAG S P S T S K L C V Y N D G N G Q R R K V	358
1261	TGCCCGCCAGCTTAAGCTCTAGAAAAATGAACCACAGTGAGGACCAGTTCGAGTTCCCCA P A S L S S R K M N H S E D Q F E F P S	378
1321	GCAAGCAAAAGAGGTGCGAAATATTACAGGGAGGCTACTTGGCTAGCCAGGAAACGCGGA K Q K R S Q I L Q G G Y L A S Q E T R K	398
1381	AGCGAACCTTTTCGGATCTGTCTCCACGAGTTCGTCCAGCGAGAGTGAAGACGAAGACG R T F S D L S S T S S S S E S E D E D D	418
1441	ATGAGGACGACGACAGGAACAGGAATGGCGATGACAACGACCAAGACGAGAGCACGTCTGT E D D D R N R N G D D N D Q D E S T S S	438
1501	CGGATTCGTGCACATCATCCAGCTCAGATTCCTGACTCCAGCGAGAGTTCAGCGACACCT D S C T S S S S D S D S S E S S S D T S	458
1561	CCGAATGGGATGACGAATACGACGAGGAAGAAGACTACGACACAGATCGCAGCACGATAA E W D D E Y D E E D Y D T D R S T I R	478
1621	GGGAGAAAAATGTCTTTGAGAGTGGCAAGCAGAGCTGCGCTAAACTTAGTACTGGCGATG E K N V F E S G K Q S C A K L S T G D G	498
1681	GCCTAGGCTCCCCGCAAAACAATGAATTGGGTAGCGAGAATTGGGGGTTTGTGCCGTGG L G S P Q N N E L G S E N W G F A A V A	518
1741	CAAAAACCCCATCGATATATTTGTGAAATCGAAACATAATAGCAATGTCAAAGGAATTG K N P I D I F V K S K H N S N V K G I G	538
1801	GTTACTCCAAGCCAGCAGCAAGCACGTTTGCCACGTCCCCCGCAGCCAATCGAGTGCAAA Y S K P A A S T F A T S P A A N R V Q K	558
1861	AGAGCACTCCAGTAGCTTCGTCTACTCCCGAAAAAACTCTGCACCGATTGGCGGCATGA S T P V A S S T P E K N S A P I G G M T	578
1921	CAATTAAGCGTCAGACTGCCAATGGGCAGAAGAAAAAGATTGTTCCCTTGAAGAGCATGC I K R Q T A N G Q K K K I V P L K S M P	598
1981	CCCTCGAAGCGGGCAAGTCGTACGAAAAATGCGAGGACGACATTCGGTATCTAACAGAGG L E A G K S Y E K C E D D I P Y L T E E	618
2041	AGACTGTTATGAAAGTTCAACTGCTAGAGGAGATAGAACGCAGCAGAGAGACCCACAGCC T V M K V Q L L E E I E R S R E T H S Q	638
2101	AAGCTGATGGAAGCGGGAAATGAACAACGACGAGGATGCGCCTGGGGAAAAGTACAAAAGC A D G K R E M N N D E D A P G E S T K R	658
2161	GGGCCAATCCCTTTGAGAACCAGCCCCTTCCGCTGGTGTACCGCCACGGATGTGGAAT A N P F E N Q P L P P G V T A T D V E L	678
2221	TGTATCAAGAGGTGCTCCATAAGGCCGTCGTTCAAATGTCCAATAATCATATAGAGAAGG Y Q E V L H K A V V Q M S N N H I E K V	698
2281	TGAACGACGTAAGCCTGAAATCCGGACAGAACCCCAGAGTCCAAAGTCGATTCAAATTG N D V S L K S G Q N T Q S P K S I Q I G	718
2341	GAAAGTGGGACATTGAAACCTGGTACTCCAGCCCCCTTCCGCGAGGAGTACGCCAGGTTGC K W D I E T W Y S S P F P Q E Y A R L L	738
2401	TGAAACTGTTTTTGTGCGAGTTCCTGCCTCAAGTACACAAAGAGTCGTTCTGTGCTGGACA K L F L C E F C L K Y T K S R S V L D R	758
2461	GGCATCAGAACAAATGCATTTGGAAGCAGCCGCCAGGCACTGAAATATTCAGGCAGGGAA H Q N K C I W K Q P P G T E I F R Q G N	778
2521	ACATATCGGTGTTTCGAGGTGGATGGCAATGTCAACAAGATTTATTGCCAGAACCCTGTGCC I S V F E V D G N V N K I Y C Q N L C L	798
2581	TGCTGGCCAAGTTCTTTCTCGACCACAAAACACTCTACTACGACGTAGAACCCTTTCTGT L A K F F L D H K T L Y Y D V E P F L F	818

2641 TCTATATTCTCACTAAGAATGATCAAAGCGGGTGCCATTTGGTTGGCTACTTCTCAAAGG  
Y I L T K N D Q S G C H L V G Y F S K E 838

2701 AGAAGCACTGCACCCAAAAGTACAATGTGTCTGCATCCTGACGATGCCGCGAGTACCAGA  
K H C T Q K Y N V S C I L T M P Q Y Q R 858

2761 GGCAAGGCTACGGTCGCTTCTGATCGACTTACAGCTACCTATTGAGCCGAGAGGAGGGAC  
Q G Y G R F L I D F S Y L L S R E E G Q 878

2821 AGCTGGGCACTCCGGAGAAGCCTCTCTCCGATCTGGGACGTCTTTCCTACTTTTCCTACT  
L G T P E K P L S D L G R L S Y F S Y W 898

2881 GGAAATCAGTCGTGTTGGAGTATTTGTACAAGCATCGCAACTACACAAAGATCACCTTCA  
K S V V L E Y L Y K H R N Y T K I T F K 918

2941 AGGACATCGCCATTA AAAACAGGTCTGGCTATTTCCGACATCGCCCTGGCCTTCGAGTTAT  
D I A I K T G L A I S D I A L A F E L L 938

3001 TGAACTTCATCAAGCTTAGAAAAGACGCGGACATTAGGTATCAGATTAATGTGAAAA  
N F I K L R K N D G D I R Y Q I N V K I 958

3061 TTGAGTGGAAAAAGGTTTTGGCCCACCATAACAAAATGGCGAATAGCAAGACGCGAATAA  
E W K K V L A H H N K M A N S K T R I I 978

3121 TCATTGAACCCGACTGCTTGAGGTGGAGTCCGTTGCTGTGCGGTGTGAAATTACCCAACA  
I E P D C L R W S P L L S V S K L P N I 998

3181 TAATCAAGCCCATTTCCAATCGTGAATATTTGAGCAACCAAATGGAGACAAATTCTAGTT  
I K P I S N R E Y L S N Q M E T N S S F 1018

3241 TCAAGGAAATTAATGAAGACAAAATCGGCGTAAAGCAGGGTGTTCACGTCCTCAAAGG  
K E I N E D K I G V K Q G V S T S S K V 1038

3301 TGAATCAGGAGTCTTCCGAGTTGTCTACCAAGAATCGAGGATCCAGCTCGGAAAAGTTAC  
N Q E S S E L S T K N R G S S S E K L L 1058

3361 TCGACGAAAGGGAAAACAGCGAAAACGTGCATATCCGGAGGAGTTCTTAAAGTCAGCGT  
D E R E N Q R K R A Y P E E F L K S A S 1078

3421 CTAATGAGGCAAAGAACCCAAAGTTGACTGCACCTCAGCCGAACCTTGAGGATCAGTCTT  
N E A K K P K L T A P Q P N L E D Q S F 1098

3481 TCGGTGAGCTCTCCGACTCATCGGATTGCAAATCTTCTAAAGATCTTTCGGAACAGTTGA  
G E L S D S S D C K S S K D L S E Q L T 1118

3541 CCAAAAAGACTCAAAGGTTGGCCAAACGCAACGACCTCATCCCCACACCAACAAAAGAA  
K R A Q R L A K R N D L I P H T N K R K 1138

3601 AGCATTTTCGACCGGCCCTTGAGAACAATACTACTTCAACCGACCATAATCCGCCAGCTC  
H F D R P L E N N T T S T D H N P P A Q 1158

3661 AAAGTCAAGCGGATACTGCGGGCACCGAAAATGGCCTCAAGTCGGAAGAATCGGCTGCCA  
S Q A D T A G T E N G L K S E E S A A K 1178

3721 AGGAGAAGTCAAGAATGTTGTGGAAAAGGAGCATGTGACAAGCCAGTCAACATTATGC  
E N C K N V V E K E H V D K P V N I M P 1198

3781 CCAAAGTGCAGGGTAAGCAGTCCAATGGTAAGCGTTCCGAGGAGCCTCAGTTCAATGAAA  
K L R G K Q S N G K R S E E P Q F N E N 1218

3841 ATCTACATCAGACCCAGTCGAGTTGCCTCGCTGAGTCCAGCCAAGGAAATAACTAGGG  
P T S D P V A V A S L S P A K E I T R E 1238

3901 AGCCGGTTAAAGTGGCAAAAACGGAGAGTCTGGCAAAAACAGGAGTCGGCCAAGCACG  
P V K V A K T E S P G K N Q E S A K H D 1258

3961 ATGCTGAACCCAATAGCGTCAGCGATCAAGTGCTTGATGCAGTGGCCAAGAAGACGAAAA  
A E P N S V S D Q V L D A V A K K T K K 1278

4021 AGACGTTGTTCTCTGATGTAGCATCGTACAACACTGAGGATGTAAAATATAATTCAGAGG  
T L F S D V A S Y N T E D V K Y N S E E 1298

4081 AAAAGCCAATGGCAATCGCGCAAGAGCCAAAAGAAAGTCCCACGGAGGCTGGCATAAAGG  
K P M A I A Q E P K E S P T E A G I K E 1318

4141 AGACCAAGCCGCTTGAAGTTCTGAGCAGAAGGCCAAAAGCAAAGAGTCCCAGAAAGCCGG  
T K P L E V P E Q K A K A K S P E K P A 1338

4201 CAACCGTTGCGGAGACAGTATTGCAGCACGTACATGCTCCTGTGAATACGGAAAAGATCT  
T V A E T V L Q H V H A P V N T E K I S 1358

4261 CCACGGAAGAAAGTAAACTGGAGTTGGATGTGCACTACTTAAAGCTTTCGCCGGACTCCG  
T E E S K L E L D V H Y L K L S P D S A 1378

4321 CGCTCAATCCACCAGTGGCCTCAGTGCAGAAACAGTGCCCGAGCCTCCAGCTCCGAAGG  
L N P P V A S V Q K P V P E P P A P K E 1398

4381 AGAAAGCTAAAGACCTCCAGGCCGCTCAGCCAAGCGAAGCCTTGAGAAGCAACCAGAAA  
K A K D L Q A A Q P S E A L Q K Q P E I 1418

4441 TAGAGATGGTCAAAAAACCGAAACCAAACCGAAACCCCTGTATCTAATCCGCCATCAA  
E M V K K T E T K T E T P V S N P P S N 1438

4501 ACCGTACTGATGTTTCCCTCTCTCGTTCGAGCAACCAGTTAAGGCTGCGCCAGAAAAAGTGG  
R T D V S S L V E Q P V K A A P E K V E 1458

4561 AGCAGCCTATGGTCAAAGAAGCTGTTCGACATCAAAGATAAGGCACTCAAAAAACCTGTGC  
Q P M V K E A V D I K D K A L K K P V P 1478

4621 CAGATGTGCCTGTTCGTAAGCCAGAGGCTACTAGCTGCGAAAAGAAAATCGATCACAGCA  
D V P V V K P E A T S C E K K I D H S K 1498

4681 AGACGAAAGTGTTCACGAAAAGGAAGCCATCAAACCGATCAACAACCTAGTGCAGGTTA  
T K V F H E K E A I K T D Q Q L V Q V K 1518

4741 AGGAGGAGGAAAAGTCAAATGCGAGAGCGCCATCGGCACCCATTCCCATTCCGGACAAGA  
E E E K S N A R A P S A P I P I R D K I 1538

4801 TCCAACATAAGGGTAACGAACACGCCAGTTGCAGAACTCCATTCCCTCCCAGTTCCCAC  
Q L K G N E H A Q L Q N S I P S Q F P L 1558

4861 TGAATCAGATGCCGAACATCACACTTCGCAGTACTGGCAGTGGGAATACTATGGCTACA  
N Q M P N Y H T S Q Y W Q W E Y Y G Y N 1578

4921 ATCTCTCTCACCTGGACGCATCGCAGAAGGGACAGAAGCAGTTCACAAAGGACCTGGCCA  
L S H L D A S Q K G Q K Q F H K D L A T 1598

4981 CGACAATGGCGTACACGCACAACCTTACGCAAAACCTTTATCAGTCCGCCAATCTGGCCA  
T M A Y T H N F T Q N L Y Q S A N L A M 1618

5041 TGCAGCACGCCATCACCAGATGCACCAGACCAAGGAGAAGCACAAGGTGGAGCGCAAGA  
Q H A H H Q M H Q T K E K H K V E R K N 1638

5101 ACAGCGGAAGAAGGAGGAGCAGAACAAGGTGGTGTCCAGTGTCAATGTGGTCAGCACGG  
S G K K E E Q N K V V S S V N V V S T A 1658

5161 CTCGCGAGGATGCCCATGTGCAGCATTGCAACGAGTACGCGGCCAACCAACCAGGCGGCT  
R E D A H V Q H C N E Y A A N N Q A A L 1678

5221 TGTACAACCAGAAATGCGCAAGTCAGCAGAAGCAGGCGCAACAAATGAAGTCTCTGGCCA  
Y N Q K C A S Q Q K Q A Q Q M K S L A N 1698

5281 ATGTCCAGAACCAGTGCCTCCGCGAGCAACTCCAACGCGCCAGAGTCGACGGTTCTTA  
V Q N P V P R Q S N S N A P E S T V L M 1718

5341 TGCCTAATCCAGTGATTTCCAGGCGGGATCTGTGCCGGCCAAGCAAAAAGTCGAACACG  
P N P V I S Q A G S V P A K Q K V E H G 1738

5401 GAGTCAACTCGACATCGGTCAATTCGCGCGAGGGAAAGCTCAACAAGATTGGGCATTCTA  
V N S T S V I S R E G K L N K I G H S N 1758

5461 ACATTACGCCACCGCCAGCAGCTAATCTTCAAGTGGGAGGCGGCCAGTCCGACGTCA  
I H A T A Q H A N L Q V G G G Q S D V N 1778

5521 ACCCGAACATGGTTTACAACACGGAGTCTCGGCCAATTCGGCCATGCAGCACTACGATT  
P N M V Y N T E S S A N S A M Q H Y D C 1798

5581 GCGGAATCAGTGCCAGATTAACATGGACTCGCCGGCCAACATTGGATCCGCCATCGCGC  
G I S A Q I N M D S P A N I G S A I A H 1818

5641 ACGGTCCTCAGGAGATCTCAGCCACGTCCAATGTGCACATGCATCAGCCGCACAGGCAGT  
G P Q E I S A T S N V H M H Q P H R Q F 1838

5701 TCTCTGACTGCTCCATGCAGAACCAGCCGGTAACGACGCCCATGCACATGTCCATCCAAA  
S D C S M Q N Q P V T T P M H M S I Q N 1858

5761 ACTCCACATGCAGCAGCAGAACAACCTTGAATTTGAATCTGGCGCCAGAAGGCTCGTCAA  
S H M Q Q Q N N L N L N L A P E G S S N 1878

5821 ATATTAACCTCTTAAGTAATCCACAGCACCAGCACCAGAGCAGGAAACTCAATGCCCAGG  
I N L L S N P Q H Q H Q S R K L N A Q A 1898

5881 CGGACATTGCAGTTAGCTCACCGACACCTTCGCACAGAGCCACGACGCCCAAGCAAATTC  
D I A V S S P T P S H R A T T P K Q I R 1918

5941 GGAGCGGAAATACCCAGCAACGCGACGCTAAGAACGCGGCCACCCACAACCACAACAA  
S G N T Q Q R D A K N A A P P T T T N 1938

6001 ATACTCATCATCAGATTCCCCAGGGCGGAGCAGCGGCAAATATTTCCAAGTCGCATCACG  
T H H Q I P Q G G A A A N I S K S H H D 1958

6061 ACTCCTTGACAACCTGCAGTTCCTCGCAGCAGGACACCAGCAGAACATGCAGCCCATCG  
S L H N L Q F S Q H G H Q Q N M Q P I D 1978

6121 ACTACGTGCCCATCCCCAAATCAGTCAGAACTTCTCGGCGAATCCCTCGAATATGACA  
Y V P I P Q I S Q N F S A N P S N Y D I 1998

6181 TCGTGGGCATGCCGGCGGTGATCCAGCAGCGGATGTCACTGAACGGATCGGTGCACTCGC  
V G M P A V I Q Q R M S L N G S V H S L 2018

6241 TGGCCAATTTCGACCCAGCGCATCGAGCAGCCATCGTCCAGCGTGTGCCGTCAATAACTTTT  
 A N S H Q R I E Q P S S A C A V N N F Y 2038  
 6301 ACTTGCAAAACAACATGCCGGCAGCTGAGAACCGCCTCGTGTGCCGGTCTCCAGTTCTC  
 L Q N N M P A A E N A P R V P V S S S L 2058  
 6361 TGGGCGGTCCGCCGACGGCGGGTAACAATGATCAGCGGCAGGCAGGTCAGGACTCGATAA  
 G G P P T A G N N D Q R Q A G Q D S I T 2078  
 6421 CCACGGCGAATAGTAGTGGCGCAACAGCTTCGCTGGCGGGCAATCTGTGTAGCCTGTCCA  
 T A N S S G A T A S L A G N L C S L S K 2098  
 6481 AGCTGCAGCAGCTGACCAATTGTCTGGAGAGCCAGCCGTGTAACACGTACCCGGGGGCC  
 L Q Q L T N C L E S Q P C N T S P G A Q 2118  
 6541 AGGTGAATCTGGCCCCCTCTCCGCACCATCCAATTCCGCCCAACTCGACACCTCCGCCGC  
 V N L A P S P H H P I P P N S T P P P H 2138  
 6601 ACTTGCTCATGCAGAACAGAAACATCTCCACGCCACCCAACATGCTGCAAACGCAGGTAA  
 L L M Q N R N I S T P P N M L Q T Q V T 2158  
 6661 CGCCGCTGCAGTACAAGTACTATCCGGGCAACATGAACATCCCGCCAATCACGTCGGCGC  
 P L Q Y K Y Y P G N M N I P P I T S A Q 2178  
 6721 AAAACACGAGTCGGAACACCCGCAACACACCCTCCGCCCGGTGCAGCACACGTCGACGC  
 N T S R N T R N T P S A P V Q H T S T P 2198  
 6781 CGATGGGCAGCGGTAACAATAGGACCGCCAATGTCCACATCAGCCCGAACCTGATGGCCC  
 M G S G N N R T A N V H I S P N L M A P 2218  
 6841 CATA CGGAGCGATCAACAGCTACCGGATGTCCGCCAGCAATCCCGCCCACTGGAAGCT  
 Y G A I N S Y R M S P Q Q S P P T G S Y 2238  
 6901 ACAGCTCGGGAGGCGACTACCCCAACTCGCAGATTCCGATGCAGATGATGAATATGCAAT  
 S S G G D Y P N S Q I P M Q M M N M Q S 2258  
 6961 CTCAGTACCAGGATGCCTGCGTGTGCAGCGAGGCACTCCATCGAACCCGATGTACCCCA  
 Q Y Q D A C V L Q R G T P S N P M Y P T 2278  
 7021 CGTATCCCCCTACTTACCTCTCAACGGTTCTATTTCGAGATAATAGATGCGCACATTTT  
 Y S P Y L P L N G S I R R \* 2291  
 7081 ATATGTTACTTTATTAAGTATGCCGTGTACATAAATGTGTGCTGTAAATAAATATATATTA  
 7141 CGTCAATTTAACAATCCAA 7159

### 7.3 Primer-Sequenzen

Name	Sequenz(5' → 3')	T <sub>m</sub> (°C)
ACS7	CCCAGAACCCGGCACGGAAC	65,5
ACS21	CTACAACAACGTGTGTATGGCG	60,3
Act5+	CGTCTTCCCATCGATTGTG	56,7
Act7-	GATGCCAGGGTACATGGTG	58,8
CG7459F	GATGACAGCACCAGCACG	58,2
CG7459R	CAGACCCAGTCCCAGGATC	61,0
CG8628F	GGAAGCCACTGAACTCGC	58,2
CG8628R	GGGGGCGTACTTCTCGTAC	61,0
CG10918F	CGGTGGTCCTGGTGGTAC	60,5
CG10918R	CCCGAACCCAGTAGTGCTCTC	61,4
CG14935F	GGGAGGAAACGGTGGATC	58,2
CG14935R	CTAGACCAGCCGACAGACG	61,0
Del1983+	GTGTAACGCGGAGCTGAG	58,2
Del2782-	CCTTGTGTAGACCTTGATG	55,3
Del2664+	CTCCGTGCAGAGGATTTG	56,0

Del3530-	CTTCGGAGTATCAAAGCC	53,7
Del3389+	GTCTTGATACGATTCCAGAC	55,3
Del4184-	CTAGGCCATCGCCAGTAC	58,2
Del4067+	GATGACGAATACGACGAG	53,7
Del4860-	CAGGTTTCAATGTCCCAC	53,7
Del4703+	GCCACGGATGTGGAATTG	56,0
Del5481-	GCGATGTCGAAATAGCC	56,0
Del5109+	CACTCTACTACGACGTAG	53,7
Del5814-	GAAGACTCCTGATTCCACC	53,7
Del5710+	GAGCAACCAAATGGAGAC	53,7
Del6259-	GTCGACATGCTCCTTTTC	53,7
Del6153+	CAGCTCAAAGTCAAGCGG	56,0
Del6793-	GTGCACATCCAACCTCCAG	56,0
Del6536+	GTAGCATCGTACAACACTG	54,5
Del7301-	GGATCTTGTCCCGAATGG	56,0
Del7169+	GATCACAGCAAGACGAAAG	54,5
Del7918-	GACCGATGTCGAGTTGAC	56,0
Del7772+	CTGGCCAATGTCCAGAAC	56,0
Del8469-	GTGTCCGGTGAGCTAACTG	56,0
Del8238+	CCATGCACATGTCCATCC	56,0
Del9038-	CAGGCTACACAGATTGCC	56,0
Del8944+	GTAACAATGATCAGCGGC	53,7
Del9685-	CAGCACACATTTATGTACAGG	55,9
GEX-forward1	TexasRed-CTGGCAAGCCACGTTTGGTG	61,4
GK1+	GATGGAATACGAATCTTC	49,1
GK3-	GCGCTTATCGAGCAGTAC	56,0
Lip2+	GACGATGGCTACCCGATG	58,2
Lip4-	GCCTCCAATCAGGAAGATC	56,7
Phas1F	GATGTCCGCTTCACCCAC	58,2
Phas1R	CTGCATGGCGGTGTACAC	58,2
QE-forward1	TexasRed-CGGATAACAATTTACACAG	53,2