

**Untersuchungen zur biologischen Funktion  
der kleinen GTPase Centaurin gamma in  
*Drosophila melanogaster***

**Dissertation**

zur

Erlangung des Doktorgrades (Dr. rer. nat.)

der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der

Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

vorgelegt von

**Anna Lisa Gündner**

aus

Herbolzheim

**Bonn, November 2012**



Angefertigt mit Genehmigung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen  
Fakultät der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

1. Gutachter: Prof. Michael Hoch

2. Gutachter: Prof. Michael Pankratz

Tag der Promotion: 21.2.2013

Erscheinungsjahr: 2013



# Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung.....	2
<b>1. Einleitung .....</b>	<b>4</b>
1.1. Lifestyle – Erkrankungen: Adipositas und T2D.....	4
1.2. <i>Drosophila</i> als Modellsystem für Stoffwechselfvorgänge.....	7
1.4. Das Insulin/TOR Netzwerk in <i>Drosophila melanogaster</i> .....	10
1.5. Cytohesine und Centaurine als Regulatoren von ArfGTPasen.....	15
1.6. Centaurine in <i>Drosophila melanogaster</i> .....	18
1.7. Zielsetzung.....	20
<b>2. Material .....</b>	<b>22</b>
2.1. Allgemeine Materialien.....	22
2.1.1. Chemikalien .....	22
2.1.2. Verbrauchsmaterialien .....	22
2.1.3. Geräte .....	22
2.1.4. Verwendete Software.....	23
2.2. Puffer und Lösungen .....	24
2.3. Kits, Standards und Enzyme .....	27
2.3.1. Kits .....	27
2.3.2. Standards.....	27
2.3.3. Enzyme .....	27
2.4. Antikörper .....	28
2.5. PCR Oligonukleotide.....	29
2.5.1. Konventionelle PCR.....	29
2.5.2. Quantitative <i>Realtime</i> PCR .....	31
2.6. Verwendete cDNA Klone.....	31
2.7. Verwendete Vektoren .....	32
2.8. Kultivierung von Bakterien.....	32
2.9. Kultivierung von Fliegen.....	33
2.9.1. Verwendete Fliegenlinien.....	33
2.9.2. Fliegenfutter .....	34
2.9.3. Apfelsaftagarplatten .....	37
<b>3. Methoden.....</b>	<b>38</b>
3.1. Isolierung und Aufreinigung von DNA und RNA.....	38

3.1.1.	DNA Minipräparation.....	38
3.1.2.	DNA Midipräparation.....	38
3.1.3.	DNA Gel-Elektrophorese, Aufreinigung und Konzentrationsbestimmung 39	
3.1.4.	Präparation genomischer DNA aus adulten Fliegen.....	39
3.1.5.	Präparation genomischer DNA für Einzelfliegen-PCR Analysen.....	40
3.1.6.	RNA Isolierung aus Larven und adulten Fliegen .....	40
3.1.7.	cDNA Synthese.....	40
<b>3.2.</b>	<b>Klonierung von DNA Fragmenten.....</b>	<b>41</b>
3.2.1.	Enzymatische DNA-Restriktion, Aufbereitung und Ligation.....	41
3.2.2.	TOPO-Klonierung .....	42
3.2.3.	Herstellung und Transformation von chemokompetenten Bakterien.....	42
3.2.4.	Sequenzierung von DNA .....	43
<b>3.3.</b>	<b>PCR Techniken zur Amplifizierung von DNA.....</b>	<b>43</b>
3.3.1.	Primer für PCR Analysen.....	43
3.3.2.	PCR Analysen für Klonierungs- und Screening Experimente.....	43
3.3.3.	Quantitative <i>Realtime</i> RT-PCR Analysen .....	45
<b>3.4.</b>	<b>Proteinbiochemie .....</b>	<b>47</b>
3.4.1.	Expression von HIS getaggten Proteinen in Bakterien .....	47
3.4.2.	Aufreinigung von HIS getaggten Proteinen.....	47
3.4.3.	Bestimmung der Proteinkonzentration.....	48
3.4.4.	SDS Gelelektrophorese .....	48
3.4.5.	Western Blot .....	49
3.4.6.	ECL Immundetektion .....	49
<b>3.5.</b>	<b>GTPase Assay.....</b>	<b>49</b>
<b>3.6.</b>	<b>Lipidanalysen.....</b>	<b>50</b>
3.6.1.	Lipidextraktion, Auftrennung und Detektion .....	50
3.6.2.	Oil Red O Färbung.....	51
<b>3.7.</b>	<b>Fluoreszenz- und histochemische Färbungen .....</b>	<b>51</b>
3.7.1.	Fixierung von Embryonen .....	51
3.7.2.	Filetpräparation von Larven .....	52
3.7.3.	Fluoreszenzfärbung von Filetpräparaten .....	52
3.7.4.	Markierung von in situ Sonden .....	53
3.7.5.	Histochemische in situ Hybridisierung .....	54
<b>3.8.</b>	<b><i>In vivo</i> Untersuchungsmethoden.....</b>	<b>55</b>
3.8.1.	Fliegenhaltung .....	55
3.8.2.	Fliegenkreuzungen .....	55

3.8.3.	Herstellung transgener Fliegen.....	55
3.8.4.	Bestimmung des P-Element-Insertions-Chromosoms .....	56
3.8.5.	Fliegenkreuzungen für das Ends-out Gene Targeting .....	56
3.8.6.	Sammeln von Embryonen und Larven.....	57
3.8.7.	Sortieren von Embryonen und Larven .....	58
3.8.8.	Gewichtsbestimmung bei adulten Fliegen .....	58
3.8.9.	Durchführung von Überlebensexperimenten unter Hungerbedingungen	
	58	
<b>4.</b>	<b>Ergebnisse .....</b>	<b>60</b>
<b>4.1.</b>	<b>Molekulare und biochemische Charakterisierung der kleinen GTPase</b>	
	<b>Centaurin gamma .....</b>	<b>60</b>
4.1.1.	Genomischer Lokus und Transkripte .....	60
4.1.2.	Protein- und Domänenstruktur.....	62
4.1.3.	Centaurin gamma ist eine funktionelle GTPase mit katalytischer GAP Domäne .....	63
<b>4.2.</b>	<b>Generierung und Charakterisierung der <i>centg</i><sup>-/-</sup> Nullmutante.....</b>	<b>72</b>
4.2.1.	Klonierung der Donorkonstrukte <i>pRK2-cenRA</i> , <i>pRK2-cenRB</i> und <i>pGX-</i> <i>cenORF</i> .....	72
4.2.2.	Generierung der <i>pGX-cenORF</i> Donorfliegenlinien .....	76
4.2.3.	Ends-out Gene Targeting für <i>centaurin gamma</i> .....	78
<b>4.3.</b>	<b><i>Centaurin gamma</i> als putativer Regulator des Metabolismus .....</b>	<b>84</b>
4.3.1.	<i>Centaurin gamma</i> als positiver Regulator des Insulinsignalweges.....	84
4.3.2.	<i>Centaurin gamma</i> als negativer Regulator des Insulinsignalweges .....	89
4.3.3.	<i>Centaurin gamma</i> unter hochkalorischen Futterbedingungen.....	94
<b>4.4.</b>	<b>Expressionsmuster von <i>centaurin gamma</i> .....</b>	<b>98</b>
<b>4.5.</b>	<b><i>Centaurin gamma</i> loss- und <i>gain-of-function</i> Studien.....</b>	<b>102</b>
4.5.1.	Generierung und Test der <i>centaurin gamma</i> Überexpressions- und RNAi Linien	102
4.5.2.	<i>Centaurin gamma</i> loss- und <i>gain-of-function</i> Screen.....	105
<b>4.6.</b>	<b><i>Centaurin gamma</i> an den NMJs .....</b>	<b>108</b>
4.6.1.	<i>centaurin gamma</i> beeinflusst die Morphologie der Körperwandmuskeln und die Innervierung durch die Motoneurone .....	108
4.6.2.	<i>Centg</i> <sup>-/-</sup> Mutanten zeigen keine Veränderung der Feinstruktur der NMJs	
	114	

<b>5. Diskussion.....</b>	<b>120</b>
<b>5.1. Centaurin gamma kodiert für eine funktionelle GTPase mit interner katalytischer GAP Domäne.....</b>	<b>120</b>
<b>5.2. Centaurin gamma und seine putative Funktion im Insulin/TOR Signalnetzwerk .....</b>	<b>122</b>
<b>5.3. Centaurin gamma als funktionelles Homolog von CentG1 in ernährungsbedingter Adipositas und Insulin Resistenz.....</b>	<b>124</b>
<b>5.4. Eine Organ-spezifische Funktion für Centaurin gamma .....</b>	<b>128</b>
<b>5.5. Centaurin gamma im peripheren Nervensystem.....</b>	<b>134</b>
<b>5.6. Centaurin gamma als funktionelles Homolog von CentG1 im Nervensystem .....</b>	<b>138</b>
<b>6. Anhang .....</b>	<b>146</b>
<b>7. Literaturverzeichnis.....</b>	<b>150</b>
<b>8. Abkürzungsverzeichnis .....</b>	<b>158</b>
<b>Danksagung.....</b>	<b>162</b>
<b>Erklärung.....</b>	<b>164</b>



## Zusammenfassung

Bewegungsmangel und ein Überangebot an kalorienreicher Nahrung haben dazu geführt, dass die globale Ausbreitung von metabolischen Erkrankungen wie Adipositas und Typ-2-Diabetes (T2D) in westlichen Kulturgesellschaften die Dimension einer Epidemie erreicht hat. Die Aufklärung der molekularen Mechanismen von Stoffwechselfunktionen wie Energiespeicherung und -mobilisierung ist von zentraler Bedeutung für das Verständnis der Ätiologie dieser Erkrankungen.

Die Fruchtfliege *Drosophila melanogaster* ist ein ausgezeichnetes Modellsystem zur Entschlüsselung der molekularen Grundlagen von Stoffwechselprozessen. Viele grundlegende Stoffwechselfunktionen sind zwischen Vertebraten und *Drosophila* konserviert. Fliegen sind in der Lage ihre Menge an zirkulierenden Zuckern in der Hämolymphe zu modellieren und sie speichern überschüssige Nährstoffreserven in Form von Glykogen und Lipiden, welche sie bei Bedarf mobilisieren können. Durch eine kalorienreiche Diät können auch in *Drosophila* Phänotypen induziert werden, die Ähnlichkeit zu Adipositas und T2D aufweisen.

Adipositas und T2D sind im Menschen mit einer Fehlregulation des Insulin-Signalweges assoziiert. Die Insulin-Signalkaskade ist im Tierreich hoch konserviert und spielt unter anderem eine essentielle Rolle bei der Regulation des Glukose-Stoffwechsels und bei Wachstums- und Größenkontrolle. Das *Drosophila* ArfGEF Steppke, ein Mitglied der Cytohesin-Familie von Guanin-Nukleotid-Austauschfaktoren, konnte vor einigen Jahren als Schlüsselkomponente des Insulin-Signalwegs identifiziert werden. ArfGEF Proteine vermitteln die Ablösung von gebundenem GTP an ArfGTPasen, die wiederum intrazelluläre Transportprozesse und die Struktur von Organellen kontrollieren. Gegenspieler der ArfGEF Proteine sind die ArfGAP Proteine, die die Hydrolyse von Arf-gebundenem GTP katalysieren. In einem Zellkultur-basierten RNAi Screen konnte in Vorarbeiten *centaurin gamma* (*centg*) als putatives ArfGAP im Insulinsignalweg von *Drosophila* identifiziert werden. Centaurine bilden eine Familie von Multidomänenproteinen und haben sowohl in *Drosophila* als auch in Säugern die gleiche, einzigartige Domänenstruktur. Mitglieder der *Centg* Proteinfamilie besitzen eine GTPase Domäne, eine PH Domäne, eine ArfGAP Domäne und Ankyrin Wiederholungsmotive. Im Rahmen dieser Arbeit sollte

untersucht werden, ob das *Drosophila centg* Gen *in vivo* als Regulator des Insulin-Signalweges fungiert.

Durch biochemische Untersuchungen konnte im ersten Teil der Arbeit nachgewiesen werden, dass *Centg* für eine funktionelle GTPase kodiert, die durch ihre interne GAP Domäne katalysiert wird. Zur Analyse der *in vivo* Funktion wurde mittels *ends-out gene targeting* eine *knockout* Mutante für *centg* generiert. *centg*<sup>-/-</sup> mutante Tiere sind homozygot lebensfähig. Sie zeigen jedoch im Vergleich zu anderen Regulatoren des Insulinsignalweges keinen Wachstumsphänotyp in den einzelnen Entwicklungsstadien und auch keine veränderte *4E-BP* Expression. Außerdem weisen sie keine veränderte Sensitivität gegenüber Hungerbedingungen und keine Einschränkungen bei der Mobilisierung der Speicherlipide auf. Weiterhin zeigten Fütterungsexperimente mit hochkalorischem Futter, dass sich *centg*<sup>-/-</sup> Mutanten unter hochkalorischen Bedingungen stark verzögert entwickeln und exzessiv Speicherlipide akkumulieren, ähnlich wie dies bei T2D bzw. Adipositas vorkommt. Im Gegensatz dazu sind *Centg1 knockout* Mutanten der Maus, die mit hochkalorischem Futter gefüttert wurden, gegen ernährungsbedingte Adipositas und Insulinresistenz geschützt. Wenn das *Drosophila centg*-Gen nicht am Insulin-Signalweg beteiligt ist, welche Rolle erfüllt es dann?

Expressionsstudien ergaben erste Hinweise darauf, dass *centg* eine wichtige Funktion im Nervensystem übernimmt. *Imaging* Analysen zeigen, dass *centg*<sup>-/-</sup> Mutanten bzw. Larven, die *centg* in den Körperwandmuskeln überexprimieren, Defekte an Motorneuronen beziehungsweise an Körperwandmuskeln aufweisen. In der Mutante innervieren 25 Prozent der Synapsen ihren Muskeln entweder an der falschen Stelle oder fehlen ganz. Außerdem ist die Morphologie von 25 Prozent der untersuchten Muskeln verändert. Die Überexpression in den Muskeln führt zu noch stärkeren Defekten. In 37% der Fälle führt die Überexpression zu Muskeldefekten und in 11% hat die Überexpression einen Einfluss auf die Synapse. *Centg* scheint somit eine Funktion in Motorneuronen und deren korrekter Interaktion mit den Muskeln zu übernehmen.

Die generierten genetischen und biochemischen Werkzeuge werden es in der Zukunft ermöglichen, weitere Funktionen von *centg* z.B. bei Insulin-abhängigen Wachstumsprozessen im ZNS oder im Glutamatrezeptor-Signalweg zu untersuchen.

# 1. Einleitung

## 1.1. Lifestyle – Erkrankungen: Adipositas und T2D

Gravierende Veränderungen unserer Lebensumstände wie Urbanisierung, die Entwicklung hin zu physisch weniger anstrengender Arbeit, Bewegungsmangel und das Überangebot an kalorienreicher Nahrung haben dazu geführt, dass die globale Ausbreitung von Adipositas und Type-2-Diabetes die Dimension einer Epidemie erreicht. Beide Erkrankungen gehören zusammen mit koronaren Herzerkrankungen, Bluthochdruck, Hautkrebs, Autoimmunerkrankungen und Osteoporose zu den Zivilisations- oder Lifestyle- Erkrankungen, die vermehrt seit der Industrialisierung auftreten. Bei Jägern und Sammlern oder nicht-verwestlichten Völkern kommen diese Erkrankungen nur selten oder überhaupt nicht vor (Carrera-Bastos et al., 2011).

Bei Diabetes mellitus unterscheidet man grundsätzlich zwei Formen: Type-1-Diabetes (T1D) und Type-2-Diabetes (T2D). Bei Typ-1-Diabetikern werden, meist durch eine Autoimmunreaktion ausgelöst, die insulinproduzierenden  $\beta$ -Inselzellen zerstört. Dies führt zu einem absoluten Insulinmangel. T2D ist durch eine steigende Insulinresistenz der Zielgewebe gekennzeichnet. Obwohl Insulin von den Pankreaszellen produziert und ausgeschüttet wird, kann dieses nicht detektiert werden. Anfangs passt sich der Körper durch eine gesteigerte Insulinproduktion an die Resistenz an, ist jedoch eine weitere Steigerung nicht mehr möglich, manifestiert sich die Krankheit (Polonsky, 2012).

Übergewicht und Adipositas (krankhafte Fettleibigkeit) sind durch eine abnormale, exzessive Anhäufung von Fett definiert und stellen ein signifikantes Gesundheitsrisiko dar (WHO, 2012). Sie erhöhen dramatisch die Wahrscheinlichkeit an Herz-Kreislaufkrankungen, Krebs und insbesondere an Diabetes mellitus Typ-2 (T2D) zu erkranken. Mehr als 1,5 Milliarden Menschen weltweit gelten bereits heute als übergewichtig und 500 Millionen werden als adipös eingestuft (WHO, 2012). Als übergewichtig werden Personen bezeichnet, deren BMI (Body Mass Index; Körpergewicht relativ zur Körpergröße) über  $25 \text{ kg/m}^2$  liegt und als adipös mit einem BMI von  $\geq 30$ . Von 1980 bis heute hat sich die Zahl der von Adipositas Betroffenen verdoppelt (WHO, 2012). Die rasante Geschwindigkeit dieser Entwicklung deutet daraufhin, dass Umwelteinflüsse bei dieser Entwicklung eine entscheidende Rolle spielen. Zusätzlich ist bekannt, dass genetische Faktoren einen wichtigen Einfluss

haben. Adipositas ist das Ergebnis einer Interaktion zwischen Genen und deren Umwelt (Speakman, 2007).

Es ist allgemein anerkannt, dass die genetische Prädisposition für Fettleibigkeit und T2D einen evolutiven Ursprung hat. Eine mögliche evolutionsbiologische Erklärung für die dramatische Anhäufung von krankhafter Fettleibigkeit bietet die „Thrifty Gene Theory“ von James Neel (Neel, 1962). Seiner Theorie nach haben sich durch den natürlichen evolutiven Druck von Hungersnöten in einigen ethnischen Gruppen Gene („thrifty genes“) durchgesetzt, die die Stoffwechselfrequenz maximieren und die Fettspeicherung optimieren und somit einen Vorteil bei schwankender Nahrungsverfügbarkeit bieten. In der heutigen Zeit, bei ständiger Nahrungsverfügbarkeit, einem Überangebot an nährstoffreicher Nahrung und mangelnder Bewegung führen diese Gene dazu, dass deren Träger exzessiv gespeichertes Fett anhäufen und somit prädisponiert für Adipositas und T2D sind.

Hungersnöte sind jedoch ein eher selten auftretendes demographisches Phänomen und ereignen sich durchschnittlich nur einmal pro Jahrhundert und die durchschnittliche Sterblichkeit während einer Hungersnot ist relativ gering (5% pro Jahr) und betrifft hauptsächlich sehr alte bzw. junge Individuen (Speakman, 2007). Des Weiteren zeigen Studien, dass es in Perioden zwischen zwei Hungersnöten zu keinem signifikanten Anstieg der Fettleibigkeit kam, welcher einen Vorteil bei der nächsten Hungersnot darstellen könnte (Campbell et al., 2003).

Eine zweite evolutiv begründete Theorie zur Erklärung der genetischen Prädisposition von Fettleibigkeit und T2D legt den Fokus nicht auf die Frage, warum die Menschen immer dicker werden, sondern, warum es nur ein Teil wird? Nach der „Predation release“ Hypothese waren frühe Hominiden dem evolutiven Druck ausgesetzt, ihr Körpergewicht innerhalb eines begrenzten Schwankungsbereichs zu halten. Die untere Grenze wird dabei durch ein Körpergewicht definiert, bei dem eine Mindestmenge an Körperfett gespeichert wird, um kurze Nahrungsknappheiten bzw. eine Infektion zu überleben. Die obere Grenze stellt das Gewicht dar, bei welchem noch die Abwehr bzw. die schnelle Flucht vor einem Raubtier möglich ist (Speakman, 2007). In der frühen Phase der humanen Evolution (vor 6-2 Millionen Jahren) waren große Raubtiere wesentlich präsenter und eine ernste Bedrohung für das Überleben der Hominiden (Hart, 2005). In der Zeit vor 2 -1,8 Millionen Jahren ereigneten sich dann für die Evolution einschneidende Ereignisse. Das erste war die Entwicklung von sozialem Verhalten. Dieses ermöglichte es den Hominiden sich gegenseitig vor

Raubtieren zu warnen und sich gemeinsam gegen sie zu verteidigen. Außerdem entdeckten sie das Feuer und begannen Werkzeuge und Waffen herzustellen (Platek, 2002). Durch diese Errungenschaften wurde der evolutive Druck durch Raubtiere stark eingeschränkt. Somit bestand kein selektiver Druck mehr gegen Gene, die ein hohes Körpergewicht begünstigen, wohingegen die untere Grenze weiter bestehen bleibt. Nach dieser Hypothese ist die Fettleibigkeit als Konsequenz des fehlenden selektiven Druckes entstanden und nicht weil sie einen evolutiven Vorteil darstellte (Speakman, 2007).

Auch wenn bis heute nicht eindeutig geklärt ist, wie die Evolution die Entstehung von Adipositas und T2D Genen beeinflusst hat, so gibt es starke Hinweise darauf, dass die Varianz des Körpergewichtes bzw. des BMI innerhalb einer Population hauptsächlich genetisch determiniert wird (Barsh et al., 2000). Aus der Zwillingsforschung bzw. aus Studien mit adoptierten Kindern weiß man, dass die Erblichkeitsrate bei 40-70% liegt (Ramachandrapa and Farooqi, 2011). Deshalb kann die Untersuchung und Charakterisierung von Genen, die in Tiermodellen zu Adipositas und T2D Phänotypen führen, wichtige Erkenntnisse über die biochemischen Stoffwechselwege und Mechanismen, die an der Entstehung von Fettleibigkeit und T2D im Menschen beteiligt sind, erbringen.

Der Insulinsignalweg eine zentrale Rolle bei der Kontrolle der metabolischen Energiehomöostase und der Entstehung von T2D. Normalerweise reguliert Insulin die Nährstoffhomöostase, indem es die Aufnahme von Glukose in peripherem Gewebe stimuliert und gleichzeitig die Mobilisierung von gespeichertem Fett aus dem Fettgewebe unterdrückt. Die krankhafte Veränderung des Insulinsignalweges führt deshalb zu metabolischen Veränderungen, wie Hyperglykämie, verursacht durch die Unterdrückung der Glukose-Aufnahme, und unkontrollierte Glukose-Produktion bzw. Dyslipidämie, welche Veränderungen der Fettsäuren, Triacylglyceriden und Lipoprotein Levels beinhaltet. Die erhöhten Glukose- und Lipidlevels wiederum verstärken die Unterdrückung der Insulinausschüttung und führen zu weiteren Komplikationen (Polonsky, 2012).

Eine molekulare Charakterisierung von Schlüsselkomponenten des Insulinsignalweges kann dadurch einen wichtigen Beitrag zum Verständnis der molekularen Ursachen von T2D und darüber hinaus zur Medikamentenentwicklung leisten.

## 1.2. *Drosophila* als Modellsystem für Stoffwechselfvorgänge

*Drosophila* hat sich bereits als nützliches Modellsystem zur Untersuchung einer Vielzahl von humanen Erkrankungen erwiesen (Teleman et al., 2012). Ein Grund hierfür ist die starke Konservierung auf molekularer und physiologischer Ebene. 74% aller bekannten Gene, die mit humanen Erkrankungen assoziiert sind, haben ein Homolog in der Fliege (Chien et al., 2002). Außerdem besitzen Fliegen Analoge zu den meisten menschlichen Organen, wie den Muskeln, dem zentralen und peripheren Nervensystem, dem Fettgewebe, dem Verdauungstrakt, der Leber und dem Herz und konnten daher bereits erfolgreich für Untersuchungen von Muskeldystrophie, neurodegenerativen Erkrankungen, Alterungsprozessen und Krebs eingesetzt werden (Fontana et al., 2010; Lloyd and Taylor, 2010; Rudrapatna et al., 2011; Bonini, 2012).

In den letzten Jahren gewann *Drosophila melanogaster* aber auch immer mehr an Bedeutung als Modell zur Untersuchung des Energiestoffwechsels. Es konnte gezeigt werden, dass wichtige metabolische Funktionen evolutionär und funktionell konserviert sind. Fliegen müssen, genau wie Menschen, zwischen Energiespeicherung und –mobilisierung unterscheiden können, um sich an verschiedene Nahrungsbedingungen anzupassen.

Analysen zu den molekularen Mechanismen von Fettleibigkeit und T2D sind in *Drosophila* möglich, da wichtige Signalwege und deren Regulatoren, die den Kohlenhydrat- und Lipidhaushalt kontrollieren, zwischen Mensch und Fliege konserviert sind.

Der Lipidmetabolismus wird in Fliegen von den gleichen Schlüsselkomponenten wie in Säugern gesteuert: SREBP wirkt als Regulator der Lipogenese, HNF4 (Hepatocyte nuclear factor 4) steuert den Lipidkatabolismus und die Brummer Lipase (Ortholog zu ATGL; Adipose triglyceride lipase) wirkt als zentrale Komponente in der Triacylglyceridspeicherung (Grönke et al., 2005; Porstmann et al., 2008; Palanker et al., 2009). Weiterhin besitzen Fliegen die konservierte AMPK Kinase, welche ATP-abhängig die Mobilisierung von Nährstoffreserven aktiviert (Johnson et al., 2010). Alle zentralen Komponenten der Insulin- und TOR Signalkaskaden konserviert, die eine Anpassung des Stoffwechsels an die vorhandene Kohlenhydrat- und Aminosäurelevel vermitteln, sind ebenfalls konserviert.

Neben den molekularen Signalwege und deren Regulatoren existieren in der Fliege auch Analoge zu den zentralen Organen die, die Energiehomöostase steuern.

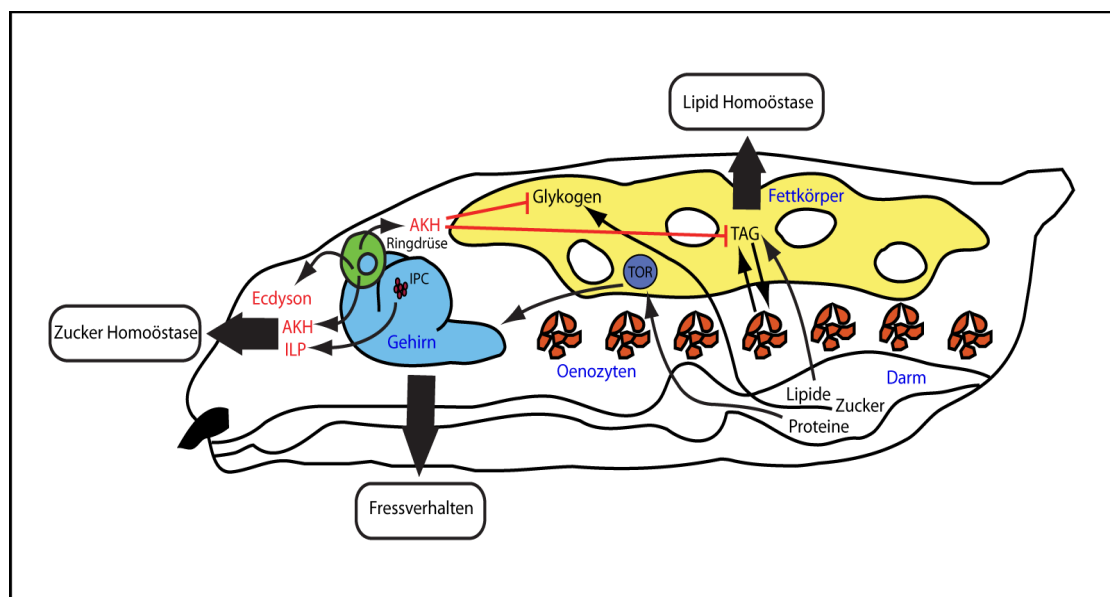
Die Verdauung und die Nährstoffabsorption finden im Mitteldarm statt, der das funktionelle Äquivalent zum Magen und dem Verdauungstrakt von Säugern darstellt.

Der *Drosophila* Fettkörper dient der Speicherung von Energiereserven in Form von Glykogen und Triacylglyceriden (TAGs) und übernimmt somit eine analoge Funktion zur Leber und dem weißen Fettgewebe. In der Larve besteht er aus circa 2000 Zellen, die in einem regelmäßigen Muster in den Segmenten angeordnet sind (Gutierrez et al., 2006). Während der Metamorphose werden die Zellen durch Autophagie aufgelöst und der adulte Fettkörper bildet sich *de novo* (Rizki, 1978). Neben der Energiespeicherung dient der Fettkörper auch als sekretorisches Organ. Zusätzlich zu einer Vielzahl von Faktoren für die Immunabwehr, sekretiert er Adipokin-ähnliche Faktoren, die für den Stoffwechsel wichtig sind (Ferrandon et al., 2007; Arquier et al., 2008). Es konnte gezeigt werden, dass ALS (Acide-labile Subunit) vom Fettkörper sekretiert wird, welches insulinähnliche Peptide (ILPs= Insulin Like Peptides) bindet. Aus Säugern ist bereits bekannt, dass ALS IGF-1 (Insulin like Growth Factor) bindet. Außerdem bildet ebenfalls sekretiertes Imp-L2 einen Komplex mit ALS und ILPs analog zu den IGF-Bindeproteinen in Säugern (Honegger et al., 2008).

Unter Hungerbedingungen werden gespeicherte Fettreserven aus dem Fettkörper mobilisiert und akkumulieren in den Oenozyten, die das Äquivalent der Hepatozyten darstellen (Gutierrez et al., 2006). Oenozyten exprimieren viele Hepatozyten spezifische Gene, wie Enzyme des Fettsäurestoffwechsels oder Oberflächenproteine für die Aufnahmen von Lipoproteinpartikeln. Im Gegensatz zur Leber von Säugern sind die Oenozyten in Zellclustern paarig an der larvalen Körperwand angeordnet (Gutierrez et al., 2006). Diese Verteilung ermöglicht den Oenozyten in engem Kontakt mit der Hämolymphe zu stehen, in welcher wiederum die Nährstoffe zirkulieren.

Die Menge an zirkulierenden Zuckern in der Hämolymphe wird in *Drosophila* durch zwei neurosekretorische Zellcluster reguliert, die im Gehirn und in der Ringdrüse lokalisiert sind. Sie bilden das funktionelle Homolog zum Pankreas und sekretieren ILPs (Insulin/IGF Analoge) und AKH (Adipokinetic Hormone, Glukagon Analog). ILPs werden von den IPCs (Insulin Producing Cells) produziert, welche die Funktion der  $\beta$ -Zellen des Pankreas erfüllen. Die Entfernung der IPCs führt bei Larven zu Diabetes-

ähnlichen Phänotypen mit erhöhten Glukose- und Trehalosespiegeln (Rulifson, 2002). AKH hingegen wird in der Corpora Cardiaca Region der Ringdrüse produziert, welche das wichtigste endokrine Organ in Insekten ist und in direktem Kontakt mit den IPCs und dem Herzen steht. Die Sekretion von AKH führt zur Aktivierung der Glykogen-Phosphorylase im Fettkörper und führt dazu, dass gespeicherte Trehalose aus dem Fettkörper mobilisiert wird. Die Ablation der Corpora Cardiaca Zellen in Larven führt im Gegensatz zur Ablation der IPCs zu einer dramatischen Erniedrigung des Trehalosespiegels in der Hämolymphe (Kim and Rulifson, 2004).



**Abb. 1.1 Interaktion verschiedener Organe, die die Stoffwechsellhomöostase in *Drosophila* Larven regulieren.** Hormone sind in rot, die verschiedenen Organe in blau beschriftet. Detaillierte Beschreibung siehe Text. (modifiziert nach Leopold und Perrimon 2007).



## **1.4. Das Insulin/TOR Netzwerk in *Drosophila melanogaster***

Insulin spielt eine wichtige Rolle bei der Regulation des Energiestoffwechsels und ist an der Entstehung von T2D beteiligt (Teleman et al., 2012, 2009). Auch wenn die genauen molekularen Grundlagen noch lange nicht entschlüsselt sind, weiß man, dass Veränderungen der Komponenten des Insulinsignalweges einen dramatischen Einfluss auf den Stoffwechsel haben (Saltiel and Kahn, 2001).

Die Fruchtfliege war und ist eines der wichtigsten Modellsysteme um das Insulin/IGF (insulin-like Growthfactor)/TOR (Target of Rapamycin) Netzwerk zu untersuchen. Wichtige Komponenten wie Rheb, Tsc1 und Tsc2 (tuberous sclerosis complex) konnten durch Untersuchungen in *Drosophila* dem Insulin/TOR Signalnetzwerk zugeordnet werden (Gao, 2001; Potter et al., 2001; Saucedo et al., 2003; Stocker et al., 2003).

In Säugern werden die Prozesse, Wachstumskontrolle und Regulation des Glukosehaushalts, von zwei unabhängigen Rezeptoren, IGF (Insulin like Growth Factor) und IR (Insulinrezeptor), und deren Signalkaskaden, gesteuert. Fliegen hingegen besitzen nur einen Insulinrezeptor (InR = Insulin like Rezeptor), der sowohl das Zell- und Organismuswachstum als auch die Nährstoffhomöostase reguliert (Chen et al., 1996).

Die Insulin Signalkaskade wird durch die Bindung der insulin-ähnlichen Peptide an den Rezeptor aktiviert. *Drosophila* besitzt sieben ILPs (Insulin like Peptides 1-7), die auf Proteinebene und auch funktionell homolog zum humanen Insulin bzw. IGF sind (Brogiolo et al., 2001). Zuerst war es überraschend, dass *Drosophila* sieben ILPs kodiert, da man bei Invertebraten im Vergleich mit Säugern eine geringere Komplexität erwarten würde. Aber es wird immer deutlicher, dass auch Säuger wesentlich mehr Insulin-ähnliche Peptide kodieren und inzwischen konnten bereits neun ILPs in Vertebraten identifiziert werden (Nakae et al., 2001). Die Überexpression jedes der sieben *Drosophila* ILPs in der Larve führt zu einer Zunahme der Körpergröße, was ein Hinweis darauf ist, dass alle Peptide an den InR binden und die Signalkaskade aktivieren können (Ikeya et al., 2002). Außerdem führt die Zerstörung der NSCs (Neurosecretory Cells), die die ILPs 2,3 und 5 produzieren, zu Entwicklungsverzögerung und reduzierter Körpergröße. Zusätzlich induziert die Ablation der NSCs T2D ähnliche Phänotypen, wie erhöhte Levels an zirkulierenden

Zuckern, Glykogen und Triacylglyceriden (Rulifson, 2002). Nach der Bindung der Liganden wird der Insulinrezeptor aktiviert und autophosphoryliert. Die Autophosphorylierung induziert die Rekrutierung Adapterproteine Chico und Lnk (Böhni et al., 1999; Werz et al., 2009). Mutanten für beide Adaptermoleküle zeigen ebenfalls die erwarteten Phänotypen für Mutanten des Signalweges, wie die Reduktion der Körpergröße und erhöhte Körperfettmengen. Nach Bindung an den Rezeptor werden die beiden Adaptorproteine phosphoryliert und es kommt zur Rekrutierung der PI3K Kinase (Phosphatidylinisitol-3-OH-Kinase), zusammen mit ihrer p60 Adapteruntereinheit (Leevers et al., 1996). Die Aktivierung von PI3K wiederum führt dazu, dass diese ihr Substrat, das Membranlipid, PIP<sub>2</sub> (Phosphatidylinisitol-(4,5)-biphosphat) in PIP<sub>3</sub> (Phosphatidylinisitol-(3,4,5)-triphosphat) umwandelt. Durch das akkumulierte PIP<sub>3</sub> werden die Kinasen PDK1 und Akt über ihre PH (Pleckstrin Homologie) Domäne an die Membran rekrutiert und phosphoryliert. Die Kinasen und deren Interaktionen sind zwischen Säugern und Fliegen stark konserviert (Franke, 2008). Mutanten für PI3K, Akt und PDK1 zeigen in *Drosophila* starke Wachstumsphänotypen und die Überexpression führt zu übermäßiger Gewebeproliferation (Verdu et al., 1999; Weinkove et al., 1999; Rintelen et al., 2001). Entstandenes PIP<sub>3</sub> kann durch die Phosphatase PTEN (Phosphatase and Tensin homolog) wieder dephosphoryliert werden. PTEN Mutanten zeigen gegenteilige Wachstumsphänotypen im Vergleich zu den aktivierenden Kinasen des Insulinsignalweges (Goberdhan et al., 1999).

In Säugern phosphoryliert die Akt Kinase eine Vielzahl von Substratproteinen, die an der Kontrolle des Metabolismus beteiligt sind, unter anderem GSK-3 $\beta$  (Glycogen-Synthase Kinase 3), TBC1D4 (TBC Domain Family Member 4), den Transkriptionsfaktor FOXO, PRAS40 (Proline-rich Akt Substrate of 40 kD), 6 Phosphofructo-2-Kinase, die ATP-Citrat Lyase und TSC2. Einige dieser Interaktionen wurden auch in *Drosophila* untersucht (Teleman, 2009).

Ein wichtiges Zielprotein, das von Akt phosphoryliert wird, ist der Tumorsuppressor Tsc2. Aktiviertes Tsc2 wirkt als GAP (GTPase activating Protein) für die kleine GTPase Rheb (Gao, 2001; Potter et al., 2001; Venkateswarlu et al., 2007). GAP Proteine katalysieren die Hydrolyse des an die GTPase gebundenen GTP und inaktivieren diese somit. Durch die Inaktivierung von Rheb wird auch gleichzeitig der TOR-C1 Komplex inhibiert. Diese Inhibierung ist in Fliegen und Säugern konserviert und führt in beiden Modellsystemen zu einer Hyperaktivierung von TOR (Jackson et al., 2000; Inoki and Guan, 2009). Die TOR Kinase, ein zentraler Regulator des

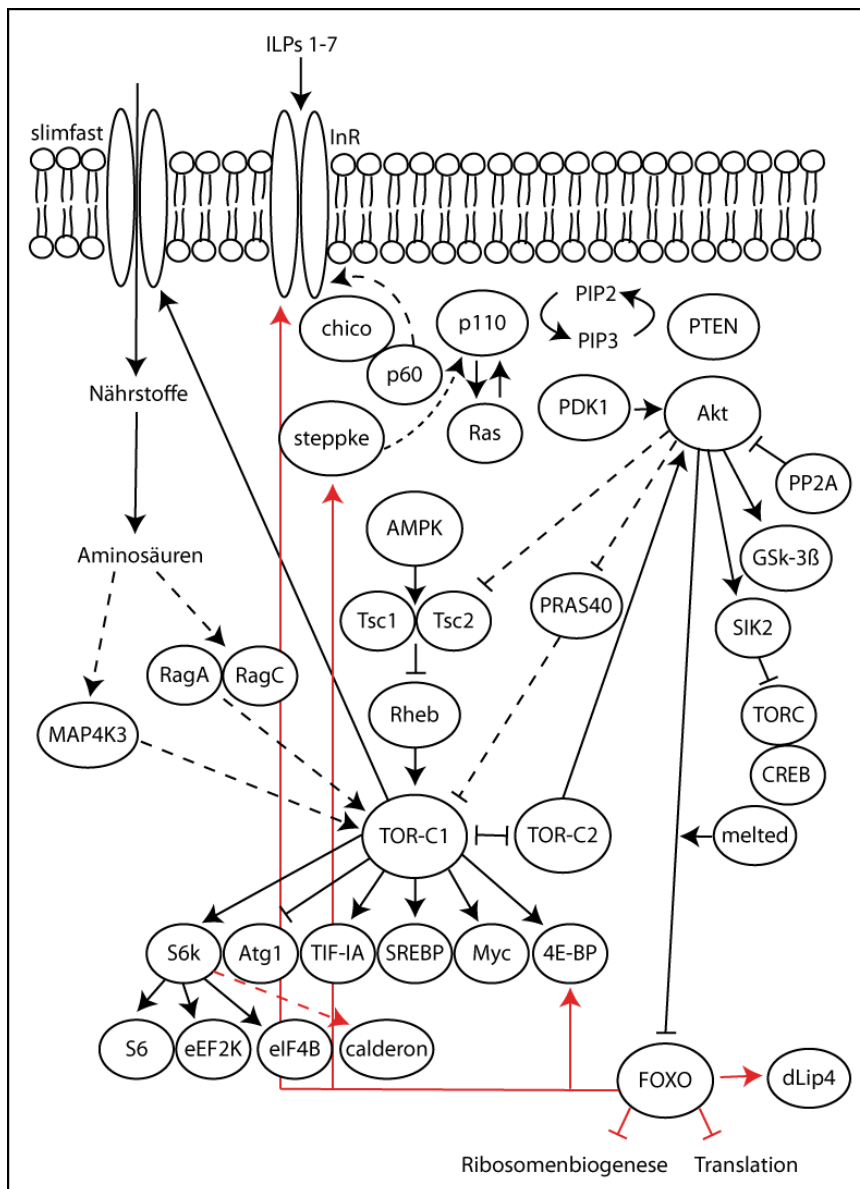
zellulären Metabolismus, bildet zwei distinkte Komplexe, TOR-C1 und TOR-C2, wobei einige Komponenten Teil von beiden Komplexen und andere lediglich an einem beteiligt sind (Wullschleger et al., 2006). TOR beeinflusst diverse Prozesse in der Zelle, wie den Kohlenhydratmetabolismus, den Lipidmetabolismus, Translation und Autophagie. Wenn TOR aktiv ist, führt dies zur Akkumulierung von Lipiden, Glykogen und Zellmasse im Allgemeinen. Wohingegen die Inhibierung von TOR den Abbau von Lipid- und Glykogenspeichern und im Extremfall Autophagie induziert. Eine Veränderung der TOR-C1 Level führt in *Drosophila* zu starken Veränderungen der Organ- bzw. Organismusgröße. Die Reduktion der Genaktivität führt zu einer Reduktion der Organgröße durch eine kleinere Zellgröße bzw. Zellzahl. Eine TOR-C1 Überexpression hat den gegenteiligen Effekt (Oldham et al., 2000). Einer der zentralen Prozesse, der auf verschiedenen Ebenen von TOR-C1 reguliert wird, ist die Translation. TOR-C1 reguliert zum einen die Ribosomenbiogenese indem es einerseits die Produktion der beiden Komponenten der Ribosomen, ribosomale Proteine und rRNAs steuert und andererseits die Initiation der Translation. Sowohl in *Drosophila* als auch in Säugern aktiviert TOR-C1 den Transkriptionsfaktor TIF-IA (Transcriptional intermediary Factor IA), der für die Expression von rRNAs essentiell ist (Grewal et al., 2007) (Mayer et al., 2004). Außerdem reguliert TOR-C1 die Initiation und Elongation des Translationsprozesses durch die Phosphorylierung von 4E-BP, einem Translationsinhibitors (Miron et al., 2003). Zusätzlich phosphoryliert und aktiviert TORC1 die S6k Kinase, die ihrerseits verschiedene Faktoren, die für die Translation wichtig sind, reguliert.

Ein weiteres wichtiges Substrat, das von der Akt Kinase phosphoryliert wird, ist der Transkriptionsfaktor FOXO (Kramer et al., 2003). In Fliegen, wie auch in Säugern, führt seine Phosphorylierung dazu, dass FOXO nicht vom Zytoplasma in den Zellkern transloziert und damit nicht die Transkription seiner Zielgene induzieren kann (Jünger et al., 2003; Puig, 2003). FOXO, als einer der wichtigsten Transkriptionsfaktoren des Insulinsignalweges, mit über 700 Zielgenen, hat einen starken Einfluss auf den Metabolismus (Slack et al., 2011). Ist die FOXO aktiv, vermittelt er auf Transkriptionsebene die Herunterregulation des Stoffwechsels und die Konservierung von Energie bis hin zu Katabolismus. Die Überexpression von FOXO führt zu einem hungerähnlichen Phänotyp, mit Larven, die ihr Wachstum einstellen und sich vom Futter entfernen (Kramer et al., 2003). Die Überexpression von FOXO in einzelnen Geweben führt zu einer der Reduktion der Organgröße verursacht durch eine verringerte Zellzahl (Jünger et al., 2003).

Ein wichtiges Zielgen des FOXO Transkriptionsfaktors ist der Translationsrepressor 4E-BP (4E- Binding Protein). Ist 4E-BP aktiv, bindet er eIF4E (eukaryotic Initiation Factor 4E) und blockiert somit die Rekrutierung der Ribosomen an das 5`Ende von mRNAs. Dies führt zu einer generellen Reduktion der Translation in den Zellen. Obwohl 4E-BP die globale Translation beeinflusst und man davon ausgeht, dass dies das Organwachstum beeinflussen sollte, zeigen 4E-BP Mutanten keinen Wachstumsphänotyp weder in Fliegen noch in Mäusen (Tsukiyama-Kohara et al., 2001; Teleman et al., 2005). In beiden Modellsystemen lässt sich aber eine erhöhte metabolische Rate feststellen, was zu der Theorie passt, dass die Proteinsynthese ein Prozess ist, der viel Energie benötigt und dessen Regulation den Energiehaushalt des gesamten Organismus betrifft.

In vielen Mutanten des Insulinsignalweges lässt sich eine veränderte 4E-BP Expression feststellen.

Mutanten für positive Regulatoren, wie für das ArfGEF (Guanine Exchange Factor) Protein Steppke, zeigen unter normalen Futterbedingungen eine erhöhte 4E-BP Expression. Steppke ist das einzige Mitglied der Cytohesin Proteinfamilie in *Drosophila* (Fuss et al., 2006). Cytohesine wirken als Aktivatoren für Arf (ADP-ribosylation factor) GTPasen, indem sie, das, an die GTPase gebundene GDP ablösen und so die Bindung von GTP an die GTPase ermöglichen (Kolanus, 2007). Für Steppke konnte gezeigt werden, dass es im Insulinsignalweg oberhalb von PI3K wirkt. Die *step* Mutanten weisen die charakteristischen Wachstums- und Entwicklungsverzögerungsphänotypen, eine erhöhte FOXO Aktivität und damit eine verstärkte 4E-BP und InR Expression unter Normalbedingungen auf (Fuss et al., 2006). Diese Phänotypen lassen sich ebenfalls durch den chemischen Inhibitor, SecinH3, der die Sec7 Domäne inhibiert, induzieren (Fuss et al., 2006). Die Inhibition der Step Homologen in der Maus, mithilfe von SecinH3, führt zu einer verstärkten Expression von Insulin-reprimierten Gluconeogenesegenen und einer Inhibierung der Glykogen- und Fettsäuresynthese und damit ebenfalls zu T2D ähnlichen Phänotypen (Hafner et al., 2006).



**Abb. 1.2 Der intrazelluläre Insulinsignalweg in *Drosophila*.** Die Abbildung zeigt die funktionellen Zusammenhänge zwischen den einzelnen Komponenten. Pfeile beschreiben eine aktivierende Funktion der Komponenten, aber nicht zwingend eine direkte Interaktion. Linien mit einem Querstrich am Ende beschreiben eine inhibierende Funktion. Gestrichelte Linien symbolisieren eine indirekte Interaktion oder eine noch nicht ausreichend untersuchte Interaktion. Die roten Pfeile beschreiben eine transkriptionelle Regulation. Details zur Abbildung siehe Text. (modifiziert nach Teleman, 2009).

## 1.5. Cytohesine und Centaurine als Regulatoren von ArfGTPasen

Arf (ADP-ribosylation Factor) GTPasen gehören zur Familie der kleinen G-(Guanine-Nucleotide-Binding) Proteine und kontrollieren intrazelluläre Transportprozesse und die Struktur von Organellen (Donaldson and Jackson, 2011). Arfs haben diverse wichtige Funktion, wie die Rekrutierung von Oberflächenproteinen, welche die Aufnahme von Ladung in Vesikel vermitteln, die Rekrutierung und Aktivierung von Phosphatidyl-inositol (PtdIns) Kinasen, die die Membranlipidzusammensetzung beeinflussen und die Interaktion mit Faktoren des Zytoskeletts (Donaldson and Jackson, 2011). Sie wechseln kontinuierlich zwischen einer GTP-gebundenen und einer GDP-gebundenen Konformation, wodurch sie aktiviert bzw. inaktiviert werden (Bos et al., 2007). Die sechs Säuger Arf Proteine werden anhand ihrer Sequenzhomologie in drei Gruppen unterteilt: Klasse I (Arf1, Arf2 und Arf3), Klasse II (Arf4 und Arf5) und Klasse III (Arf6). In *Drosophila melanogaster* gibt es jeweils ein Homolog zu jeder Klasse, die hoch konservierte Bereiche am äußersten N-terminalen Ende und im C-terminalen Bereich haben (Donaldson and Honda, 2005).

Arf GTPasen finden sich an allen Membranen innerhalb der Zelle, der Plasmamembran und den Membranen von sekretorischen, endosomalen und lysosomalen Vesikeln (Donaldson and Jackson, 2011). Arfs besitzen eine N-terminale amphiphile Helix und werden an ihrem N-Terminus co-translational durch Myristilierung modifiziert. Der myristilierte N-Terminus und die amphiphile Helix sind sowohl für die Rekrutierung an die Membran als auch die biologische Aktivität essentiell und werden nach Bindung von GTP in die Membran inseriert (Antonny et al., 2012). Diese Form der Membranrekrutierung unterscheidet die Arf GTPasen von allen anderen G-Proteinen der Ras Superfamilie, die durch einen langen C-Terminalen Linker an der Membran rekrutiert werden (Gillingham and Munro, 2007).

Nach ihrer Aktivierung an der Membran, rekrutieren GTP-gebundene Arf GTPasen Oberflächenproteine, Lipid-modifizierende Enzyme, Adaptorproteine und andere Effektoren, die den Membrantransport und die Struktur von Organellen regulieren (Donaldson and Jackson, 2011). Zu den Adaptorproteinkomplexen, die durch Arfs rekrutiert werden, gehört zum Beispiel COPI (Coatomer Complex I), Clathrin AP 1,3,4 (Adaptor Protein) und die monomeren GGAs (Golgi-associated  $\alpha$ -adaptin homology Arf binding proteins) (Donaldson and Jackson, 2011). Diese

Proteinkomplexe sortieren Membranproteine in Transportvesikel. Ein wichtiges lipidmodifizierendes Enzym, das durch Arfs rekrutiert wird, ist die Phospholipase D. Die Phospholipase D hydrolysiert Phosphatidylcholin zu Phosphatidsäure (Donaldson and Jackson, 2011).

Die GTP Hydrolyse durch GTPasen stellt eine wichtige biochemische Reaktion dar, durch die viele biologische Prozesse, wie Wachstumskontrolle, Differenzierung, Transportprozesse und Cytoskelettveränderungen reguliert werden (Scheffzek and Ahmadian, 2005). Die GTPasen fungieren im Allgemeinen als molekulare Schalter, die in ihrer aktiven Konformation, wenn GTP gebunden ist, mit Effektorproteinen interagieren und Signalübertragungsvorgänge katalysieren (Bos et al., 2007).

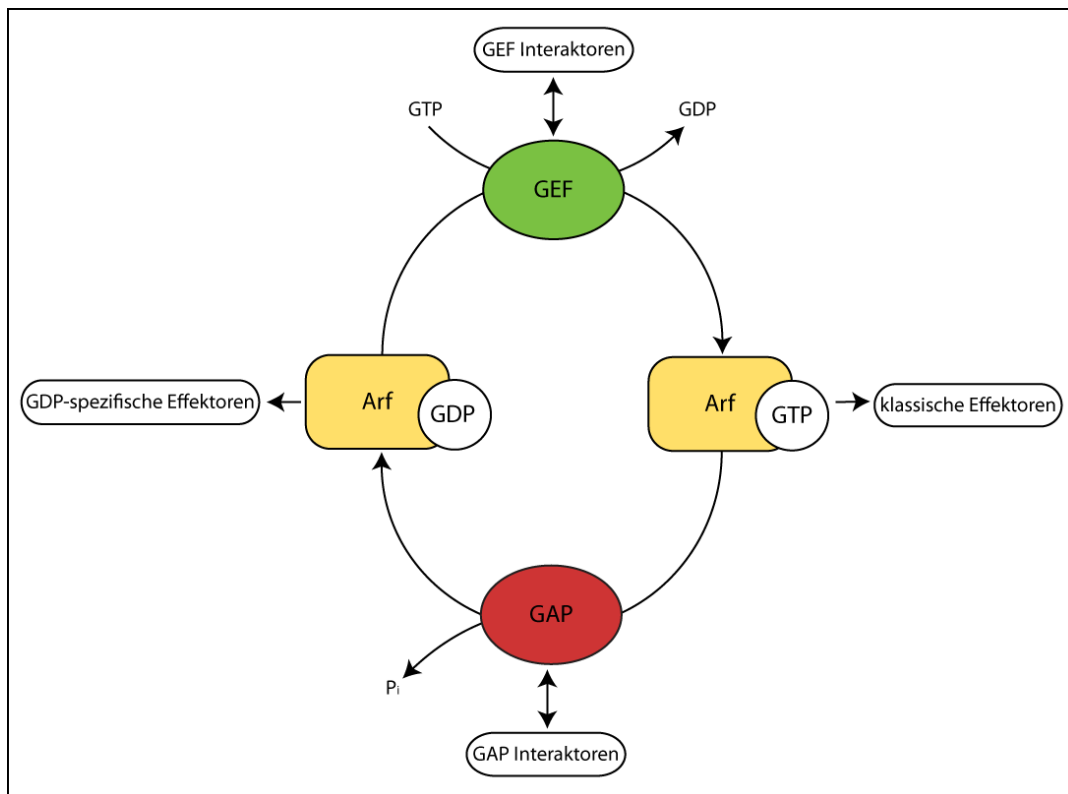
Der Wechsel zwischen den beiden Konformationen wird durch spezielle Hilfsproteine, die GEFs (Guanine Exchange Factor) beziehungsweise GAPs (GTPase-activating Proteins) katalysiert (Bos et al., 2007). GEFs vermitteln die Ablösung von gebundenem GDP, indem sie die Konformation der Bindungstasche der GTPase verändern und sich dadurch das gebundene Nukleotid ablöst. Die freie Bindungstasche wird danach direkt von einem neuen Nukleotid besetzt. Die Affinität für GDP oder GTP ist bei GTPasen gleich, jedoch ist eine Bindung von GTP, da in der Zelle ein zehnfacher Überschuss an GTP vorliegt, wesentlich wahrscheinlicher (Bos et al., 2007). Um eine GTPase zu deaktivieren, muss das gebundene GTP hydrolysiert werden, wobei Guanosintriphosphat (GTP) in Guanosindiphosphat (GDP) und anorganisches Phosphat gespalten wird (Bos et al., 2007). Bei den meisten G-Proteinen, besonders bei den Arf GTPasen, ist die intrinsische GTPase-Aktivität sehr schwach und es sind Hilfsproteine nötig, die die Hydrolyse katalysieren (Donaldson and Honda, 2005). Diese Funktion erfüllen die GAPs. Sie besitzen eine katalytische Gruppe, die die Hydrolyse beschleunigt und außerdem die richtige Orientierung des angreifenden Wassermoleküls und die Stabilisierung des Übergangszustand vermittelt (Scheffzek and Ahmadian, 2005).

Die 15 humanen ArfGEF Proteine werden in sechs Untergruppen unterteilt, wovon 4 zur Familie der Cytohesine gehören (Donaldson and Jackson, 2011). In der Zellperipherie sind Cytohesine an Plasmamembran/Endosomen Transportprozessen und an Signaltransduktionswegen, die Zellproliferation, Immunantwort und Wachstumskontrolle regulieren, involviert (Kolanus, 2007). Mitglieder der Cytohesin Familie besitzen neben der Sec7 Domäne zusätzlich eine Coiled-Coil Domäne und eine PH Domäne (Kolanus, 2007). Es wurde gezeigt, dass sie *in vitro* und in

Zellen den GDP Austausch an Arf1 und Arf6 durch ihre Sec7 Domäne katalysieren (Casanova, 2007). Wie die entsprechenden Arf GTPasen, sind auch ArfGEFs beziehungsweise Cytohesine an vielen zellulären Prozessen beteiligt. Unter anderem wirken sie als Gerüstproteine in verschiedenen Signalkomplexen (Donaldson and Jackson, 2011). Sie beeinflussen den Integrin Signalweg in Immunzellen und Cytohesin1 kann  $\beta 2$  Integrine in dendritischen Zellen aktivieren (Quast et al., 2009). Außerdem konnte mit Hilfe des Cytohesin spezifischen Inhibitors SecinH3 eine Funktion für Cytohesine im Insulin und ERB Rezeptor Tyrosin Kinase Signalweg gezeigt werden (Fuss et al., 2006; Hafner et al., 2006; Bill et al., 2010). Wie bereits beschrieben, sind Cytohesine, sowohl in *Drosophila melanogaster* als auch in Säugerzellen, Aktivatoren des Insulinsignalweges und sind wichtig für das Zellwachstum und die Insulinsensitivität in humanen Leberzellen (Fuss et al., 2006; Hafner et al., 2006).

Neben ArfGEF Proteinen wirken auch ArfGAP Proteine als wichtige Regulatoren von Arf GTPasen. Die 31 humanen ARFGAPs lassen sich anhand ihrer Domänenstruktur in 9 Untergruppen einteilen (Donaldson and Jackson, 2011). Mitglieder der vier Centaurin Familien  $\alpha, \beta, \gamma$  und  $\delta$  besitzen neben der charakteristischen ArfGAP Domäne zusätzlich eine PH Domäne (Randazzo et al., 2001). Die PH Domäne dient bei den Centaurinen, wie auch bei den Cytohesinen, der Membranrekrutierung über das Membranlipid  $PIP_3$ , welches durch die PI3K generiert wird (Randazzo et al., 2001). Die Familie der Centaurin Proteine wurde wegen ihrer außergewöhnlichen Domänenstruktur nach den Zentauren der griechischen Mythologie benannt (Randazzo et al., 2001). Es konnte bereits gezeigt werden, dass Centaurine als GAPs für Arfs wirken beziehungsweise eine starke Homologie zu ArfGAPs haben (Donaldson, 2000). Centaurin  $\alpha_2$  wird in einem PI3K abhängigen Mechanismus an die Membran rekrutiert, wo es die Arf6 abhängige Aktinzytoskelett Reorganisation beeinflusst (Venkateswarlu et al., 2007). Die Centaurine  $\beta_1$  und  $\beta_2$  wirken als ArfGAPs für Arf6 und deren Überexpression blockiert die Bildung von Arf6 abhängigen Protrusionen an der Zellmembran (Jackson et al., 2000).





**Abb. 1.3 Zyklus der Aktivierung und Deaktivierung von ArfGTPasen.** Die Aktivierung der Arf GTPasen erfolgt durch die Ablösung von GDP und die Bindung von GTP, vermittelt durch ArfGEF Proteine. Im GTP gebundenen Zustand interagiert die ArfGTPase mit klassischen Effektoren, wie Oberflächenproteinen von Vesikeln und Membranlipid modifizierenden Enzymen. Die schwache intrinsische Hydrolysefunktion der ArfGTPasen wird durch die ArfGAPs katalysiert. Die Aktivierung und Deaktivierung der ArfGTPasen wird zusätzlich durch Interaktoren der GEF und GAP Proteine und Effektoren, die spezifisch mit der GDP gebundene Form der GTPase interagieren, beeinflusst. (modifiziert nach (Donaldson und Jackson, 2011).

## 1.6. Centaurine in *Drosophila melanogaster*

In *Drosophila* wurden die Homologe der humanen Centaurin Familie, Centaurin  $\alpha$  (*Drosophila*: *cenG1A*, CG8243), Centaurin  $\beta$  (*cenB1A*), Centaurin  $\gamma$  (*cenG1A*) und Centaurin  $\delta$  (CG4937/ RhoGAP15B) bisher nicht auf eine mögliche Funktion als Regulatoren von Arf GTPasen im Insulinsignalweg hin untersucht (Bernards, 2003). Das Centaurin  $\delta$  Sequenzhomolog, CG4937, wurde kürzlich als putatives RhoGAP identifiziert und wird in der Beinscheibe exprimiert (Greenberg and Hatini, 2011).

Um ArfGAPs im Insulinsignalweg zu identifizieren, welche putative Gegenspieler für das ArfGEF *steppke* darstellen, wurde ein RNAi Screen in SL2 Zellen durchgeführt (Gündner, 2008). In diesem Screen wurde systematisch ein Knockdown aller Gene, die für eine ArfGAP Domäne kodieren, durchgeführt. Anschließend wurde die 4E-BP Expression in den entsprechenden Zellen untersucht. Bei 4E-BP handelt es sich um

einen wichtigen Effektor des Insulin/Tor Signalnetzwerkes und ein bekanntes Zielgen des Transkriptionsfaktors FOXO. 4E-BP ist ein Translationsinhibitor, der eine verringerte und stark selektive Translation induziert, um den Organismus an nachteilige Umweltbedingungen anzupassen (Teleman et al., 2005). Unter Normalbedingungen, wenn Insulin im Medium vorhanden ist, wird die 4E-BP Expression reprimiert. Entzieht man den Zellen Insulin, verstärken diese als Anpassungsreaktion die 4E-BP Expression. Der Knockdown des ArfGEFs *steppke* führt bei Zellen unter Normalbedingungen zu einer erhöhten 4E-BP Expression, da die Weiterleitung des Insulinsignals gestört ist (Miron et al., 2003; Fuss et al., 2006). Im Gegensatz dazu zeigte der Knockdown der beiden Centaurin  $\alpha$  und  $\gamma$  Sequenzhomologen, CG8243 und *cenG1A*, jeweils eine reprimierte 4E-BP Expression, wenn kein Insulin im Medium vorhanden war (Gündner, 2008). Somit scheint der Knockdown der beiden putativen ArfGAPs eine Aktivierung der Insulinsignalkaskade und damit die Repression der 4E-BP Expression, unabhängig von Insulin, zu induzieren. Diese Reaktion entspricht der erwarteten Gegenspielerfunktion von *steppke*.

Der Knockdown des *cenB1A* Gens zeigte keine Veränderung der 4E-BP Expression und wurde deshalb nicht weiter untersucht.

Für das CG8243 wurde mit Hilfe Flp/FRT basierter Rekombination eine Nullmutante generiert und untersucht (Wegner, 2008; Sindscheid, 2010). Dabei konnte gezeigt werden, dass CG8243 Mutanten keine offensichtlichen Phänotypen zeigen, homozygote männliche CG8243 Mutanten jedoch infertil sind. Dieser Phänotyp deutet daraufhin, dass CG8243 ein putatives ArfGEF für Arf6 ist, da Drosophila Arf6 Nullmutanten ebenfalls keine äußerlichen Phänotypen zeigen, jedoch männliche Mutanten durch eine gestörte Spermatogenese infertil sind (Kramer et al., 2003; Dyer et al., 2007).

Für *centaurin gamma* (*cenG1A*) gibt es neben dem RNAi Screen noch weitere Hinweise, dass es eine Komponente des Insulinsignalweges darstellen könnte. Es konnte bereits gezeigt werden, dass *centaurin gamma* nach einer Insulinstimulation in Kc-Zellen transkriptionell herunterreguliert wird und im Promotorbereich für FOXO Bindestellen (FHREs = Forkhead Response Elements) kodiert (Jünger et al., 2003; Puig, 2003). Zusätzlich zeigen Yeast-two-Hybrid Experimente eine mögliche Interaktion mit der Akt Kinase, welche ein wichtiger Signalüberträger der Insulin/TOR Signalkaskade ist (Stark, 2006).

## 1.7. Zielsetzung

Im Rahmen dieser Arbeit sollte mittels *loss-* und *gain-of-function* Studien die biologische Funktion des *Drosophila* Gens *centaurin gamma*, welches zuvor in einem Screen nach putativen ArfGAP Proteinen im Insulinsignalweg identifiziert wurde, untersucht werden (Gündner, 2008).



## 2. Material

### 2.1. Allgemeine Materialien

#### 2.1.1. Chemikalien

Soweit nicht anders angegeben, waren alle Verbrauchskemikalien von der Qualität *pro analysis* und wurden von folgenden Firmen bezogen: Merck Euro Lab (DE), Roth (DE), und Sigma-Aldrich (DE)

#### 2.1.2. Verbrauchsmaterialien

Allgemeiner Laborbedarf	Faust (Meckenheim, DE)
Plastikwaren	Roth (Karlsruhe, DE), Greiner (Solingen, DE)
Reaktionsgefäße	Eppendorf (Hamburg, DE)
<i>Realtime</i> PCR-Platten	BIO-RAD (DE) , HERCULES (USA)

#### 2.1.3. Geräte

Autoklav	H+P Varioklav Dampfsterilisator EP-2
Bakterienbrutschrank	Memmert Model 400
Binokular	Zeiss Stemi 2000
Dispergiergerät	Ultra-Turrax T18 basic, IKA Werke GmbH
Drehrad	Snijders test-tube-rotator
Elektropipette	Accu-Jet, Brand
Fliegeninkubatoren	RUMED
Gelelektrophorese (SDS)	BioRad Electrophoresis
Gel-Dokumentation	Biozym Alpha Digi Doc
Homogenisator	Precellys 24 Peqlab
Mikroskope	Zeiss LSM 710

Mikrowelle	Panasonic
PCR-Maschine	BIORAD C1000/ S1000 Thermal Cycler
PCR-Maschine ( <i>Realtime</i> )	iQ5 Cycler BioRad
PH-Messgerät	Calimatic
Pipetten	Eppendorf
Spannungsgeräte	Agaroseelektrophorese: BioRad Power Pac Basic
	Polyacrylamidgelelektrophorese: BioRad Power Pac 3000
Spectrophotometer	Nanodrop 2000 (Peqlab) ; Gene Quant 100
Thermomixer	Eppendorf Thermomixer comfort
Thermoschüttler	Unitron HT Schüttler, Infors AG
Vakuumtrockner	Savant Speed-Vac SPD 111 V
Vortexer	Vortex Genie2
Waage	KERNew 4200-2NM
Wasserbad	GFL 1002 - 1013
Wirbelstrommischer	Vortex Genie 2, Scientific Industries
Zentrifugen	Beckmann Coulter Allegra X-15R
	Beckmann Coulter Avanti J-26-XP
	Eppendorf Centrifuge 5415 D (Tischzentrifuge)
	Eppendorf Centrifuge 5415 R (Kühl-Tisch-zentrifuge)

#### 2.1.4. Verwendete Software

Alpha Digi Doc (Alpha Innotech)
Illustrator CS3 (Adobe)
Image J 1.43 (Wayne Rasband, NIH)
iQ5 optical system software (Bio-RAD)
Microsoft Office 2011 (Mac)
XLSTAT (Addinsoftware, Excel)

Photoshop CS3 (Adobe)
Serial Cloner 2.1

## 2.2. Puffer und Lösungen

Falls nicht anders angegeben, wurden alle Puffer, Lösungen und Medien mit doppelt deionisiertem und autoklaviertem Wasser hergestellt. Bei Lösungen, die als konzentrierte Stammlösung angesetzt wurden, ist der Konzentrationsfaktor angegeben. Bei Lösungen, die nicht bei Raumtemperatur aufbewahrt wurden, ist die Lagertemperatur angegeben.

Agarose	1-1,5 % Agarose in TAE
Ampicillin-Lösung	50 µg/ml (-20 °C)
Ammoniumpersulfat (APS)	10 % Ammoniumpersulfat (-20 °C)
AP-Puffer	92,9 mM Tris (pH 9,5) 46,47 mM MgCl <sub>2</sub> 92,9 mM NaCl 0,092 % Tween20 0,93 mM Levamisol
Detektionslösung (DC)	15,6 g Kupfersulfat-Pentahydrat 9,6 ml konz. Phosphorsäure ad 100 ml mit H <sub>2</sub> O
Blockierungslösung	5 % Ziegenserum in PBT
DNA-Ladepuffer (5x)	0,1 % Bromphenolblau 0,1 % Xylen Cyanol FF 30 % Glycerol
EDTA	0,5 M EDTA, pH 8,0
Fixierungslösung	4 % Formaldehyd (ultrapure) oder 4% PFA in 1x PBS
Glycinlösung (pH 2,6)	0,1 M Glycin
HYBE	50% deionisiertes Formamid 5x SSC 50 µg/ml Heparin

Material

---

	100 µg/ml Heringssperma-DNA 10 µg/ml tRNA 0,1% Tween-20
HYBE-B	50 % Formamid 5x SSC
Insulin	rekombinantes humanes Insulin (10 mg/ml)
Karbonatpuffer	120 mM Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> 80 mM NaHCO <sub>3</sub> (pH ad 10,2)
Lithiumchlorid	4 M LiCl (-20 °C)
Lysozym	10 mg/ml in TE Puffer
Nippaginlösung	10 % 4-Hydroxybenzoesäure-Methylester in 70 % Ethanol
Natriumacetat pH 6,0 (bzw. 7,0)	3 M NaAc
oilredO Färbelösung	6 ml oilRedO Stammlösung (0,1% oilRedO in Isopropanol) 4 ml dd H <sub>2</sub> O (durch einen 0,45 Filter steril filtriert)
PBS (20x)	2,6 M NaCl 140 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 60 mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ; pH 7,4
PBT	0,1 % Tween20 in 1x PBS
Protein Probenpuffer (5x; pH 6,8)	500 mM TrisHCl 50 % Glycerin 15 % SDS 10 % β-Mercaptoethanol 0,5 % Bromphenolblau
Proteinase K Stammlösung	20 mg/ml in DEPC Wasser/Glycerin (1:1)
SDS	10 % SDS
SDS-PAGE Laufpuffer	25 mM Tris 192 mM Glycerin 0,1 % SDS



---

Material

---

Sammelgelpuffer	0,5 mM Tris-HCl 0,4 % SDS
SB Puffer	10 mM Tris (pH 8,2) 25 mM NaCl 1mM EDTA 200 µg/ml Proteinase K
Stoppuffer	0,2 mM NaOAc 1% Hac (ad pH ad 6,0)
Trenngelpuffer	1,5 M Tris-HCl pH 8,8 0,4 % SDS
TAE	40 mM Tris Acetat (pH 8,0)
TBS	0,01 M TrisHCl pH 7,5 0,15 M NaCl 0,05 % Tween20
TELT	50 mM Tris ( pH 7,5) 62,5 mM EDTA 2,5 M LiCl 0,4 % Triton X 100

## 2.3. Kits, Standards und Enzyme

### 2.3.1. Kits

Bezeichnung	Hersteller
BCA Protein Assay Kit	Pierce, Rockford (USA)
DIGoxygenin RNA Labeling Kit	Roche, Mannheim
ECL Western Blotting Substrate	Pierce, Rockford (USA)
GTPase Assay Kit	Innova Biosciences (GB)
iQ SYBR Green Supermix	BIO-RAD, HERCULES (USA)
Ni-NTA Beads	Invitrogen
Nucleobond AX 100	Macherey-Nagel, Düren
NucleoSpin Extract II	Macherey-Nagel, Düren
NucleoSpin RNA II	Macherey-Nagel, Düren
Quantitect cDNA synthesis kit	Qiagen, Hilden
Ribomax, T7 in vitro transcription kit	Promega, Madison (USA)
TOPO TA-cloning kit	Invitrogen
Vectashield	Vectorlabs

### 2.3.2. Standards

1 kb DNA Ladder Mix	New England Biolabs (USA)
Precision Plus Protein Standard	BioRad (DE)

### 2.3.3. Enzyme

Go Taq Polymerase	Promega (USA)
KOD Polymerase	Novagen (USA)
Lysozym	Roth (DE)
Restriktionsendonukleasen	New England Biolabs (USA)

T4-DNA Ligase	New England Biolabs (USA)
Proteinase K	Sigma Aldrich (USA)
RNase A	Sigma Aldrich (USA)

## 2.4. Antikörper

Bezeichnung	Antigen	Verdünnung	Herkunft	Hersteller
α – Ank-XL2	Ankyrin-2	1: 1000	Kanninchen	Koch et. al, 2008
α – brp	nc82	1: 100	Maus	DSHB Iowa
α – DIG	Digoxigenin	1:1000	Schaf	Roche
α – Dlg	Discharge	1: 100	Maus	DSHB Iowa
α – GluRIID	ESLKTDSSEENMPVED (Peptid)	1: 400	Kanninchen	Schmid et al., 2007
α – HA	Hämagglutinin Tag	1: 100	Ratte	Roche
α – HIS	Histidin Tag	1: 2000 (Western Blot)	Maus	Santa Cruz
α – MHC	Myosin Heavy Chain	1: 50	Maus	DSHB Iowa
α – Myc	Myc Tag	1: 100	Maus	Santa Cruz
Phalloidin-Cy3	Actinzytoskelett	1:200	Ziege	Invitrogen
Alexa-488 Sekundär- antikörper	Maus/ Ratte/ Kanninchen	1:200	Ziege	Dianova
Cy3 Sekundär- antikörper	Maus/ Ratte/ Kanninchen	1:200	Ziege	Dianova

## 2.5. PCR Oligonukleotide

### 2.5.1. Konventionelle PCR

<b>insitu</b>		
insitu_ceng_exon5-10_fw	GCCTGTCAAAGATCCTCTC	Herstellung centg insitu Sonde
insitu_ceng_exon5-10_rev	ACACCCGACACCGACTTC	Herstellung centg insitu Sonde
Homologe Rekombination		
SacII_5homcenORF_1_fw	CCGCGGCAACTGGGAGAGCTTCT TGGG	Klonierung 5' Homologiearm cenORF
5homcenORF_NotI_1_rev	GCGGCCGCCTGTAAGGGAAAAAG ACGAAAAATCA	Klonierung 5' Homologiearm cenORF
AscI_3homcenORF_1_fw	GGCGCGCCATTAGTTAAAATTGAA ATAAGATAAGCGTGAAT	Klonierung 3' Homologiearm cenORF
3homcenORF_AvrII_1_rev	CCTAGGACCTCCGCGTGGGTTGA TA	Klonierung 3' Homologiearm cenORF
EcoRI_5homcenRB_1_fw	GAATTCAAAGATTTTCAAAGATAG TTATGATGACCA	Klonierung 5' Homologiearm cenRB
5homcenRB_NotI_1_rev	GCGGCCGCGTGGATGAAGAGCA GGTACAGTGG	Klonierung 5' Homologiearm cenRB
AscI_3homcenRB_1_fw	GGCGCGCCGTAAGTCCCCCTCTA TTAGTGACCT	Klonierung 3' Homologiearm cenRB
3homcenRB_AvrII_1_rev	CCTAGGTCAGAAGTTGAGATGAG ATTGTTCAA	Klonierung 3' Homologiearm cenRB
EcoRI_5homcenRA_1_fw	GAATTCATGAGCCATAGTTTCCT CCCTT	Klonierung 5' Homologiearm cenRA
5homcenRA_NotI_1_rev	GCGGCCGCTCCACTTAACAAGTA CCGTGCAATTA	Klonierung 5' Homologiearm cenRA
AscI_3homcenRA_1_fw	GGCGCGCCGTGAGGTACAGTGTC GATGTAAAGC	Klonierung 3' Homologiearm cenRA
3homcenRA_AvrII_1_rev	CCTAGGGAGTCTGCGAGTTGCCT TTTAAG	Klonierung 3' Homologiearm cenRA

<b>Charakterisierung centg-/- Mutante</b>		
Homrec_cenORF5`_c haract_fw1	GTGAACAGTCAGGAATGGAC	Screening PCR 5`außerhalb Konstrukt bis attp site
Homrec_cenORF_attp _rev	ACTGAGAGAACTCAAAGGTT	Screening PCR 5`außerhalb Konstrukt bis attp site
pGX-ORF_del_fw	GCTGGGTGGATGCGGTAAT	Amplifiziert Fragment in Exon 5-10
pGX-ORF_del_rev	CGTACACAATACATAGGGGTGTAT	Amplifiziert Fragment in Exon 5-10
pGX-ORF_del_fw2	GACTATATGGACGATGTGCAC	Amplifiziert Fragment in Exon 5-10
pGX-ORF_del_rev2	TTGGCGCTCCACAGTCGA	Amplifiziert Fragment in Exon 5-10
cengen_rev2	GAGATTACAACAAGGCTGTACag	Produktgröße cenORF Transgen 3669 bp, Produktgröße genomisch: 3379 bp
Seq 5`hom out (cenORF5AFW1 ap)	TGCATTGTCCTCATTCCAAA	Sequenzierprimer 5`Übergang
Smg5_Seq_fw	CGCGAATGAGCAGCAAGTAG	Sequenzierprimer Nachbargen Smg5
Smg5_Seq_rev	ACTCCGCTGCTGCTTGCC	Sequenzierprimer Nachbargen Smg5
w+1_fw	GCTGCACATCGTCGAACAC	Forwardprimer 3`Bereich bindet in vivo im white Gen
w+2_fw	CGACGCAAGGAGTAGCC	Forwardprimer 3`Bereich bindet in vivo im white Gen
Homrec_cenORF3`_ charact_rev	GCATAGTCAAGTCGCTGGT	Reverse primer 3`Bereich bindet in vivo außerhalb des 3`cenORF Transgens
<b>allgemein</b>		
uas-cen-F1	GAACACGTCGCTAAGCGAAAG	Überexpressionskonstrukt
uas-cen-R1	CGCACTTATTGGCTTCCTCTG	Überexpressionskonstrukt
Gal4 F	TTGTCCCTGCTTTATGGTCGAT	Gal4

Gal4 R	TTTGTGCTGCATCGCTTAACAT	Gal4
Actin 5+	CGTCTTCCCATCGATTGT	actin genomisch
Actin 7-	GATGCCAGGGATCATGGT	actin genomisch

### 2.5.2. Quantitative *Realtime* PCR

act-sy-F1	GTGCACCGCAAGTGCTTCTAA	actin
act-sy-R1	TGCTGCACTCCAAACTTCCAC	actin
ceng_220211_sy_fw	AGGAAGAACGTAACCGGAGCAG	centg
ceng_220211_sy_rev	AGGTAGTGCCCAATCTTGACCAG	centg
<i>lip3</i> -sy-F1	TGAGTACGGCAGCTACTTCCCT	<i>lip3</i>
<i>lip3</i> -sy-R1	TCAACTTGCGGACATCGCT	<i>lip3</i>
rp49-real-F1	CTAAGCTGTGCGACAAATG	rp49
rp49-real-R1	GTTTCGATCCGTAACCGATGT	rp49
Smg5_sy_fw	CCAATGCGAATGTCAGCGCAAG	Smg5
Smg5_sy_rev	TGTGCTTAATGTTTGCGCCATTCC	Smg5
thor-Sy.F2	CATGCAGCAACTGCCAAATC	4E-BP
thor-Sy.R2	CCGAGAGAACAACAAGGTGG	4E-BP

### 2.6. Verwendete cDNA Klone

Bezeichnung	Herkunft (BDGP)	Vektor
LD11783 <i>ceng1A-RA</i>	<i>D. melanogaster</i> Embryonen	pBluescript_SK(-)
RE07016 <i>cenG1A-RB</i>	<i>D. melanogaster</i> Embryonen	pBluescript_SK(-)

## 2.7. Verwendete Vektoren

Bezeichnung	Referenz/ Hersteller
pCR II	Invitrogen
pUAST	Brand et al.,1994
pRK2	Huang et al. 2008
pGX-attp	Huang et. al. 2009
pTriEx-Neo	Novagen

## 2.8. Kultivierung von Bakterien

Zur Kultivierung von Bakterien wurden die folgenden Medien verwendet. Sämtliche Medien wurden bei 121 °C für 20 min autoklaviert.

Bezeichnung	Zusammensetzung
LB-Medium	10 g NaCl; 10 g Tryptophan; 5 g Hefeextrakt auf 1 l mit A.bidest auffüllen, mit NaOH auf pH 7,0 einstellen und autoklavieren
LB-Ampicillin Medium	LB-Medium mit 50 µg/ml Ampicillin
LB-Ampicillin Agar	LB-Amp-Medium mit 20 g Agar
LB-Chloramphenicol Medium	LB-Medium mit 30 µg/ml Chloramphenicol
LB-Chloramphenicol Agar	LB-Chloramphenicolmedium mit 30 µg/ml Chloramphenicol

## 2.9. Kultivierung von Fliegen

### 2.9.1. Verwendete Fliegenlinien

Homozygote Allele sind (außer +) nur einmal angegeben, heterozygote Allele sind durch „/“ getrennt.

Bezeichnung	Genotyp	Chromosom	Herkunft
<b>Gal4 Treiberlinien</b>			
act-GAL4	y[1] w[*]; P{w[+mC]=Act5C-GAL4}17bFO1/TM6B, Tb[1]	3	Bloomington Stammsammlung
tub-GAL4	y1 w*; P{tubP-GAL4}LL7/TM3, Sb1	3	Bloomington Stammsammlung
da-GAL4	w[1118]; P{da-GAL4.w[-]}3	3	Bloomington Stammsammlung
cg-GAL4	w[1118]; P{w[+mC]=Cg-GAL4.A}2		Bloomington Stammsammlung
lsp2-GAL4	y[1] w[1118]; P{w[+mC]=Lsp2-GAL4.H}3		Bloomington Stammsammlung
elav-GAL4	w[*]; P{w[+mC]=GAL4-elav.L}3	3	Bloomington Stammsammlung
repo-GAL4	w1118; P{GAL4}repo/TM3, Sb1	3	Bloomington Stammsammlung
MHC-GAL4	w[*]; P{w[+mC]=GAL4-MHC}3	3	Bloomington Stammsammlung
Mef2-Gal4, CD8-shaker-GFP	+/+; Mef2-Gal4,CD8-Sh-GFP 7A/ TM6c	3	Zito et al., 1999
elav-Gal4, CD8-shaker-GFP	+/+; elav-Gal4,CD8-Sh-GFP 1A	2	Zito et al. 1999
<b>UAS- Linien</b>			
UAS-cenRA-I	+/+ ;+/+ ; UAS-cenRA	3	im Rahmen dieser Arbeit generiert
UAS-cenRA-V	+/+ ;+/+ ; UAS-cenRA	3	im Rahmen dieser Arbeit generiert



UAS-cenRA-VI	+/+ ;UAS-cenRA; +/+	2	im Rahmen dieser Arbeit generiert
UAS-cenRAHA-I	UAS-cenRAHA;+;+	x	im Rahmen dieser Arbeit generiert
UAS-cenRAHA-II	UAS-cenRAHA;+/+ ;+/+	x	im Rahmen dieser Arbeit generiert
UAS-cenRAHA-III	UAS-cenRAHA;+/+ ;+/+	x	im Rahmen dieser Arbeit generiert
UAS-cenRAHA-IV	+/+ ;+/+ ; Uas-cenRAHA	3	im Rahmen dieser Arbeit generiert
UAS-cenRBMyc-I	+/+ ;+/+ ; UAS-cenRbMyc	3	im Rahmen dieser Arbeit generiert
UAS-cenRBMyc-II	+/+ ;+/+ ; UAS-cenRbMyc	3	im Rahmen dieser Arbeit generiert
UAS-cenRBMyc-III	+/+ ; UAS-cenRbMyc,+	2	im Rahmen dieser Arbeit generiert
<b>weitere Linien</b>			
UAS-RNAi-centg	+/+ ; KK 100123	2	Vienna RNAi Stammsammlung KK100123
Defizienz centg	w1118; Df(2L)BSC694, P+PBac{XP3.WH3}BSC694/SM 6a	2	Bloomington Stammsammlung BL 25456
centg-/- (centg9)	+/+ ; pGX-cenORF	2	im Rahmen dieser Arbeit generiert
centg23	+/+ ; pGX-cenORF	2	im Rahmen dieser Arbeit generiert

### 2.9.2. Fliegenfutter

Zur Herstellung des Standardfliegenfutters wurde der Fadenagar in einem Dampfkochtopf mit 8 l VE-Wasser aufgekocht. Gleichzeitig wurden die Hefe und das Maismehl in 3 l VE-Wasser zu einer homogenen Mischung verrührt, die zusammen mit dem Zuckerrübensirup zum kochenden Agar zugegeben wurde. Nach dem Abkühlen auf 60 °C wurde NIPAGIN-Lösung zum Futter hinzugeben und nach guter Durchmischung mittels einer Portionierungspumpe in Futterröhrchen aliquotiert.

<b>Standardfliegenfutter</b>	<b>Menge</b>
Fadenagar	80 g
Trockenhefe	165 g
Maismehl	815 g
Zuckerrübensirup	1 l
10%ige Nipagin-Lösung	200ml
H <sub>2</sub> O	Ad 11 l

### Hochkalorisches Futter

Für Experimente unter hochkalorischen Futterbedingungen wurde folgendes Futter, wie bei Musselman et al. beschrieben, verwendet:

<b>Kontrollfutter (NFD)</b>	<b>Menge (500 ml)</b>
Agar	5 g
Bierhefe	40 g
Hefeextrakt	10 g
Pepton	10 g
Saccharose	25,5 g
MgSO <sub>4</sub>	0,25 g
CaCl <sub>2</sub>	0,25 g
H <sub>2</sub> O	400 ml
Propionsäure	3 ml
10%ige Nipagin-Lösung	5 ml

<b>HSD (hoher Zuckeranteil)</b>	<b>Menge (500 ml)</b>
Agar	5 g
Bierhefe	40 g
Hefeextrakt	10 g

---

Material

---

Pepton	10 g
Saccharose	171 g
MgSO <sub>4</sub>	0,25 g
CaCl <sub>2</sub>	0,25 g
H <sub>2</sub> O	400 ml
Propionsäure	3 ml
10%ige Nipagin-Lösung	5 ml

<b>HFD (hoher Fettanteil)</b>	<b>Menge (500 ml)</b>
Agar	5 g
Bierhefe	40 g
Hefeextrakt	10 g
Pepton	10 g
Saccharose	25,5 g
MgSO <sub>4</sub>	0,25 g
CaCl <sub>2</sub>	0,25 g
GEFKO Palmfett	70,5 g
H <sub>2</sub> O	400 ml
Propionsäure	3 ml
10%ige Nipagin-Lösung	5 ml

### **Hungermedium**

Für die Hungerexperimente mit adulten Fliegen wurde eine 0,8 %ige Agarose/H<sub>2</sub>O Lösung, wie bei Villa-Cuesta et al. beschrieben, verwendet.

### **2.9.3. Apfelsaftagarplatten**

Für die Apfelsaftagarplatten wurden 85 g Agar in 4 l VE-Wasser aufgekocht und nach vollständiger Lösung auf 60 °C abgekühlt. Außerdem wurden 100 g Zucker in 1 l Apfelsaft gelöst und auf 60 °C erhitzt. Beide Ansätze wurden vermischt und 40 ml einer 10 %igen NIPAGIN-Lösung zugegeben. Anschließend wurde das Apfelsaftagargemisch in Petrischalen gegossen.

## **3. Methoden**

### **3.1. Isolierung und Aufreinigung von DNA und RNA**

#### **3.1.1. DNA Minipräparation**

##### **(DNA-Plasmidisolierung im kleinen Maßstab nach der TELT Methode)**

Eine vereinzelte, zuvor transformierte, *E.coli* Bakterienkolonie wurde von einer LB-Antibiotika-Platte in 1,5 ml LB-Antibiotika-Flüssigmedium überführt und ü.N. bei 37 °C in einem Schüttler inkubiert. 1 ml der üN Kultur wurde am folgenden Tag in ein 1,5 ml Eppendorfgefäß überführt und die Bakterien durch Zentrifugation pelletiert (13000 UpM, 1 min). Nach der Zentrifugation wurde der Überstand verworfen und das Bakterienpellet in 200 µl TELT und 20 µl Lysozym durch Vortexen resuspendiert. Zum Bakterienaufschluss wurde die Suspension 5 min bei RT und anschließend 5 min bei 97 °C inkubiert, bevor sie 5 min auf Eis inkubiert wurde. Um die präzipitierte genomische DNA und die Proteine zu pelletieren, wurde 20 min bei 13000 UpM und 4 °C zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand mit der Plasmid-DNA abgenommen, mit 100 µl Isopropanol versetzt und gemischt. Zum Pelletieren der gefällten Plasmid-DNA wurde für 5 min bei 13000 UpM (4 °C) zentrifugiert und anschließend der Überstand verworfen. Mit 500 µl 70 %igem Ethanol wurde das Pellet gewaschen und bei 13000 UpM und 4 °C für 5 min zentrifugiert. Nach Abnahme des Ethanols und einer zehnmütigen Trockenzeit wurde das Plasmid-DNA Pellet in 50 µl autoklaviertem Wasser gelöst.

#### **3.1.2. DNA Midipräparation**

##### **(Plasmidisolierung im mittleren Maßstab)**

Zur Isolierung von Plasmid-DNA aus Bakterien im mittleren Maßstab wurde das Nucleobond AX 100 Kit der Firma Macherey-Nagel verwendet. Die Isolation wurde entsprechend dem Protokoll des Herstellers durchgeführt.

### **3.1.3. DNA Gel-Elektrophorese, Aufreinigung und Konzentrationsbestimmung**

Zur Aufreinigung von DNA Fragmenten (PCR Produkte, Restriktionsfragmente) wurde eine Gelelektrophorese mit 1%iger Agarose durchgeführt. Die Agarose wurde dazu in 1x TAE gelöst und aufgekocht. Die Lösung wurde anschließend auf 60 °C abgekühlt und SyberSafe, zur Visualisierung der DNA, im Verhältnis 1:10000 zugegeben und in eine entsprechende Form gegossen. Das ausgehärtete Gel wurde anschließend mit der gewünschten DNA beladen und eine Elektrophorese unter Verwendung einer TAE gefüllten Kammer durchgeführt. Zur Visualisierung der DNA während der Elektrophorese wurde diese im Verhältnis 1:5 mit DNA-Ladepuffer gemischt. Zur Aufreinigung von DNA Fragmenten aus Agarosegelen wurde das Nucleospin extract II Kit von Macherey Nagel verwendet und die Aufreinigung entsprechend der Anleitung des Herstellers durchgeführt. Die Konzentration von DNA bzw. RNA wurde mit Hilfe des Nanodrop Systems bestimmt. Dazu wurde ein 1 µl der in H<sub>2</sub>O gelösten DNA bzw. RNA vermessen.

### **3.1.4. Präparation genomischer DNA aus adulten Fliegen (Kaliumacetat-Methode)**

Zur Präparation von genomischer DNA wurden 1-10 Fliegen in einem Eppendorf-Reaktionsgefäß für 2 min in flüssigen Stickstoff überführt, bevor diese mit 200 µl Lysispuffer und einem Pistill mechanisch zerkleinert wurden. Nach Zugabe von weiteren 200 µl Lysispuffer wurde das Lysat weiter mechanisch homogenisiert, bis nur noch Kutikulareste zu erkennen waren. Nach 30 min Inkubation bei 65 °C, wurden 230 µl 5 M KAc und 570 µl einer 6 M LiCl Lösung zugegeben. Das Lysat wurde 10 min auf Eis inkubiert und 15 min bei 13000 UpM zentrifugiert. 1 ml des Überstandes wurde in ein neues Eppendorfgefäß pipettiert, 600 µl Isopropanol zur Fällung der DNA zugegeben und für 15 min bei 13000 UpM pelletiert. Nach dem Waschen des DNA Pellets mit 500 µl 70 %igem Ethanol wurde es an der Luft getrocknet und in 50 -100 µl Wasser gelöst. Die gelöste genomische DNA kann bei -20 °C aufbewahrt werden.

### **3.1.5. Präparation genomischer DNA für Einzelfliegen-PCR Analysen**

Für eine Einzelfliegen-PCR wurde eine Fliege in einem 0,5 ml Eppendorf Gefäß für 2 min in flüssigen Stickstoff überführt und mit Hilfe einer Pipette mit Pipettenspitze mechanisch zerkleinert. Die Pipettenspitze enthielt 50 µl SB Puffer, welcher anschließend zu der zerkleinerten Fliege gegeben wurde. Nach einer 30 minütigen Inkubation bei 37°C und anschließenden 10 Minuten bei 85°C, wurde das Lysat für eine Minute bei 11000 UpM abzentrifugiert und auf Eis überführt. 2 µl des Lysats wurden direkt für eine PCR Reaktion eingesetzt.

### **3.1.6. RNA Isolierung aus Larven und adulten Fliegen**

Zur Isolierung und Aufreinigung von RNA aus Larven bzw. adulten Fliegen wurde das Nucleospin II RNA Kit (Macherey & Nagel) verwendet.

Um aus Larven RNA zu isolieren, wurden diese von den Apfelsaftagarplatten, auf denen sie zuvor gehalten wurden, in ein Siebchen überführt. In diesem Siebchen wurden sie mehrfach mit Wasser gespült, um evtl. Apfelsaftagar- bzw. Hefereste zu entfernen. Für die RNA-Isolierung wurden entweder ca. 40 L3 Larven bzw. ca. 100 L1 oder L2 Larven verwendet. Um die Larven zu lysieren, wurden diese mit 600 µl RA1 Puffer (+6µl β-Mercaptoethanol) versetzt und im Ultra-Turrax eine Minute homogenisiert. Alle weiteren Schritte wurden nach dem Protokoll des Herstellers durchgeführt.

Zur RNA Isolierung aus adulten Fliegen wurden pro Ansatz 5 Fliegen mit Hilfe von CO<sub>2</sub> betäubt und in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Anschließend wurde das Reaktionsgefäß für 5 Sekunden in flüssigen Stickstoff gehalten, die Fliegen unter Verwendung eines Pistills zerkleinert und der Lysispuffer aus dem Kit hinzugegeben. Alle weiteren Schritte wurden nach dem Protokoll des Herstellers durchgeführt.

### **3.1.7. cDNA Synthese**

Die cDNA Synthese für eine anschließende quantitative *Realtime* RT-PCR wurde mit dem Quantitect Kit von Qiagen durchgeführt.

Zum Entfernen noch evtl. vorhandener genomischer DNA wurden zu 150-500 ng RNA 1 µl gDNA wipeout-Puffer gegeben, auf 7 µl aufgefüllt und für 5 Min bei 42°C inkubiert. Für jede zu untersuchende RNA wurden jeweils zweimal 150-500 ng RNA vorgelegt. Ein Ansatz dient jeweils zur Kontrolle (-RT), ob eine Kontamination durch DNA besteht. Der zweite Ansatz (+RT) wird für die eigentliche Reverse Transkription verwendet. Beide Ansätze wurden mit 1 µl Primer-Mix und 1,5 µl RT-Puffer versetzt. Außerdem wurde zu den +RT-Proben 0,5 µl Reverse Transkriptase und zu den -RT-Proben 0,5 µl Wasser gegeben. Beide Ansätze wurden 30 min bei 42°C und anschließend 5 min bei 95°C inkubiert.

Danach wurden alle Ansätze mit Nuklease-freiem *A. bidest* auf 40 µl aufgefüllt und bei -20°C gelagert.

## **3.2. Klonierung von DNA Fragmenten**

### **3.2.1. Enzymatische DNA-Restriktion, Aufbereitung und Ligation**

Zur enzymatischen Restriktion von DNA Fragmenten wurden Restriktionsendonukleasen und deren entsprechende Pufferlösungen der Firma NEB verwendet. 1-2 µg der zu verdauenden DNA wurden in einer wässrigen 20 µl Reaktionslösung, die 2 µl des entsprechenden Enzympuffers und 3-5 Einheiten der Restriktionsendonuklease enthielt, für 2-4 h bei 37°C inkubiert.

Im Anschluss an die Restriktionsreaktion wurde die Reaktionslösung zur Trennung und Isolierung der gewünschten Fragmente für eine DNA-Elektrophorese verwendet. Nach der erfolgreichen Auftrennung im Agarosegel wurden die DNA Fragmente aus dem Gel ausgeschnitten und mit Hilfe des Nucleospin extract II Kits von Macherey Nagel isoliert und aufgereinigt.

Zur Ligation eines DNA Fragments in einen Plasmid Vektor wurde die T4 DNA Ligase der Firma NEB verwendet. Die DNA Fragmente wurden im Verhältnis 1:3 (Vektor zu Insert) in einer 20 µl Lösung eingesetzt und mit der Ligase und dem entsprechenden Puffer bei 16° über Nacht inkubiert.



### **3.2.2. TOPO-Klonierung**

Zur Zwischenklonierung von DNA Fragmenten bzw. zur Herstellung von Vektoren für insitu Hybridisierungssonden wurde das TOPO TA Cloning Kit von Invitrogen verwendet. Die DNA Fragmente, die in den pCRII-TOPO Vektor kloniert wurden, wurden zuvor mittels PCR hergestellt und amplifiziert. Bei Fragmenten, die unter Verwendung einer Polymerase mit Korrekturlesefunktion hergestellt wurde, wurde eine Taq Behandlung nach dem Protokoll des TOPO TA Cloning Kits vor der Klonierung durchgeführt. Anschließend wurde die Klonierung nach den Angaben des Herstellers durchgeführt.

### **3.2.3. Herstellung und Transformation von chemokompetenten Bakterien**

Zur Herstellung von chemokompetenten DH5 $\alpha$  E. coli Bakterien wurde ein 2 ml Aliquot der Bakterien in 50 ml LB Medium gelöst und über Nacht bei 37°C inkubiert und bis zu einer optischen Dichte von 0,5 (Wellenlänge 550 nm) wachsen gelassen. Anschließend wurden die Bakterien durch Zentrifugation (15 min/1000 UpM/4°C) pelletiert und in 17 ml eiskalter RF-1 Lösung resuspendiert und für 15 min auf Eis inkubiert. Nach einem zweiten Zentrifugationsschritt wurden die Bakterien in 4,5 ml RF-2 Lösung resuspendiert und nochmals für 15 min auf Eis inkubiert und in 100  $\mu$ l Aliquots in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80°C gelagert.

Um chemokompetente Bakterien mit einem Plasmid Vektor zu transformieren, wurde ein 100  $\mu$ l Aliquot der Bakterien auf Eis aufgetaut und anschließend 100 ng der Plasmid-DNA hinzugefügt. Die Lösung wurde dann für 20 min auf Eis inkubiert, bevor die Zellen für 1 min in einem Schüttler einem Hitzeschock (42°C) unterzogen wurden. Anschließend wurden die Bakterien wieder auf Eis überführt und 200  $\mu$ l LB Medium der Lösung hinzugefügt. Die Lösung wurde dann für 1 h bei 37° in einem Schüttler inkubiert, bevor die Bakterien auf LB-Agar Platten mit dem entsprechenden Antibiotikum ausgestrichen wurde.

### 3.2.4. Sequenzierung von DNA

Die Sequenzierung von DNA wurde von der Firma GATC (Konstanz, DE) durchgeführt. Die Proben wurden nach den Anforderungen von GATC aufbereitet.

## 3.3. PCR Techniken zur Amplifizierung von DNA

### 3.3.1. Primer für PCR Analysen

Die Primer für sämtliche PCR Analysen wurden von der Firma Invitrogen synthetisiert. Es wurden ausschließlich Primer ohne 5` oder 3`Modifikationen verwendet, welche entsalzen und lysophylisiert vom Hersteller bezogen wurden. Nach Erhalt wurden die Primer mit VE H<sub>2</sub>O auf eine Konzentration von 20pmol/μl eingestellt und für die Analysen verwendet.

### 3.3.2. PCR Analysen für Klonierungs- und Screening Experimente

Zur Amplifikation von DNA Fragmenten für Klonierungen wurde die KOD Polymerase, die eine Korrekturlesefunktion besitzt, verwendet. PCRs von Screening Experimenten wurden mit der GoTaq Polymerase durchgeführt.

#### a) TAq PCR

Reagenz	Menge
Matrizen-DNA	100 – 200 ng
5' Oligonukleotid	20 pm
3' Oligonukleotid	20 pm
5 x Green Go <i>Taq</i> -Puffer	5 μl
dNTP-Lösung (je 10 mM)	0,5 μl
Go- <i>Taq</i> Polymerase	0,25 μl
A. bidest (autoklaviert)	ad 25 μl

Phase	Temp.	Zeit
1. Initiale Denaturierung	95 °C	3 min
2. Denaturierung (zyklisch)	95 °C	30 Sek.
3. Primeranlagerung (zyklisch)	58-62 °C	45 Sek.
4. Elongation (zyklisch)	72 °C	1 min pro kb
5. 2.-5. Phase 30 x wiederholen		
6. Terminale Elongation	72 °C	5 min
7. Kühlung	12 °C	dauerhaft

### b) KOD-PCR

Reagenz	Menge
Matrizen-DNA	100 – 200 ng
5' Oligonukleotid	0,3 µM final
3' Oligonukleotid	0,3 µM final
10x KOD-Puffer	5 µl
dNTP-Lösung (je 0,2 mM)	5 µl
MgSO <sub>4</sub>	1,5 mM final
KOD Hotstart Polymerase	1 µl (0,02 U/µl)
A. bidest (autoklaviert)	ad 50 µl

Phase	Temperatur	Zeit
1. Initiale Denaturierung	95 °C	2 min
2. Denaturierung (zyklisch)	95 °C	20 Sek.
3. Primeranlagerung (zyklisch)	58-62 °C	10 Sek.
4. Elongation (zyklisch)	70 °C	20s pro kb
5. 2.-5. Phase 26-29 x wiederholen		
6. Terminale Elongation	70 °C	5 min

7. Kühlung	12 °C	dauerhaft
------------	-------	-----------

Zur Erhöhung der PCR Stringenz wurden die Primeranlagerungstemperatur und –zeit sowie die Zyklenzahl variiert.

### 3.3.3. Quantitative *Realtime* RT-PCR Analysen

Quantitative *Realtime* RT-PCR Experimente wurden mit dem BioRad I-Cycler und dem iQ5 optischen System durchgeführt und mit der entsprechenden Software des Herstellers ausgewertet. Als DNA interkalierender Farbstoff, der durch das iQ5 System detektiert werden kann, wurde SYBR-Green (BioRad) eingesetzt. Die Gesamt-RNA wurde, wie bereits beschrieben, in cDNA umgeschrieben und anschließend für die quantitative *Realtime* RT-PCR im 96 Well Format verwendet. Die Reaktionen wurden in Triplikaten von je 25 µl durchgeführt. Die Expressionsdaten wurden mit Hilfe der Herstellersoftware nach der  $\Delta\Delta C_t$  Methode ausgewertet. Als Referenzen wurde die Expression der Haushaltsgene rp49 und Actin5c gemessen und Kontrollkonditionen untersucht. Die gezeigten Ergebnisse sind jeweils relativ zur Expression der Referenzgene und Kontrollkonditionen dargestellt. Jedes Experiment wurde unabhängig dreimal durchgeführt. Die Primer für die *Realtime* RT-PCR Analysen wurden jeweils vor der Verwendung einem Effizienztest unterzogen. Der Effizienztest basiert auf einer Verdünnungsreihe der cDNA von 1:1 bis 1:25. Für die Analysen wurden lediglich Primer verwendet, die bei einer Verdünnung von 1:25 noch eine Effizienz von über 80% zeigten. Zum Ausschluss von Primer-Dimeren wurde zusätzlich eine Schmelzkurvenanalyse durchgeführt. Um eine Kontamination der Primer, des Wasser bzw. des SYBRgreen-Mixes auszuschließen, wurde für jeden Primer ein Ansatz ausschließlich mit SybrGreen und Wasser verwendet.

Zyklus	Wiederholungen	Zeit	Temperatur
1	1	3 min	95°C
2	40	10 sek	95°C
3	40	30 sek	59°C
4	40	30 sek	72°C
Die Schritte 2-4 werden 40x wiederholt.			
5	1	1 min	95°C
6	1	1 min	55°C
7	81	30 min	55°C+0,5°C/Zyklus
Die Schritte 5-9 dienen der Schmelzkurvenanalyse.			

Komponente	Menge
+RT-oder -RT-Ansatz	1 µl
Primermix (genspezifisch)	1 µl
SYBRgreen-Mix	12,5 µl
nuklease-freies <i>A. bidest</i>	10,5 µl

### **3.4. Proteinbiochemie**

#### **3.4.1. Expression von HIS getagten Proteinen in Bakterien**

Ein Aliquot BL21 Gold Bakterien wurde jeweils mit einem pTriEx Konstrukt nach dem Standardprotokoll transformiert und in 500 ml LB Amp Medium (+ 1,5 % Glukose) für 14 h bei 28°C kultiviert. Anschließend wurden 500 ml LB Medium (+ IPTG) hinzugegeben (0,5 mM Endkonzentration an IPTG). Nach der Induktion wurden die Bakterien für weitere 2 h kultiviert und anschließend bei 5000 UpM für 10 min abzentrifugiert. Die pelletierten Bakterien wurden bei -20°C bis zur Aufreinigung aufbewahrt.

#### **3.4.2. Aufreinigung von HIS getagten Proteinen**

Zur Aufreinigung der getagten Proteine wurden die gefrorenen Bakterien in 20 ml PTB (+ 2 Roche Complete Tabletten , 1 mM PMSF, 1% Triton / Liter) resuspendiert und für 15 min bei 4°C inkubiert. Anschließend wurde 1 mg/ml Lysozym hinzugegeben und für weitere 15 min bei 4°C auf einem Schüttler inkubiert. Im nächsten Schritt wurde 25 U/ml Benzonase hinzugegeben und wieder für 15 min (4°C, Schüttler) inkubiert. Im Anschluss an die Sonifizierung (2 min, 0,5 s Impulse, auf Eis) wurde vorsichtig 1 ml Weinsäure zum Lysat hinzugegeben, für 5 min auf Eis inkubiert und für 30 min bei 10 000 g und 4°C abzentrifugiert. Der Überstand wurde in ein frisches 50 ml Falcon überführt und mit 2 ml einer 50 %igen Ni-NTA Lösung (pro Liter Bakterienkultur) auf einer Wippe gemischt (30 min, 4°C). Anschließend wurde das Gemisch auf eine Säule transferiert und fünf mal mit Puffer A gewaschen. Das getagte Protein wurde durch Zugabe von 2,5 ml Puffer B eluiert. Zur Entfernung des Imidazols aus der Proteinlösung wurde das Eluat über Nacht bei 4°C mit Puffer C dialysiert. Anschließend wurde das Protein unter Verwendung des Slide-a-lyzers (Invitrogen) aufkonzentriert.

### 3.4.3. Bestimmung der Proteinkonzentration

#### (BCA Test)

Zur Bestimmung der Proteinkonzentration wurde das BCA Protein Assay von Pierce verwendet. Die Messungen wurden entsprechend dem Protokoll des Herstellers durchgeführt. Als Kontrolle wurde jeweils der Puffer verwendet, in dem die zu vermessenden Proteine gelöst waren. Die Messung der Absorption wurde mit Hilfe des Nanodrop Spektrophotometers (ThermoFisher) durchgeführt.

### 3.4.4. SDS Gelelektrophorese

Die SDS (Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid) Gelelektrophorese wurde zur Auftrennung von Proteinen anhand ihres Molekulargewichts verwendet. Zur effizienten Auftrennung der Proteine wurden Trenngele mit verschiedenen Acrylamidkonzentrationen verwendet (10-15%), was zu einer Veränderung der Porengröße führt. Bevor das Gel mit den Proben beladen wurde, wurden diese mit SDS-Ladepuffer versetzt und für 5 min bei 95°C aufgekocht. Die Elektrophorese wurde mit Hilfe einer BioRad Elektrophoreseapparatur, die mit SDS-Laufpuffer gefüllt war, durchgeführt (Spannung 80-120 V).

	12 % Trenngel (2 Gele)	5 % Sammelgel (2 Gele)
H <sub>2</sub> O bidest	6,4 ml	6,1 ml
40% Acrylamid Lösung	4,7 ml	1,25 ml
Trenngelpuffer	3,75 ml	-
Sammelgelpuffer	-	2,52 ml
TEMED	6 µl	10 µl
APS (10 %)	150 µl	100 µl

### **3.4.5. Western Blot**

Proteine, die mittels SDS-PAGE aufgetrennt wurden, wurden zur späteren Immundetektion vom Gel auf eine PVDF Membran übertragen. Dazu wurde die Membran mit Methanol aktiviert und in Äquilibriumspuffer überführt. Unter Verwendung des Nass-Blot-Verfahrens wurde der Proteintransfer in einem Blottank durchgeführt. Alle verwendeten Komponenten wurden 5 min in Transferpuffer äquilibriert. Der Blot-Aufbau bestand aus einem Schwamm, einer Lage Whatman Filterpapier, dem Polyacrylamidgel, der aktivierten Membran, einer weiteren Schicht Whatman Filterpapier und einem Schwamm. Das Gel wurde in der Blotkammer zur Kathode, die Membran zur Anode orientiert. Der Transfer wurde für 1 h bei 100 V und 4 °C durchgeführt. Zum Nachweis des erfolgreichen und gleichmäßigen Transfers der Proteine aus dem Gel auf die Membran wurde eine Ponceaufärbung durchgeführt.

### **3.4.6. ECL Immundetektion**

Nach dem erfolgreichen Transfer der Proteine auf die Membran, wurde diese dreimal für 10 Min mit TBST gewaschen und für eine Stunde mit TBST+ 5% Milchpulver blockiert. Anschließend wurde der Primärantikörper gegen das Wunschprotein zur Membran gegeben und üN bei 4°C inkubiert. Am nächsten Tag wurde die Membran dreimal für 5-10 Min mit TBST gewaschen und danach der HRP gekoppelte Sekundärantikörper für 1 h hinzugegeben. Nach weiteren drei Waschschritten wurde ECL als Substrat für die HRP auf die Membran gegeben und die Chemilumineszenz unter Verwendung eines Röntgenfilms im Curix60 Entwickler detektiert.

### **3.5. GTPase Assay**

Für die GTPase Assays wurde das 96 Well GTPase Assay Kit von Innova Biosciences verwendet. Der Assay wurde nach dem Protokoll des Herstellers durchgeführt. Die GTPase Aktivität wird dabei kolorimetrisch bestimmt. Das Kit enthält speziell aufgereinigtes GTP, welches das Hintergrundsignal reduziert und ein P<sub>i</sub>ColorLock Reagenz, welches ein mögliches Hintergrundsignal durch nicht enzymatische GTP Hydrolyse unterdrückt. Die Auswertung des Assays wurde mit



einem 96 Well Plattenlesegerät bei einer Wellenlänge von 590-660nm durchgeführt. Da der GTPase Assay unspezifisch anorganisches Phosphat detektiert, wurden sämtliche verwendeten Reagenzien auf eine mögliche Phosphat Kontamination getestet und als Phosphatfrei bestätigt. Außerdem wurde ausgeschlossen, dass die rekombinante GTPase Domäne endogenes GTP gebunden hat. Während den Inkubationsschritten konnte keine Aktivität festgestellt werden.

### **3.6. Lipidanalysen**

#### **3.6.1. Lipidextraktion, Auftrennung und Detektion**

##### **(Dünnschichtchromatografie)**

Zur Extraktion der Gesamtlipide aus adulten Fliegen wurden jeweils entweder 10 männliche oder 10 weibliche Fliegen in ein 2 ml Precellys Homogenisierungsgefäß mit Beads überführt. Anschließend wurden 250 µl einer 2:1 Methanol/ Chloroform Mischung hinzugegeben und nach dem Standardprotokoll für RNA (2; 5500/ 2x25 sec/ 0.5) im Precellys Homogenisator homogenisiert. Der Überstand wurde in ein 1,5 ml Eppendorf Gefäß überführt und auf Eis aufbewahrt.

Die Auftrennung der Lipide erfolgte mittels einer Dünnschichtchromatografie. Dazu wurden jeweils 5 µl der zuvor generierten Lysate in Triplikaten auf eine Kieselgelplatte (Trägermaterial: Aluminium/ kein Fluoreszenzindikator) aufgetragen. Als mobile Phase diente eine 4:1 Hexan/ Ethylether Mischung. Für eine gleichmäßige Auftrennung wurde die Platte solange mit der mobilen Phase inkubiert bis die Laufrfront eine zuvor eingezeichnete Markierung (5 cm) erreicht hatte. Anschließend wurde die Platte mit Hilfe eines Föns getrocknet.

Zur Detektion der Lipide wurde die Platte in ein Bad mit der Detektionslösung ( 15,6 g Kupfersulfat-Pentahydrat, 9,6 ml konz. Phosphorsäure, ad 100 ml mit H<sub>2</sub>O) getaucht und anschließend bei 180°C in einem Ofen für 10 min inkubiert. Durch die Verkohlungsreaktion werden die Lipide als braun-schwarze Banden sichtbar. Als Standard zur Identifizierung der Triacylglyceride anhand ihrer Laufhöhe wurde handelsübliche Butter, die ebenfalls mit der Methanol/Chloroform Mischung homogenisiert wurde, verwendet.

Zur densitometrischen Auswertung wurden die Platten eingescannt und mit der ImageJ Software ausgewertet.

Zur Messung der Triacylglyceridmenge während des Hungerexperiments wurden Fliegen, die 0h, 20h bzw. 28h gehungert wurden, verwendet.

Zur Messung der TAG Menge unter hochkalorischen Futterbedingungen wurden 7 Tage nach dem Schlüpfen gealterte Fliegen jeweils 7 Tage auf Standardfutter oder HFD gehalten und anschließend untersucht.

### **3.6.2. Oil Red O Färbung**

Um die Speicherlipide (TAGs) im Fettkörper von Larven sichtbar zu machen, wurde der Fettkörper von Larven des dritten Larvenstadiums in PBS frei präpariert und für 1h in einem 1,5 ml Eppendorfgefäß mit 4% PFA auf einem Drehrad fixiert. Anschließend wurden die fixierten Präparate zweimal mit H<sub>2</sub>O gewaschen und die oil Red O Färbung für 30 min mit der oil Red O Färbelösung auf dem Drehrad durchgeführt. Nach der Färbung wurden die Präparate zweimal mit H<sub>2</sub>O gewaschen. Anschließend wurden die präparierten Fettkörper mit Fluoromount eingebettet und direkt Aufnahmen an einem Lichtmikroskop erstellt, da die Färbung nur für wenige Stunden stabil ist.

## **3.7. Fluoreszenz- und histochemische Färbungen**

### **3.7.1. Fixierung von Embryonen**

Zur Fixierung von Embryonen für Immunfluoreszenzfärbungen und in situ Hybridisierungen wurden Embryonen von einer Apfelsaftagarplatte mit Hilfe eines Pinsels in ein kleines Sieb überführt und für 3 min mit einer 4%igen Natriumhypochloritlösung gespült. Anschließend wurden die Embryonen ausgiebig mit Wasser gewaschen und in ein Fixiergläschen mit 4 ml Heptan überführt. Zum Fixieren der Embryonen wurden 4 ml 4 %iges Paraformaldehyd zugegeben und die Gläschen für 20 min bei höchster Stufe auf einem Schüttler inkubiert. Die fixierten Embryonen sammelten sich zwischen den beiden Phasen und die untere Phase konnte mit einer Pasteurpipette abgenommen werden. Anschließend wurden 5 ml Methanol zugegeben und die Gläschen für 30 Sekunden geschüttelt. Nachdem sich

die Embryonen am Boden des Gläschens gesammelt hatten, wurde die restliche Flüssigkeit abgenommen und 5 ml Methanol hinzugegeben. Die Embryonen wurden in Methanol bei -20°C bis zur Verwendung aufbewahrt.

### **3.7.2. Filetpräparation von Larven**

Zur Untersuchung der Körperwandmuskeln und den innervierenden Motorneurone wurden Filetpräparationen von wandernden Larven des dritten Larvenstadiums angefertigt. Dazu wurde eine Larve mit einer Pinzette auf eine Gummiplatte, auf der sich ein Tropfen PBS befand, transferiert. Die Larve wurde mit jeweils einer Insektennadel anterior (zwischen den Mundhaken) und posterior (zwischen den Haupttracheen), leicht gestreckt, fixiert. Anschließend wurde die Epidermis im posterioren Bereich von oben, mittig, mit einer Präparierschere leicht eingeschnitten und die Epidermis ausgehend von diesem posterioren Schnitt nach anterior vorsichtig aufgeschnitten. Die inneren Organe wurden dann mit einer Pinzette entfernt, sodass lediglich die Epidermis und das Gehirn übrig blieben. Danach wurde die Epidermis aufgeklappt und jeweils die vier Ecken mit einer Insektennadel fixiert. Die Epidermis sollte möglichst glatt und straff fixiert sein. Vor der chemischen Fixierung wurden die Präparate auf der Gummiplatte dreimal mit PBS gespült und anschließend für 15 Min mit 4 %igem PFA fixiert (auf Eis, Abzug). Nach der Fixierung wurden die Präparate wieder dreimal mit PBS gespült und vorsichtig die sechs Insektennadeln entfernt. Für die folgende Antikörperfärbung wurden die Filetpräparate in 1,5 ml Eppendorfgefäße mit 0,1 % PBT (Triton X 100) überführt. Bei einer erfolgreichen Fixierung falteten sich die Filetpräparate im PBT wieder auf.

### **3.7.3. Fluoreszenzfärbung von Filetpräparaten**

Für die Antikörperfärbung wurden fixierte Filetpräparate viermal mit 500 µl PBT (0,1 % Triton X 100) für 15 Min gewaschen. Anschließend wurden die Präparate mit 500 µl PBT + 5% Ziegen Serum für eine Stunde blockiert, bevor die Primärantikörper in 500 µl PBT + 5% Ziegen Serum üN bei 4°C hinzugegeben wurden. Am nächsten Tag wurden die Präparate zur Entfernung von unspezifisch gebundenen Primärantikörpern viermal für 15 Min mit PBT gewaschen und anschließend mit 500 µl PBT + 5% Ziegen Serum für eine Stunde blockiert. Danach wurden die

Sekundärantikörper entsprechend den Primärantikörpern in einer Verdünnung von 1:200 hinzugegeben und für 1 h bei Raumtemperatur lichtgeschützt inkubiert. Im Anschluss an die Inkubation wurden die Präparate wieder viermal für 15 Min mit PBT gewaschen und anschließend 400 µl Glycerol (70% in PBS) auf die Filetpräparate gegeben und üN bei 4°C aufbewahrt. Am nächsten Tag wurden die Filetpräparate mit einer Pinzette aus dem Eppendorfgefäß auf einen Objektträger transferiert auf dem sich ein Tropfen (20 µl Glycerol) befand. Unter einem Mikroskop wurden die Präparate flach auf dem Objektträger ausgebreitet (Innenseite nach oben!) und das anteriore und posteriore Ende abgeschnitten, sodass das Präparat möglichst flach war. Anschließend wurde ein Deckglas vorsichtig über die Präparate gelegt und dieses mit Nagellack fixiert. Bis zur mikroskopischen Auswertung wurden die Präparate bei 4°C aufbewahrt.

#### **3.7.4. Markierung von in situ Sonden**

Die Markierung der in situ Sonden wurde mit dem DIG RNA Labeling Kit von Roche durchgeführt. Für die centg in situ Sonde wurde die Sequenz, die für die Exons 5-10 der centg cDNA kodiert, in den pCR-II-TOPO Vektor kloniert, welcher sowohl Sp6 als auch T7 Promotoren kodiert. Zur Herstellung der sense Sonde, wurde der Vektor mit dem Restriktionsenzym HindIII linearisiert und 1 µg für die Markierungsreaktion eingesetzt ( Details siehe Herstellerprotokoll). Die sense Sonde wurde durch die T7 RNA Polymerase amplifiziert und die antisense Sonde durch die Sp6 RNA Polymerase. Im Anschluss an die Markierungsreaktion wurde die RNA durch die Zugabe von 2,5 µl 4M LiCl und 75 µl kaltem Ethanol für 30 min bei -80°C gefällt. Danach wurde die RNA bei 11 000 Upm (4°C) abzentrifugiert und der Überstand abgenommen. Das Pellet wurde mit 50 µl kaltem Ethanol (70%) gewaschen, in 50 µl RNase freiem Wasser gelöst und aliquotiert.

Für die centg in situ Sonde wurde zusätzlich ein Karbonatverdau zur Zerkleinerung der Sonde durchgeführt. Dazu wurde zu einem 25 µl Aliquot der markierten RNA 25 µl Karbonatpuffer (2x) hinzugegeben und für 10 min bei 70°C in einem Heizblock inkubiert. Anschließend wurde die Reaktion durch die Zugabe von 50 µl Stopplösung beendet.

### 3.7.5. Histochemische in situ Hybridisierung

In situ Hybridisierungen mit den DIG markierten Sonden wurden sowohl für Embryonen als auch für Larvengewebe nach dem folgenden Protokoll durchgeführt.

Für in situ Hybridisierungen an Larvengewebe wurden die Gewebe in PBT frei präpariert und für 1 h in Fixierlösung (1ml 0,5 PBT + 100 µl Formaldehyd) fixiert. Die in situ Hybridisierungen an Embryonen wurden mit Embryonen, die nach dem Standardprotokoll fixiert wurden, durchgeführt.

Nach der Fixierung wurden die Larvengewebe ausgiebig mit 0,5 PBT gewaschen (15, 15, 30, 30, 60 min), schrittweise in Methanol überführt (5min 30%, 5 min 70%) und üN in Methanol (100%) gelagert. Am nächsten Tag wurden die Gewebe wieder schrittweise in PBT überführt (5min 70%, 5 min 30%) und ausgiebig mit PBT (15, 15, 30, 30, 60 min) gewaschen. Anschließend wurden die Gewebe schrittweise in die Hybridisierungslösung überführt (jeweils 5 min, 60°C, 0,5 ml ; 1:1 PBT+HybeB / HybeB / 1:1 HybeB+Hybe). Mit der Hybridisierungslösung (Hybe) wurden die Gewebe für mind. 1 h bei 65°C prähybridisiert. Anschließend wurde das Hybe größtenteils abgenommen, 2 µl der RNA Sonde hinzugegeben und üN bei 65°C inkubiert. Am folgenden Tag erfolgten ein kurzer Waschschrift mit 250 µl Hybe und eine einstündige Posthybridisierung mit 500 µl Hybe. Danach wurden die Gewebe ausgiebig gewaschen (15, 15, 30, 30, 60 min) und durch die Zugabe der Blockierungslösung (0,5 PBT + 5% Ziegen Serum) für die anschließende Antikörperdetektion vorbereitet. Für die Antikörperdetektion wurde ein gegen das DIG Epitope gerichteter Sekundärantikörper, an den eine alkalische Phosphatase gekoppelt ist, verwendet. Der Antikörper wurde im Verhältnis 1:1000 in 0,5 PBT+Ziegen Serum auf die Gewebe gegeben und für 1h inkubiert. Anschließend wurden die Gewebe ausgiebig mit PBT (15, 15, 30, 30 min) gewaschen und in AP (Alkaline Phosphatase) Puffer überführt (10 min). Für die Färbereaktion durch die Alkaline Phosphatase werden 20 µl NBT/BCIP (ein künstliches Substrat der AP) in 980 µl AP Puffer gelöst und auf die Gewebe gegeben. Die Gewebe mit der Färbelösung wurden dann in Blockschälchen überführt, im Dunkeln aufbewahrt und regelmäßig auf eine blau-braune Färbung hin untersucht. Zum Abstoppen der Färbereaktion wurde die Färbelösung abgenommen und die Präparate in PBT gewaschen (5,5,15,15 min). Anschließend wurden die Gewebe schrittweise über eine EtOH Reihe entwässert (jeweils 5 min 30% EtOH/PBT, 70%, 100%) und üN in

EtOH aufbewahrt. Am folgenden Tag wurden die Präparate mit Fluoromount eingedeckelt und Aufnahmen generiert.

### **3.8. *In vivo* Untersuchungsmethoden**

#### **3.8.1. Fliegenhaltung**

Alle *Drosophila* Fliegenlinien wurden nach Standardmethoden gehalten (Roberts et al., 1986). Falls nicht anders angegeben wurden die Fliegen bei 18°C gehalten. Zur Amplifizierung wurden die Fliegen auf 25°C überführt, da eine Erhöhung der Temperatur eine Beschleunigung der Vermehrungsrate ermöglicht. Das Umsetzen der Fliegen in frische Futterröhrchen wurde bei 18°C nach 5 Wochen und bei 25°C nach 3 Wochen durchgeführt. Wurde in einem Entwicklungsstadium ein Hitzeschock durchgeführt, wurden die Embryonen bzw. Larven in einen Brutschrank (37°C) überführt.

#### **3.8.2. Fliegenkreuzungen**

Bei Etablierungs- oder Einzelkreuzungen wurden Weibchen mit einem dreifachen Überschuss an Männchen verpaart. Bei Einzelkreuzungen von Männchen wurden je vier bis fünf Weibchen verwendet. Weibchen, die in Kreuzungen verwendet werden sollten, wurden spätestens acht Stunden (bei 25 °C) nach dem Schlüpfen von den Männchen getrennt. 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.

#### **3.8.3. Herstellung 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 in  $W^{118}$ -Embryos injiziert. Nach der Injektion wurden die Embryonen 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  $W^{118}$  Fliegen rückgekreuzt. Die F1

Generation dieser Kreuzungen wurde nach  $w^+$ -Fliegen durchsucht. Gingen aus einer Kreuzung transgene rotäugige Tiere hervor, wurden diese isoliert und mit  $W^{1118}$  Fliegen rückgekreuzt, um nach zwei Kreuzungen weitere homozygote transgene Linien zu etablieren. Diese wurden anschließend mit einer entsprechenden Balancerlinie gekreuzt, um die Linie gegen Rekombination zu schützen und eine langfristige Haltung der Linie zu gewährleisten.

### 3.8.4. Bestimmung des P-Element-Insertions-Chromosoms

#### (Mapping)

Um zu bestimmen, auf welchem Chromosom die generierten transgenen Fliegen ein Konstrukt tragen, wurden die im Folgenden beschriebenen Kreuzungen durchgeführt.

Der erste Test erfolgte jeweils für das X-Chromosom. Werden transgene Männchen mit einer beliebigen  $w$ - Fliegenlinie gekreuzt und dabei in der F1 nur weibliche transgene Nachkommen ( $w^+$ ) erhalten, so ist das Transgen auf dem X-Chromosom inseriert. Um zu testen, ob die Insertion auf dem zweiten oder dritten Chromosom erfolgte, wurden zwei  $w$ - Fliegenlinien benutzt, in denen entweder das zweite oder das dritte Chromosom markiert ist:  $w ; If/CyO$  und  $w ; ; TM6B/MKRS,Sb$ . Zunächst wurden die Transgenen mit  $w ; If/CyO$  und  $w ; ; D/MKRS,Sb$  gekreuzt. Aus der F1 wurden  $w^+ Cy^-$  bzw.  $w^+ Sb^-$  Fliegen *inter se* verpaart und deren Nachkommen phänotypisch untersucht. Wurden in der F1 der  $w^+ Cy^-$  *inter se*-Kreuzung nur  $w^+$ -Fliegen und in der F1 der  $w^+ Sb^-$  *inter se*-Kreuzung  $w^+$ - und  $w$ - Fliegen gefunden, so musste die Insertion auf dem zweiten Chromosom stattgefunden haben. Wurde dagegen in der F1 der  $w^+ Cy^-$  *inter se*-Kreuzung  $w^+$ - und  $w$ -Fliegen und in der F1 der  $w^+ Sb^-$  *inter se*-Kreuzung nur  $w^+$ -Fliegen gefunden, so musste die Insertion auf dem dritten Chromosom stattgefunden haben.

### 3.8.5. Fliegenkreuzungen für das Ends-out Gene Targeting

Das *ends-out gene targeting* wurde in drei Kreuzungsschritten durchgeführt.

#### Targeting Kreuzung

Für die Targetingkreuzung wurde die Donorfliegenlinie in großen Fliegenröhrchen stark amplifiziert, sodass innerhalb von 72 h circa 1000 Jungfrauen gesammelt

werden konnten. Diese wurden dann mit ebenfalls circa 1000 frisch gesammelten Männchen der Targetinglinie gekreuzt.

Es wurden circa 30 mittlere Fliegenröhrchen mit jeweils 30 Jungfrauen der Donorlinie und 30 Männchen der Targetinglinie angesetzt. Diese Kreuzungen wurden alle 24 Stunden für eine Woche in neue Röhrchen umgetopft. Die abgelegten Eier entwickelten sich bei 25°C auf NFD Futter und an Tag 2 und 3 wurden jeweils 90 minütige Hitzeschocks (38°C; Wasserbad) durchgeführt.

### **Screening Kreuzung**

Für die Screeningkreuzung wurden die weiblichen rotäugigen Nachkommen der Targeting Kreuzung mit Männchen der Screeninglinie gekreuzt. Dazu wurden jeweils 15-25 Jungfrauen mit 5- 10 Männchen in mittlere Röhrchen mit NFD Futter verteilt (ca. 100 Röhrchen) und für 5 Tage täglich in neue Röhrchen transferiert. Die Röhrchen mit den sich entwickelnden Nachkommen wurden bei 27°C gelagert.

### **Balancing Kreuzung**

Die Nachkommen aus der Screening Kreuzung wurden mit der Balancerlinie yw; if/CyO; Sb/MKRS gekreuzt und Stämme mit der Mutation über dem CyO Balancer etabliert.

### **3.8.6. Sammeln von Embryonen und Larven**

Zum Sammeln von Embryonen wurden 50-100 1-7 Tage alte Fliegen in Ablagekäfige überführt, welche einseitig mit einem Gitternetz versehen sind und auf der anderen Seite geöffnet sind. Die offene Seite wurde, nachdem die Fliegen in den Käfig überführt worden waren, mit einer Apfelsaftagarplatte, auf welcher sich etwas frische Hefe befand, verschlossen. Die Fliegen wurden maximal 10 Tage lang in den Käfigen auf 25°C im Inkubator gehalten. Die Ablagezeit variierte je nach Experiment und dem gewünschten Alter der Embryonen zwischen zwei und zwölf Stunden. Zum Sammeln von Larven wurden jeweils 4 h Ablagen durchgeführt und anschließend die Platten mit einem Deckel im Inkubator gelagert bis die Larven das gewünschte Alter erreicht hatten. Um die Larven zu Sammeln wurde die Hefe, in der sich die meisten Larven befanden, in ein Sieb überführt und die Larven mit Hilfe von Leitungswasser aus der Hefe gewaschen.



### **3.8.7. Sortieren von Embryonen und Larven**

Um Embryonen oder Larven anhand ihres Genotypes zu sortieren, müssen die Fliegen, die für die Ablage verwendet wurden, heterozygot einen Fluoreszenzmarker kodieren, wie z.B. *twi-Gal4 x UAS-EGFP*.

Die gesammelten Embryonen konnten dann, anhand der Intensität ihrer Fluoreszenz, entsprechend ihres Genotyps sortiert werden. Ist ein starkes Fluoreszenzsignal zu erkennen, tragen die Embryonen den Marker homozygot. Eine schwache Fluoreszenz steht für Heterozygotie und keine Fluoreszenz zeigt an, dass die Embryonen den Marker nicht exprimieren. Das Sortieren der Embryonen wurde mit ca. zwanzig Stunden alten Embryonen unter einem Fluoreszenzbinokular durchgeführt. Je nach Experiment wurde eine bestimmte Anzahl an Embryonen (10-200) mit dem gewünschten Genotyp mit einem Pinsel auf eine frische Apfelsaftagarplatte überführt. Larven wurden nach dem gleichen Prinzip anhand der Fluoreszenzintensität sortiert.

### **3.8.8. Gewichtsbestimmung bei adulten Fliegen**

Das Körpergewicht wurde mit Hilfe einer Feinwaage (Sartorius) bestimmt. Dazu wurden jeweils 10 7-Tage alte männliche oder weibliche Fliegen mit  $\text{CO}_2$  betäubt und in ein zuvor gewogenes 1,5 ml Eppendorfgefäß überführt und anschließend gewogen.

### **3.8.9. Durchführung von Überlebensexperimenten unter Hungerbedingungen**

Für die Hungerexperimente mit adulten Fliegen wurden jeweils ca. 100 Fliegen pro Genotyp in ein großes Futterröhrchen mit Standardfutter überführt und  $\text{üN}$  kultiviert. Am folgenden Tag wurden die Fliegen in ein frisches Futterröhrchen transferiert und die Embryonen sich bei  $25^\circ\text{C}$  entwickeln lassen. Die sich aus den Embryonen entwickelnden Fliegen wurden nach dem Schlüpfen gesammelt und für 24 h gemeinsam auf Standardfutter gehalten, um eine Befruchtung der Weibchen zu ermöglichen. Danach wurden jeweils 10 Fliegen gleichen Geschlechts in Röhrchen mit

Standardfutter überführt. Nach insgesamt 7 Tagen auf Standardfutter wurden die Fliegen auf das Hungermedium transferiert bzw. die Kontrollen in frische Röhrrchen mit Kontrollfutter überführt. Das Hungermedium bestand aus 0,8% Agarose in PBS.

In jedem Experiment wurden pro Genotyp bzw. für beide Geschlechter jeweils 5 x 10 Fliegen auf Standardfutter und auf Hungermedium untersucht. Während des Hungerexperiments wurde alle vier Stunden die Anzahl der toten Fliegen bestimmt und protokolliert.

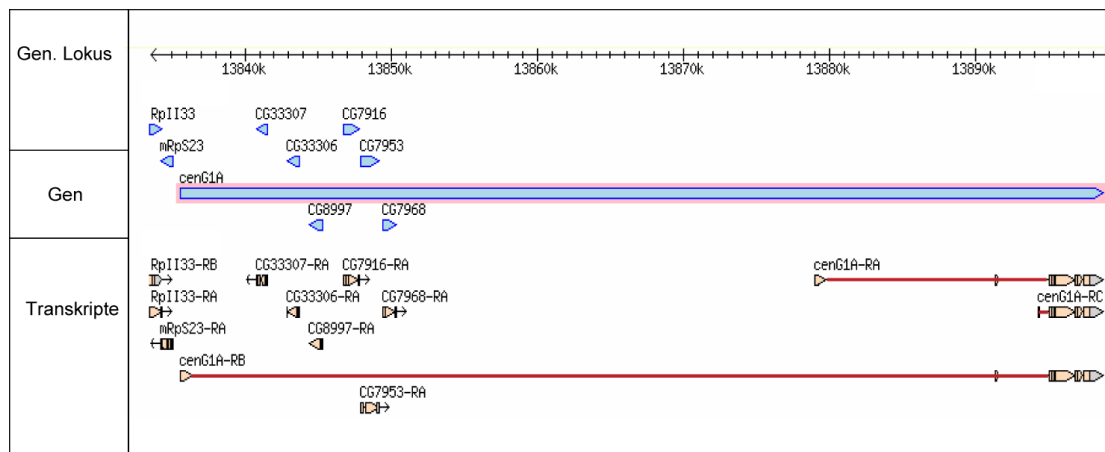
Die Auswertung der Experimente wurde mit der *Excel-Add-on* Software Xlstat durchgeführt. Die Überlebenskurve und die mittlere Überlebensdauer durch die Kaplan-Meier-Methode berechnet. Die statistische Signifikanz wurde mit dem Log-rank Test überprüft.

## 4. Ergebnisse

### 4.1. Molekulare und biochemische Charakterisierung der kleinen GTPase Centaurin gamma

#### 4.1.1. Genomischer Lokus und Transkripte

Das *centaurin gamma* Gen (*cenG1A*, *centg*) ist auf dem linken Arm des zweiten Chromosoms kodiert und erstreckt sich über einen genomischen Bereich von mehr als 60 kb (Sequenzlokalisierung: 13,835,567-13,898,715) (Abb. 4.1).



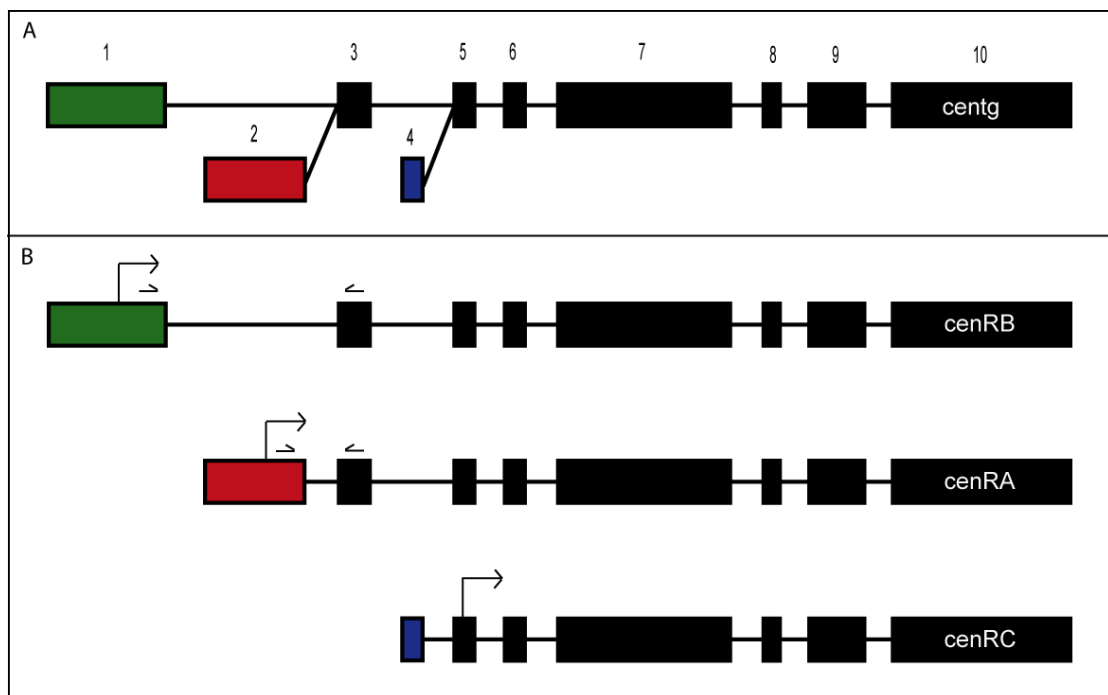
**Abb. 4.1 Genomischer Lokus und Transkripte von *centaurin gamma*.** Das *cent* Gen umfasst einen genomischen Bereich von mehr 60 kb (blau) und kodiert für 3 Transkripte (*cenRA*, *cenRB* und *cenRC*) (rot). Im ersten Intron des *cenRB* Transkripts sind sechs kleinere Gene kodiert.

Es kodiert für 10 Exons und drei putative Transkripte sind in der flybase Datenbank (ID: CG31811; siehe Internetverweise) vorhergesagt: *cenRA*, *cenRB* und *cenRC* (Abb. 4.1, Abb. 4.2). Die Transkription von *cenRA* und *cenRB* konnte mittels einer transkriptspezifischen RT-PCR Analyse und anschließender Sequenzierung verifiziert werden (Gündner, 2008). Für beide Transkripte wurde gezeigt, dass sie in Larven im dritten Instar exprimiert werden. Wie in Abb. 4.2 schematisch dargestellt, unterscheiden sich die drei Transkripte durch einen jeweils unterschiedlichen Transkriptionsstart. Das *cenRB* Transkript ist das längste und beginnt mit dem mit Nummer 1 gekennzeichneten Exon. Der Transkriptionsstart von *cenRA* beginnt mit Exon 2, welches circa 60 kb abwärts des ersten Exons von *cen-RB* liegt. Diese

beiden Transkripte unterscheiden sich lediglich in deren ersten Exons und besitzen dadurch die gleichen funktionellen Domänen, welche von den Exons 5-10 kodiert werden (Abb. 4.2, Abb. 4.3). *CenRC* ist das kürzeste Transkript, da es lediglich für sieben Exons kodiert. Der Transkriptionsstart liegt bei Exon 4, wodurch diesem Transkript Exon 3 fehlt, was dazu führt, dass es keine putative GTPase Domäne kodiert (Abschn. 4.1.2).

Die Transkriptlängen betragen für *cenRA* 4320 bp, für *cenRB* 4444 bp und für *cenRC* 3497 bp.

Trotz der unterschiedlichen Exonzusammensetzungen kodieren die drei Transkripte den gleichen C-terminalen Bereich, indem wichtige Domänen lokalisiert sind (4.1.2).



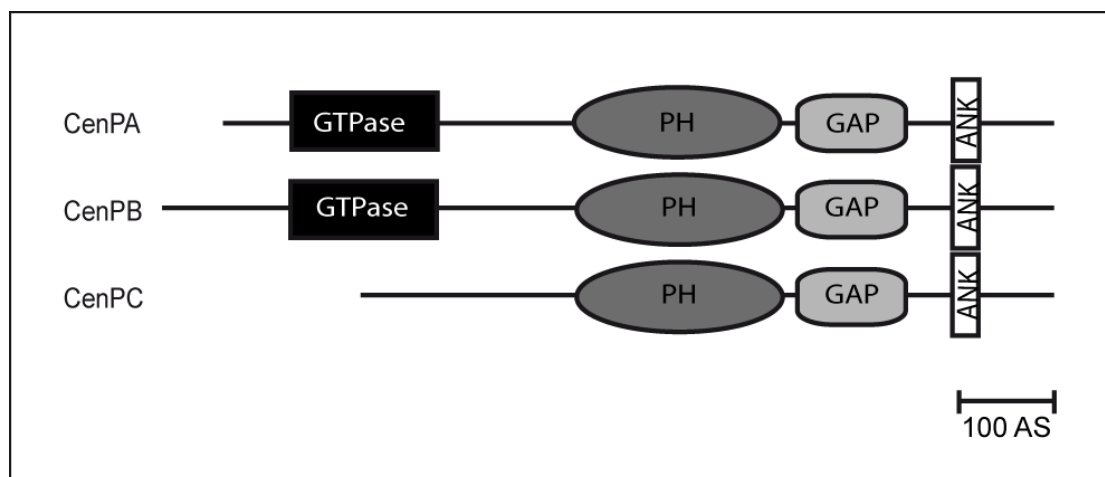
**Abb. 4.2 Exon/Intronstruktur von *centaurin gamma*.** **A** Das *centg* Gen kodiert für insgesamt 10 Exons. In Farbe sind die transkriptspezifischen Exons dargestellt. Alle drei Transkripte kodieren für die Exons 5 bis 10. **B** Die großen Pfeile markieren das jeweilige Startcodon der drei Transkripte. Die kleinen Pfeile symbolisieren die Bindungsstellen für die *Realtime* PCR Primer zur Unterscheidung der Transkripte. Die Länge der Exons ist maßstabsgetreu, die Länge der Introns stark verkürzt dargestellt.

#### 4.1.2. Protein- und Domänenstruktur

Die murinen Centaurin gamma Proteine besitzen vier funktionelle Domänen und es konnte bereits gezeigt werden, dass es sich um funktionelle kleine GTPasen handelt, die durch eine interne GAP Domäne reguliert werden (Xia et al., 2003; Qin et al., 2006).

In der flybase Datenbank sind für die drei *centg* Transkripte drei entsprechende Proteine vorhergesagt. Die Länge der Aminosäuresequenzen betragen für CenPA 927 AS, für CenPB 995 AS und CenPC 763 AS.

Um putative funktionelle Domänen der *Drosophila* Centaurin gamma Isoformen zu identifizieren, wurde eine Analyse der Aminosäuresequenzen mit dem online Programm SMART durchgeführt (Gündner, 2008). Die Analyse für das CenPA Protein ergab, dass das Protein vier putative Domänen kodiert: Eine GTPase Domäne (72-235 AS), eine ArfGAP Domäne (633-754 AS), eine PH Domäne (386-616 AS), und Ankyrin-Wiederholungsmotive (798-827 AS) (Abb. 4.3).



**Abb. 4.3 Domänenstruktur der drei Centaurin gamma Isoformen.** Alle drei Isoformen (CenPA, CenPB und CenPC) kodieren für den gleichen C-Terminus, welcher Ankyrin-Wiederholungsmotive (ANK), eine GAP Domäne (GAP) und eine PH Domäne (PH) beinhaltet. Durch die verschiedenen Transkriptionsstarts unterscheiden sich die Isoformen in ihrer C-terminalen Domänenstruktur. Lediglich CenPA und CenPB kodieren für eine GTPase Domäne (GTPase). Die Gesamtlänge der Peptide und die Domänen sind maßstabsgetreu dargestellt.

Kleine GTPasen im Allgemeinen fungieren als molekulare Schalter, die eine Vielzahl von Signalen innerhalb der Zelle weiterleiten (Mi et al., 2012). Sie werden durch die Bindung von GTP aktiviert und durch die Spaltung des GTP wieder inaktiviert. Die

GTPase Domäne selbst dient der Hydrolyse von GTP zu GDP. Sowohl die Bindung von GTP, als auch die Hydrolyse, sind streng reguliert und erfordern die Interaktion mit Hilfsproteinen. Die Ablösung von GDP und damit die Aktivierung der GTPase, wird durch GEF Proteine vermittelt, wohingegen die Inaktivierung der GTPase, durch GAP Proteine katalysiert wird (Bos et al., 2007).

Das Besondere an der Centaurin gamma Proteinfamilie ist, dass sie zusätzlich zur GTPase Domäne eine eigene GAP Domäne kodieren (Xia et al., 2003). GAP Domänen wirken als Hilfsdomänen für GTPasen, indem sie die intrinsische GTP Hydrolyse Reaktion der GTPase katalysieren. Durch diese Katalyse unterstützt die GAP Domäne die GTPase in ihren inaktiven Zustand zurückzukehren (Bos et al., 2007).

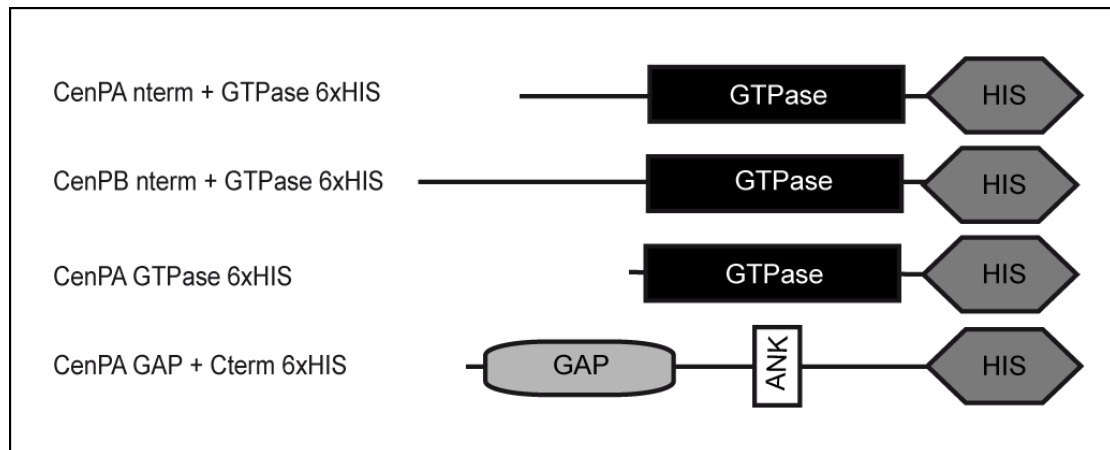
Das Cen-PB Protein hat die gleiche Domänenstruktur wie Cen-PA. Die beiden Isoformen unterscheiden sich lediglich im N-terminalen Bereich für den keine funktionellen Domänen vorhergesagt sind. Cen-PB ist 68 Aminosäuren länger als Cen-PA (Abb. 4.3). Cen-PC ist wesentlich kürzer als die beiden anderen Isoformen und in der Domänenstrukturanalyse wird für diese Isoform keine GTPase Domäne vorhergesagt.

#### **4.1.3. Centaurin gamma ist eine funktionelle GTPase mit katalytischer GAP Domäne**

(Experimente wurden in Zusammenarbeit mit Dipl. -Biol. Oliver Sendscheid durchgeführt)

Zur funktionellen Untersuchung der für Centaurin gamma theoretisch vorhergesagten Proteindomänen wurde ein kolorimetrischer *in vitro* GTPase Assay durchgeführt.

Es sollte analysiert werden, ob es sich bei Centaurin gamma, um eine GTPase handelt und ob diese durch die interne GAP Domäne reguliert wird. Zu diesem Zweck wurden die Sequenzen für vier verschiedene Centaurin gamma Proteinfragmente in den pTriEX Expressionsvektor kloniert (Abb. 4.4, Sendscheid, 2010).



**Abb. 4.4 Centaurin gamma Konstrukte für den in vitro GTPase assay.** Schematische Darstellung der Centaurin gamma Fragmente, die zur Expression in den pTriEx-Expressionsvektor kloniert wurden.

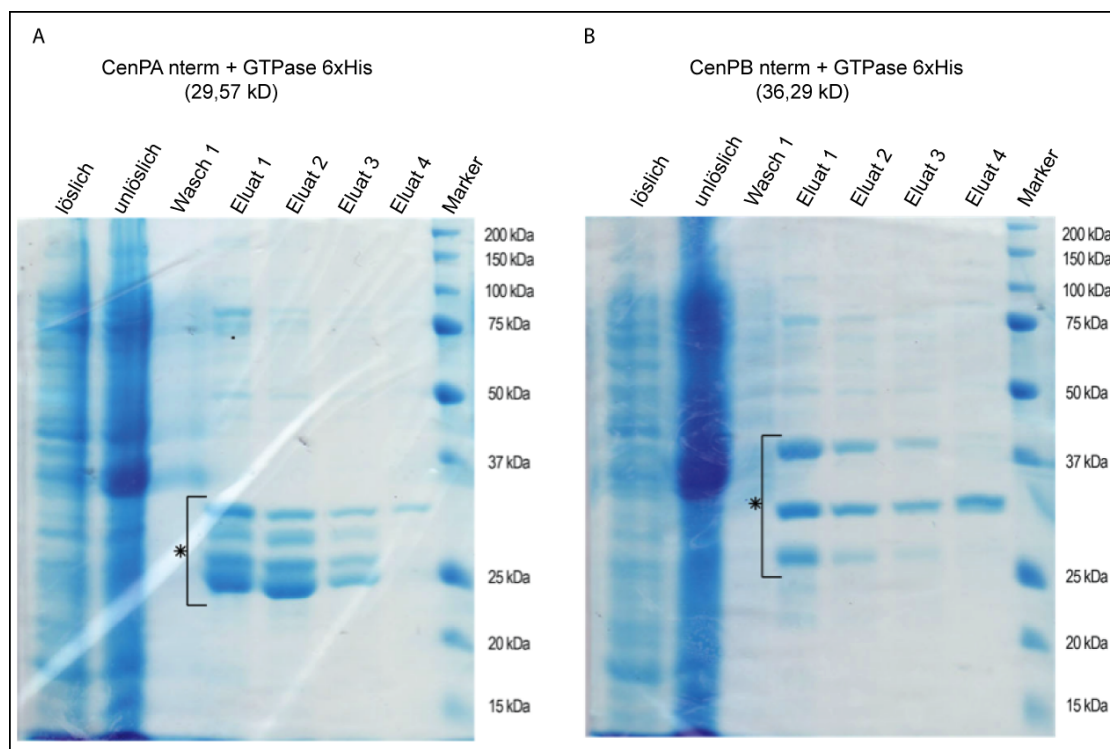
Das *Cen-PA GTPase* Konstrukt enthält die GTPase Domäne, für die sowohl die *Cen-PA* als auch die *Cen-PB* Isoform kodieren. Um einen möglichen Unterschied in der Funktionalität der beiden Isoformen zu untersuchen, wurden zwei Konstrukte erzeugt, die jeweils die gemeinsame GTPase Domäne enthalten und zusätzlich die N-terminalen Bereiche, in denen sich *Cen-PB* und *Cen-PA* unterscheiden (*Cen-PA nterm + GTPase*; *Cen-PB nterm + GTPase*). Außerdem wurde ein Fragment verwendet, welches für die C-terminal lokalisierte GAP Domäne kodiert (*Cen-PA GAP+cterm*). Alle vier Konstrukte wurden in den pTriEx Expressionsvektor kloniert, welcher die Expression in Bakterien, Insekten- und Säugerzellen ermöglicht. Zusätzlich kodiert der Vektor für einen poly-Histidin Aminosäuretag, welcher die Aufreinigung von rekombinanten Proteinen per Affinitätschromatografie ermöglicht. Alle Konstrukte wurden nach erfolgreicher Integration in den Vektor mittels verschiedener Restriktionsverdauung und Sequenzierungen überprüft (Daten nicht gezeigt).

Konstrukt	Größe (AS)	Mass [kDa]	Restriktions-schnittstellen
CenPA nterm+GTPase 6HIS	255	29.57	<i>NcoI / Xho I</i>
CenPB nterm+GTPase 6HIS	324	36.29	<i>PciI / XhoI</i>
CenPA GTPase 6HIS	196	22.37	<i>NcoI / XhoI</i>
CenPA GAP+cterm 6HIS	338	35.91	<i>NcoI / NotI</i>

**Tabelle 4.1 Centaurin gamma Konstrukte für den *in vitro* GTPase Assay.** Angegeben sind die Größe in Aminosäuren, die Masse in kD und die verwendeten Restriktionsschnittstellen der vier Centaurin gamma Konstrukte.

Zur Expression der vier oben beschriebenen Centaurin gamma Proteinfragmente wurde der *E. coli* Stamm *BL21 Gold(D3)* verwendet. Die Proteinexpression wurde mit IPTG (Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranosid) induziert. Nach der Expression wurden die Bakterien geerntet und aufgeschlossen. Die Aufreinigung der Fragmente wurde mit Hilfe einer Ni-NTA Säule durchgeführt. Die Histidin getagten Proteine binden spezifisch an das Nickel der Säule und lassen sich so aus dem Gesamtlysat isolieren. Zur Entfernung unspezifisch gebundener Proteine wurden mehrere Waschschrte durchgeführt. Für die biochemische Überprüfung der aufgereinigten Proteine wurde eine SDS-PAGE mit anschließender Coomassie Färbung durchgeführt (Abb. 4.1).

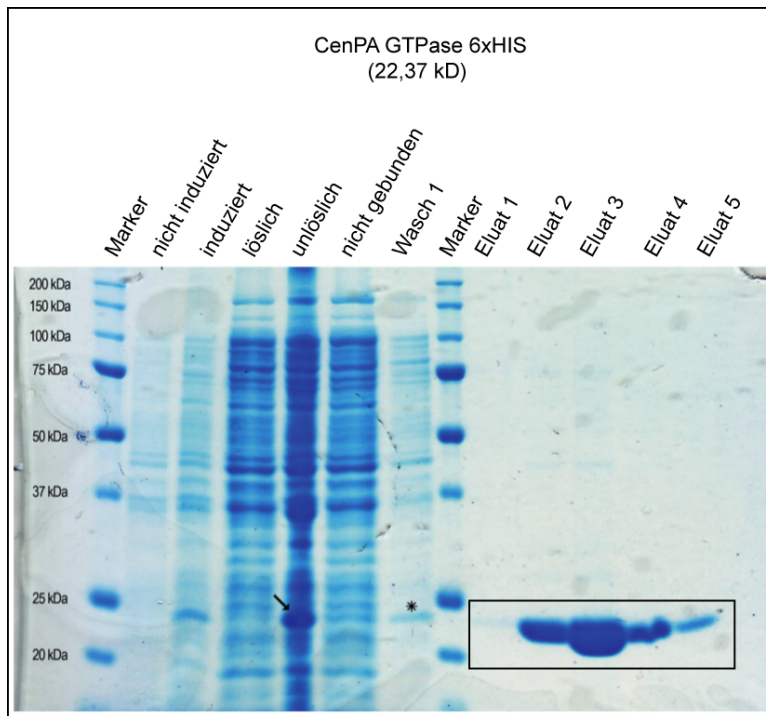
Für die beiden Konstrukte *CenPA nterm + GTPase* und *CenPB nterm + GTPase* war es nicht möglich funktionales Protein zu exprimieren bzw. aufzureinigen (Abb. 4.5).



**Abb. 4.5 Degradation der exprimierten *CenPA Nterm+ GTPase* und *CenPB Nterm+ GTPase* Konstrukte.** Coomassie gefärbte SDS Gele, die die lösliche, unlösliche, Wasch- und die Eluatfraktionen der beiden Konstrukte mit N-Termini zeigen. In den Eluatfraktionen 1-4 werden mehrere Banden detektiert (Stern). **A** *CenPA Nterm+GTPase* **B** *CenPB Nterm+GTPase*. (modifiziert nach Senscheid, 2010).

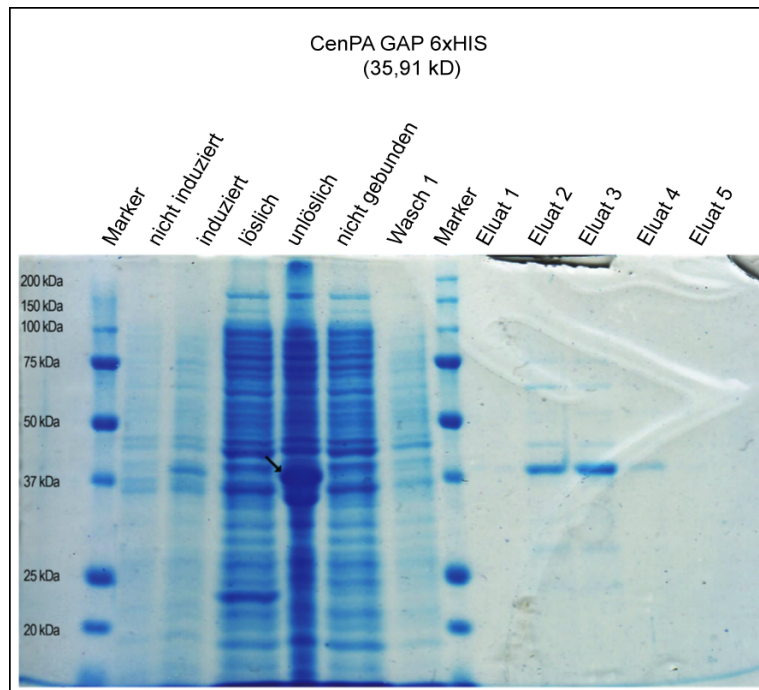


Aus diesem Grund wurden für die weiteren Analysen das *CenPA GTPase* Konstrukt verwendet, welches sich stabil exprimieren und aufreinigen ließ. Das *GTPase* Konstrukt wurde im Vergleich zu den anderen Konstrukten am stärksten exprimiert und konnte ohne sichtbare Kontamination isoliert werden (Abb. 4.6).



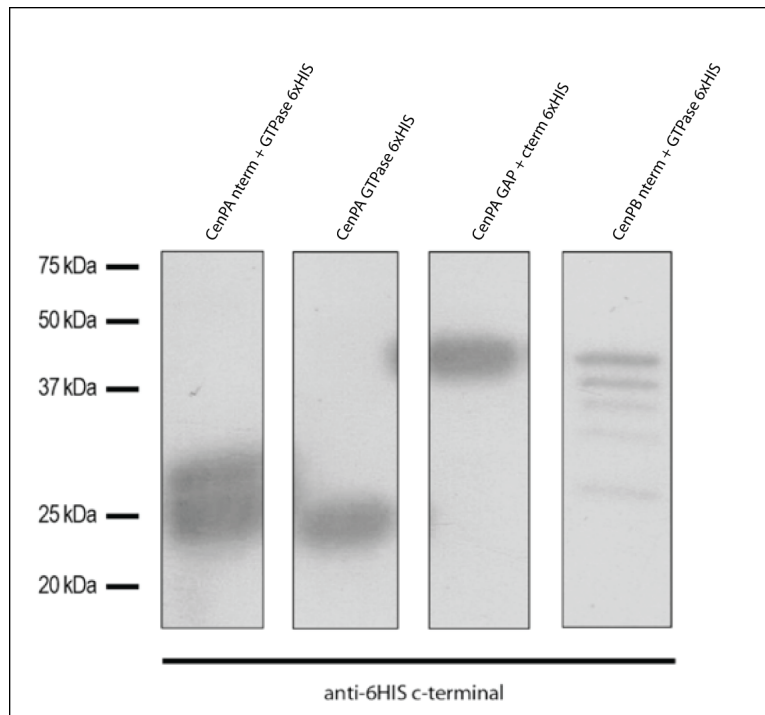
**Abb. 4.6 Expression und native Aufreinigung des GTPase Domänen Fragments *CenPA GTPase 6xHIS*.** Coomassie gefärbtes SDS Gel, das die lösliche, unlösliche, Wasch- und die Eluatfraktionen des *CenPa GTPase 6xHIS* Konstrukts zeigt. Ein Teil des Proteins findet sich, sowohl in der unlöslichen Fraktion (Pfeil) als auch in der Waschfraktion (Stern). In den Eluatfraktionen 1-5 wird eine spezifische Bande der erwarteten Höhe (22,37 kb) detektiert (Rechteck). (modifiziert nach Senscheid, 2010).

Neben der Funktion als GTPase sollte für Centaurin gamma ebenfalls untersucht werden, ob die vorhergesagte interne GAP Domäne funktionell ist. Um dies zu überprüfen, wurde neben den GTPase Konstrukten auch ein Konstrukt, welches die GAP Domäne kodiert, zur Proteinexpression verwendet. Das *Cen GAP + Cterm* Konstrukt beinhaltet die Sequenz für die GAP Domäne und den C-terminalen Teil des Proteins. Dieses konnte ebenfalls erfolgreich exprimiert und aufgereinigt werden (Abb. 4.1). Im Vergleich zum *GTPase* Konstrukt war die Ausbeute an Protein wesentlich geringer aber ausreichend für die Verwendung im nachfolgenden GTPase Assay.



**Abb. 4.7 Expression und native Aufreinigung des GAP Domänen Fragments *CenPA GAP + cterm 6xHIS*.** Coomassie gefärbtes SDS Gel, das die lösliche, unlösliche, Wasch- und die Eluatfraktionen des *CenPa GAP 6xHIS* Konstrukts zeigt. Ein großer Teil des Proteins findet sich in der unlöslichen Fraktion (Pfeil). In den Eluatfraktionen 1-5 wird eine spezifische Bande der erwarteten Höhe (35,91kD) detektiert. (modifiziert nach Senscheid, 2010).

Zur abschließenden Analyse der aufgereinigten Proteine wurde eine Western Blot Analyse durchgeführt (Abb. 4.8). Die Detektion der Proteine erfolgte mit einem anti-HIS Antikörper. Für die beiden Konstrukte, die jeweils den N-Terminus von Cen-PA und Cen-PB (*CenPA nterm + GTPase*; *CenPB nterm + GTPase*) enthalten, erkennt der Antikörper keine distinkte Bande bzw. mehrere Banden (Abb. 4.8). Dies bestätigt, dass das rekombinante Protein von den Bakterien exprimiert wird, es aber teilweise degradiert wird. Für die beiden Konstrukte *CenPA GTPase* und *CenPA GAP + cterm* detektiert der Antikörper jeweils eine distinkte Bande im Markerbereich der berechneten Molmasseder und bestätigt damit die erfolgreiche und kontaminationsfreie Isolation der beiden rekombinanten Proteine (Abb. 4.8).



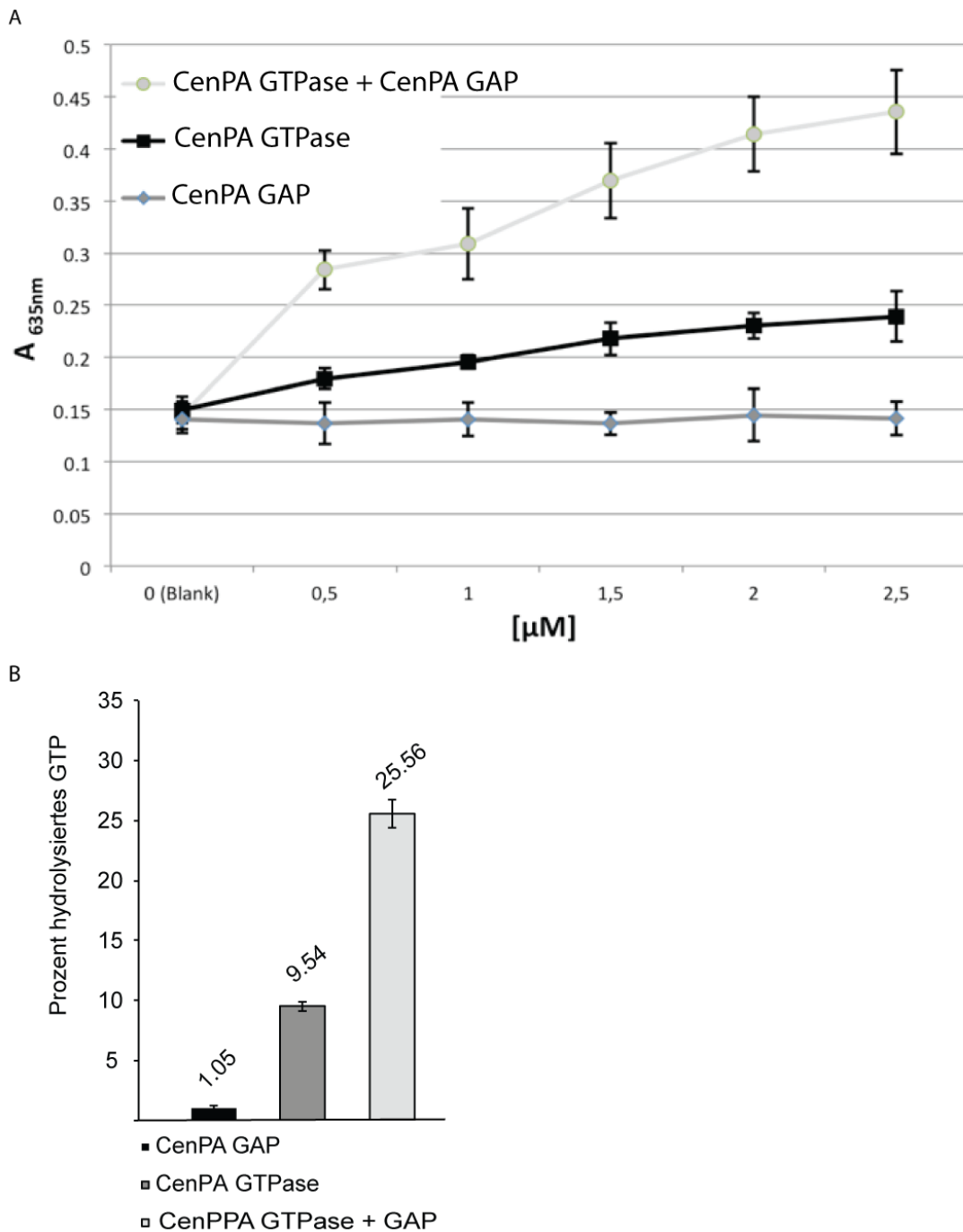
**Abb. 4.8** Die beiden Konstrukte *CenPA GTPase 6xHIS* und *CenPA GAP 6x HIS* lassen sich in Bakterien exprimieren und nativ aufreinigen. Western Blot Analyse der vier Centaurin gamma Konstrukte. Die beiden Konstrukte *CenPA GTPase n-term* und *CenPB nterm* zeigen eindeutige Anzeichen von Degradation (Spur 1 und 4). Für die beiden Konstrukte *CenPA GTPase 6xHIS* und *CenPA GAP 6x HIS* detektiert der anti-HIS Antikörper jeweils eine distinkte Bande. (modifiziert nach Senscheid, 2010).

Um zu untersuchen, ob es sich bei *Drosophila* Centaurin gamma um eine funktionelle GTPase handelt, wurde ein *in vitro* GTPase Assay mit den zuvor hergestellten rekombinanten Proteindomänen durchgeführt. Dazu wurde ein kolorimetrischer GTPase Assay verwendet, der auf der Komplexbildung zwischen anorganischem freiem Phosphat und einem Farbstoff basiert. Bei der Spaltung von GTP durch eine GTPase, wird Phosphat freigesetzt, welches durch die Farbreaktion sichtbar gemacht werden kann. Die Auswertung der Färbeintensität wird mit Hilfe eines 96-Well-Plattenlesegeräts durchgeführt. Je mehr GTP von der GTPase hydrolysiert wird, desto mehr freies Phosphat entsteht und desto stärker ist die Absorption. Somit korreliert die Absorption mit der Aktivität der GTPase.

Für die Messung wird die Absorption bei steigender Proteinkonzentration gemessen. Handelt es sich bei Centaurin gamma um eine funktionelle GTPase, sollte die Absorption proportional zur Konzentration der rekombinanten GTPase Domäne ansteigen. Wie in Abb. 4.9 dargestellt, kommt es zu einem signifikanten Anstieg der Absorption bei steigender GTPase Konzentration. Im Gegensatz zur GTPase

Domäne führt die GAP Domäne alleine zu keiner Änderung der Absorption unabhängig von der Konzentration. Jedoch führt die Kombination aus der GAP Domäne und der GTPase Domäne zu einer sehr deutlichen Absorptionszunahme, die um das 1,5 fache höher liegt als die der GTPase Domäne allein (Abb. 4.9). In der Reaktion mit der GTPase Domäne werden 9,54% des vorhandenen GTPs hydrolysiert. Zusammen mit der GAP Domäne steigt der Anteil an umgesetzttem GTP auf 25,56% (Abb. 4.9).

Diese Ergebnisse zeigen eindeutig, dass Centaurin gamma *in vitro* GTPase Aktivität besitzt und GTP hydrolysieren kann. Die schwache intrinsische GTPase Aktivität kann durch die Zugabe der Centaurin gamma GAP Domäne verstärkt werden. Somit handelt es sich bei *Drosophila* Centaurin gamma um eine funktionelle GTPase, die durch ihre intrinsische GAP Domäne katalysiert wird.



**Abb. 4.9 Centaurin gamma ist eine funktionelle GTPase und wird durch ihre interne GAP Domäne katalysiert.** **A** Das Diagramm zeigt die Absorption bei 635 nm in Abhängigkeit zur Proteinkonzentration. Mit steigender GTPase Domänen Konzentration steigt die gemessene Absorption (grüne Punkte). Das Hinzufügen der GAP Domäne verstärkt den Anstieg der Absorption im Vergleich zur GTPase Domäne allein (schwarze Rechtecke). Die GAP Domäne alleine führt zu keinem Anstieg der Absorption (graue Rauten). **B** Das Diagramm zeigt die Menge an hydrolysiertem GTP in Prozent. Die GTPase Domäne hydrolysiert 9,54% des GTPs. Zusammen mit der GAP Domäne kommt es zur Erhöhung der GTP Hydrolyse auf 25,56%. (modifiziert nach Senscheid, 2010).



## 4.2. Generierung und Charakterisierung der *centg*<sup>-/-</sup> Nullmutante

### 4.2.1. Klonierung der Donorkonstrukte *pRK2-cenRA*, *pRK2-cenRB* und *pGX-cenORF*

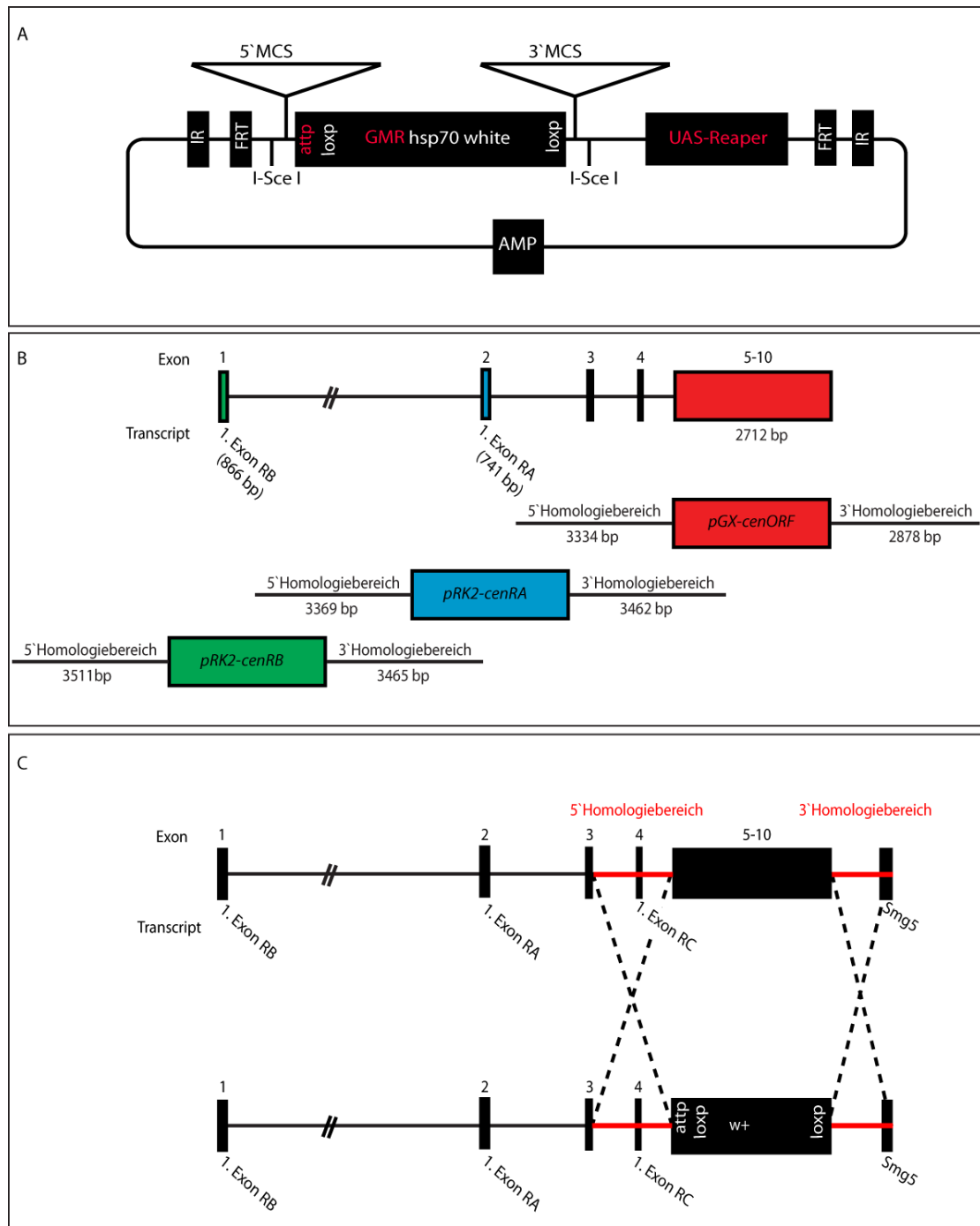
Um die biologische Funktion von *centg in vivo* zu untersuchen, wurde eine Nullmutante mittels *Ends-out Gene Targeting* erzeugt (Huang et al., 2008). Dabei handelt es sich um eine gezielte Mutagenese bei der über homologe Rekombination eine genomische Zielsequenz durch eine Donorsequenz ersetzt wird. Der gewünschte genomische Locus wird dabei durch ein Donorkonstrukt, das ein w<sup>+</sup> Markergen, Cre Rekombinase Erkennungssequenzen (*loxP sites*) und eine Bakteriophagen  $\Phi$ C31 Integrationssequenz (*attP site*) enthält, ausgetauscht. Auf diese Weise kann eine definierte Nullmutation für ein Gen erzeugt werden und gleichzeitig ermöglicht die *attP site* das gezielte Einbringen von DNA Fragmenten an diesen Locus (Huang et al., 2009).

Da bereits gezeigt wurde, dass sowohl das *cenRA* als auch das *cenRB* Transkript *in vivo* exprimiert werden und sich beide Transkripte eventuell in ihrer Lokalisation bzw. Funktion unterscheiden, wurden drei verschiedene Donorkonstrukte generiert (Abb. 4.10 B). Das Donorkonstrukt *pRK2-cenRA* führt zur Deletion des ersten Exons des *cenRA* Transkripts und das zweite Konstrukt, *pRK2-cenRB*, vermittelt die Deletion des ersten Exons von *cenRB*. Mutanten, die mit diesen Donorkonstrukten erzeugt werden, ermöglichen eine Analyse der beiden Isoformen und ihrer eventuell unterschiedlichen Funktionen. Das dritte Donorkonstrukt, *pGX-cenORF*, dient der Generierung einer kompletten Nullmutante für das *centg* Gen. Es führt bei erfolgreicher Rekombination zur Deletion der gemeinsamen Exons 5-10 der drei Isoformen, welche für alle funktionellen Domänen kodieren (Abb. 4.10 C).

In dieser Arbeit wurden zur Generierung der Donorkonstrukte der pRK2 und der pGX-attP Vektor verwendet (Huang et al., 2008; 2009)(Abb. 4.10). Beide Vektoren besitzen mehrere Funktionen, die eine effiziente Generierung von Mutanten ermöglicht. Unter anderem kodieren sie einen GMR (*Glass Multimer Reporter*) Enhancer, der die Expression des w<sup>+</sup> Markergens verstärkt und damit das Erkennen von Mosaikaugen erleichtert. Außerdem ist das w<sup>+</sup> Markergen von Cre Rekombinase Erkennungssequenzen flankiert, so dass dieses, nach der erfolgreichen Rekombination, entfernt werden kann. Der größte Vorteil im Vergleich zu vorherigen

Targeting Vektoren besteht im *UAS-reaper* Transgen, das hinter dem Klonierungsbereich (MCS) für den 3'Homologiearm kodiert ist. Das *UAS-reaper* Transgen erlaubt eine negative Selektion und führt dadurch zu einer drastischen Reduktion falsch-positiver Kandidaten. Dies hat zur Folge, dass wesentlich weniger Kandidaten auf ein positives Rekombinationsereignis getestet werden müssen. Der pGX-attP Vektor unterscheidet sich vom pRK2 Vektor lediglich im Vorhandensein einer *attP* Erkennungssequenz (Abb. 4.10A). Diese ermöglicht nach erfolgreicher Integration ins Genom das gezielte Einbringen von DNA Sequenzen an den *centG* Locus durch die Phi Integrase. Dieser Vektor wurde für das *pGX-cenORF* Donorkonstrukt verwendet, um die Untersuchung der funktionellen Domänen mittels gezielter Punktmutationen und das Einbringen von markierten *centG* Varianten für Lokalisierungsstudien zu ermöglichen.





**Abb. 4.10 Strategie zur Generierung der Donorkonstrukte *pRK2-cenRA*, *pRK2-cenRB* und *pGX-cenORF*.** **A** Schematische Darstellung des Donorvektors *pGX-attp*, der für die Generierung des *pGX-cenORF* Konstrukts verwendet wurde. Der *pRK2* Donorvektor unterscheidet sich lediglich durch das Fehlen der Phi Integrase Erkennungssequenz (*attp* Sequenz). **B** Genomischer Lokus des *centg* Gens. Das erste Exon des *cenRB* Transkripts, das erste Exon des *cenRA* Transkripts und die gemeinsamen Exons 5-10 sind farblich den entsprechenden Targeting Konstrukten zugeordnet (*pRK2-cenRB* (grün), *pRK2-cenRA* (gelb), *pGX-cenORF* (rot)). Zusätzlich ist die Länge der Homologiearme in Basenpaaren angegeben. **C** Detaillierte Targetingstrategie für das *pGX-cenORF* Konstrukt. Das Deletionskonstrukt ersetzt bei erfolgreicher Rekombination die Exons 5-10, die für alle funktionellen Domänen von *centg* kodieren.

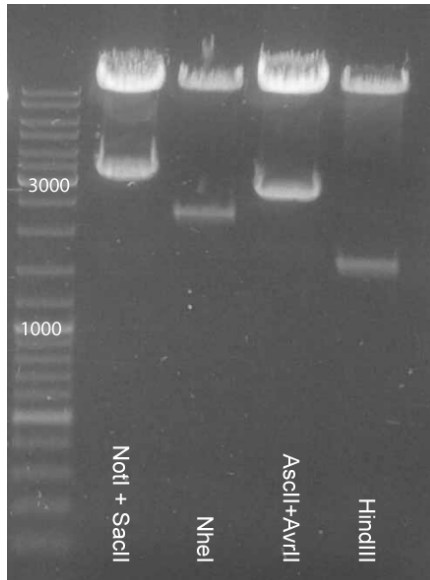
Im Folgenden wird die Klonierungsstrategie für das *pGX-cenORF* Konstrukt detailliert beschrieben, welches für die spätere homologe Rekombination *in vivo* verwendet wurde. Die *pRK2-cenRA* und *pRK2-cenRB* Konstrukte wurden nach dem gleichen Prinzip generiert. Die drei Konstrukte unterscheiden sich in der Länge der Homologiearme und den verwendeten Restriktionsschnittstellen (Tabelle 4.2).

Targeting Konstrukt	Verwendete Restriktionsschnittstellen	Länge der Homologiearme (bp)
<i>pRK2-cenRA</i> 5`	<i>Eco</i> RI / <i>Not</i> I	3369
<i>pRK2-cenRA</i> 3`	<i>Asc</i> I / <i>Avr</i> II	3462
<i>pRK2-cenRB</i> 5`	<i>Eco</i> RI / <i>Not</i> I	3511
<i>pRK2-cenRB</i> 3`	<i>Asc</i> I / <i>Avr</i> II	3465
<i>pGX-cenORF</i> 5`	<i>Sac</i> II / <i>Not</i> I	3334
<i>pGX-cenORF</i> 3`	<i>Asc</i> I / <i>Avr</i> II	2878

**Tabelle 4.2** Länge und angefügte Restriktionsschnittstellen der Donorkonstrukte *pRK2-cenRA*, *pRK2-cenRB* und *PGX-cenORF*.

Das *pGX-cenORF* Konstrukt führt bei erfolgreicher Rekombination zur Deletion der gemeinsamen Exons 5-10, die für alle funktionellen Domänen der drei Transkripte kodieren und generiert dadurch eine komplette Nullmutante für das *centg* Gen. Für die homologe Rekombination wurden vor und hinter das Donorkonstrukt homologe Bereiche der flankierenden genomischen Sequenz des Deletionsbereiches kloniert (Abb. 4.10). Dazu wurden PCRs auf genomischer DNA des *w*- Wildtypstammes durchgeführt und für den 5`Homologiearm ein Fragment von 3334 bp und für den 3`Homologiearm von 2878 bp amplifiziert. Mittels Restriktionsschnittstellen, die über die verwendeten Primer an die PCR Produkte angefügt wurden, konnten die Fragmente zielgerichtet in den Donorvektor (*pGX-attp*) inseriert werden. Die erfolgreiche Insertion der Homologiearme in den *pGX-attp* Donorvektor wurde durch Restriktionsanalysen bestätigt (Abb. 4.11). Der Klon *pGX-cenORF*, der ein korrektes Bandenmuster in der Restriktionsanalyse zeigte, wurde für verschiedene Sequenzierungen eingesetzt. Dabei wurden unter anderem die Übergänge zwischen den Klonierungsbereichen und den Homologiearmen überprüft. Außerdem wurde

überprüft, ob die DNA-Sequenz des letzten Exons des *Smg5* Gens, welches im 3' Homologiearm liegt, nicht verändert ist (Daten nicht gezeigt).



**Abb. 4.11 Überprüfung des *pGX-cenORF* Klon mittels Restriktionshydrolyse.** Sowohl die Inkubation mit den Restriktionsenzymen *Asc* I und *Avr* II (erwartete Fragmentgrößen: 10699 bp, 2878 bp) als auch mit *Sac* II und *Not* I (erwartete Fragmentgrößen: 10078 bp, 3462bp) zeigen die erwarteten Fragmentgrößen für die beiden Homologiearme. Zusätzlich wurde der Vektor mit *Nhe* I, das im 5' Homologiearm und im Rückgrat des Vektor schneidet (2299 bp, 11223bp) und *Hind* III, das im 3' Homologiearm und im Rückgrat des Vektor schneidet (1640 bp, 11882 bp), hydrolysiert.

Der *pGX-cenORF* Klon, der sowohl bei der Restriktionsanalyse die erwarteten Fragmentgrößen zeigte als auch eine fehlerfreie Sequenzierung aufwies, wurde zur Erzeugung von Donorfliegenlinien verwendet.

#### 4.2.2. Generierung der *pGX-cenORF* Donorfliegenlinien

Als Donorfliegenlinie, wird die Ausgangsfliegenlinie bezeichnet, die das Donorkonstrukt, in diesem Fall *pGX-cenORF*, homozygot im Genom integriert trägt und in der die *in vivo* Mobilisierung stattfindet. Die putativen Donorfliegenlinien wurden nach dem Standardprotokoll zur Generierung von transgenen Fliegen hergestellt. Der *pGX-attP* Vektor kodiert neben den Elementen, die für die homologe Rekombination essentiell sind, zusätzlich IR (Inverted Repeats), die der Generierung transgener Fliegen mit Hilfe einer Transposase dienen (Abb. 4.10). Nachkommen, die das Donorkonstrukt stabil im Genom integriert tragen, lassen sich anhand ihrer

roten Augen, induziert durch den w<sup>+</sup> Marker des *pGX-cenORF* Konstrukts, erkennen. Auf diese Weise wurden für das *pGX-cenORF* Konstrukt drei unabhängige Linien erzeugt, die das Konstrukt auf dem zweiten Chromosom inseriert tragen.

Um die Targeting Kreuzungen möglichst effizient zu gestalten, wurden die unabhängigen *pGX-cenORF I,II* und *III* Donorlinien in zwei Testkreuzungen überprüft. In der ersten Kreuzung werden diese gegen die Targeting Linie gekreuzt und die Nachkommen im Larvenstadium einem Hitzeschock unterzogen. Dabei wird einerseits überprüft, ob sich das Konstrukt durch die Hitzeschock-induzierbare Flippase und das *I-SceI* Restriktionsenzym mobilisieren lässt und gleichzeitig, ob die *hs-hid* Konstrukte auf dem y Chromosom und auf dem Balancerchromosom funktionell sind. Durch die Mobilisierung des Donorkonstrukts in den somatischen Zellen der Nachkommen, verlieren diese den w<sup>+</sup> Marker und die adulten Tiere besitzen rot/weiße Mosaikaugen. Je effizienter die Mobilisierung war, desto größer ist der Weißanteil am Mosaik. Von jeder der drei Donorlinien konnten Nachkommen mit großflächigem Mosaik gewonnen werden (Abb. 4.12). Somit konnte gezeigt werden, dass in allen das Konstrukt effektiv mobilisiert werden kann. Die *hs-hid* Konstrukte induzieren nach erfolgtem Hitzeschock die Expression des Apoptosegens *hid*, welches zum Zelltod führt. In diesem Fall führt es bei allen männlichen Nachkommen der Kreuzung (*Y, hs-hid*) und bei allen, die das Balancerchromosom (*CyO, hs-hid*) tragen, zu Letalität. Es überleben lediglich Weibchen, die sowohl die Targetingelemente (*hs-Flp, hs-I-SceI*) als auch das Donorkonstrukt tragen. Bei allen drei Testkreuzungen waren die *hs-hid* Elemente funktionell und es schlüpften lediglich Weibchen mit korrektem Genotyp. In einer zweiten Testkreuzung wurde die Funktionalität des *UAS-reaper Transgens* in den Donorfliegen überprüft. Dazu wird die Donorfliegenlinie mit der Screeningfliegenlinie (*yw; pin/CyO; GAL<sup>221w-</sup>*) gekreuzt, welche GAL4 unter der Kontrolle eines neuronenspezifischen Promotors exprimiert. Ist das *UAS-reaper* Konstrukt funktionell, wird in den Nachkommen das Apoptosegen *reaper* in speziellen Neuronen exprimiert und führt zu pupaler Letalität oder in sehr wenigen Fällen zu sterilen Adulten mit einem auffälligen Flügelphänotyp. In allen drei Donorlinien war das *UAS-reaper* Konstrukt funktionell und führte zur erwarteten Letalität bzw. zu sterilen Adulten mit nicht entfalteten Flügeln.



**Abb. 4.12 Mobilisierung des *pGX-cenORF* Targetingkonstrukts in den Donorfliegenlinien. A-C** In allen drei unabhängigen Donorfliegenlinien (*pGX-cenORF-I*, *-II* und *-III*) lässt sich das Donorkonstrukt effektiv, nach der Kreuzung mit der Targetinglinie durch einen Hitzeschock mobilisieren. Die Mobilisierung führt zum Verlust des *w+* Markergens und damit zu weißen Augen.

Alle drei *pGX-cenORF* Donorlinien zeigten die erwarteten Ergebnisse in den Testkreuzungen.

Für die folgenden Kreuzungen zur Generierung der *centg*<sup>-/-</sup> Nullmutante mittels *Ends-out Gene Targeting* wurde die Donorfliegenlinie *pGX-cenORF-II* verwendet.

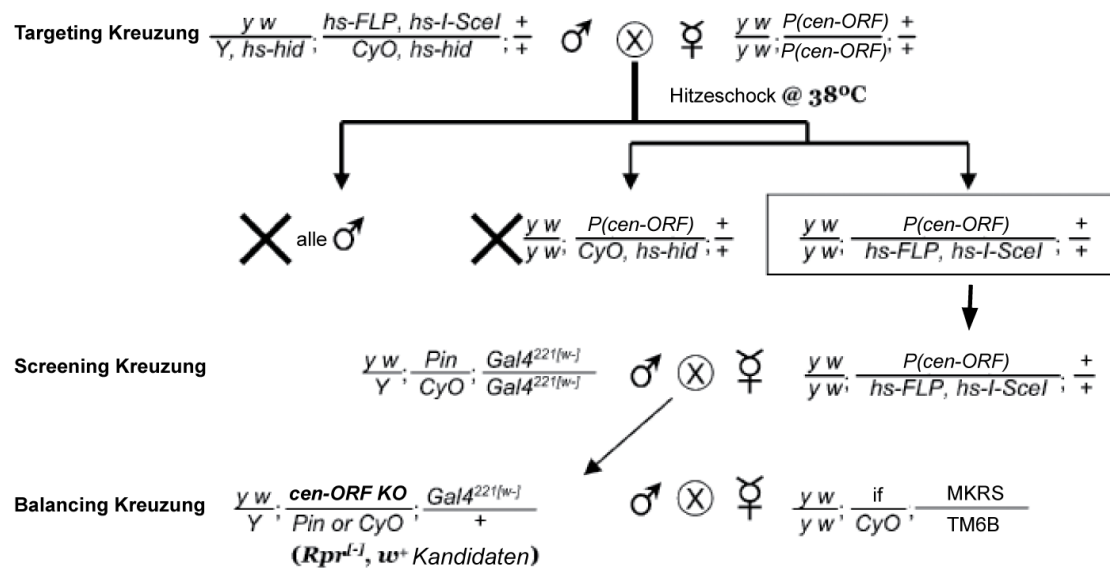
#### 4.2.3. Ends-out Gene Targeting für *centaurin gamma*

Das *Ends-out Gene Targeting* führt in drei Schritten zum Austausch einer genomischen Sequenz gegen das Donorkonstrukt. Im ersten Schritt mobilisiert die Flp Rekombinase (Flippase) das zufällig integrierte Donorkonstrukt über die FRT Erkennungsequenzen, welches sich nach der Mobilisierung extrachromosomal zu einem Ring schließt. Dieser Ring wird anschließend durch die ebenfalls Hitze-induziert exprimierte *I-Sce-I* Endonuklease linearisiert. Im letzten Schritt lagert sich das linearisierte Fragment zufällig an den homologen Bereich im Genom an und mit einer sehr geringen Wahrscheinlichkeit induzieren die Doppelstrangbrüche an den Enden des Konstrukts einen Austausch der genomischen Sequenz gegen das Donorkonstrukt. Alle Schritte finden *in vivo* statt.

Für den ersten Kreuzungsschritt, die Targeting Kreuzung, wurden Jungfrauen der Donorlinie *pGX-cenORF II* mit Männchen der Targetinglinie gekreuzt, die auf dem zweiten Chromosom sowohl die Hitzeschock-induzierbare Flippase als auch die *I-Sce-I* Endonuklease kodieren (Abb. 4.13). Auf dem Gegenchromosom zum zweiten und auf dem y Chromosom befindet sich jeweils ein Hitzeschock-induzierbares hid

Element (*hs-hid*). Zur Induktion der Hitzeschock-abhängigen Expression wurden die Nachkommen im Larvenstadium Hitzeschocks unterzogen. Diese führen dazu, dass sowohl die Flippase als auch die Endonuklease exprimiert werden und es damit zu einer Mobilisierung und Linearisierung des Donorkonstrukts in den Larven kommt. Durch die Expression der beiden *hs-hid* Elemente wird in allen Nachkommen, die ein y-Chromosom oder das zweite Chromosom ohne Flippase und Endonuklease tragen, Letalität induziert. Diese Selektion des Genotyps durch die *hs-hid* - Elemente führt dazu, dass alle Nachkommen den korrekten Genotyp für die Screening Kreuzung besitzen und kein Sammeln von unbefruchteten Weibchen notwendig ist.

Mit der zweiten Kreuzung, der Screeningkreuzung, werden die falsch-positiven Kandidaten aus der Targetingkreuzung eliminiert. Dazu zählen Fliegen, in denen das Donorkonstrukt nicht mobilisiert wurde, eine nicht-homologe Integration stattgefunden hat oder eine Duplikation vorliegt. In diesen Fällen geht man davon aus, dass das *UAS-reaper Transgen* hinter dem 3' Homologiearm noch vorhanden ist und exprimiert werden kann. Zu diesem Zweck kreuzt man die weiblichen Nachkommen aus der Targetingkreuzung mit Männchen der Screeninglinie, die unter einem neuronenspezifischen Promotor Gal4 exprimiert ( $Gal4^{221 w^-}$ ) (Abb. 4.13). Ist das *UAS-reaper* Element noch vorhanden, wird das Apoptosegen *reaper* in Neuronen des ZNS exprimiert und führt zu pupaler Letalität oder einem starken, offensichtlichen Flügelphänotyp und erlaubt dadurch eine negative Selektion. Die überlebenden Nachkommen aus der Screeningkreuzung werden anschließend anhand ihrer Augenfarbe selektiert.



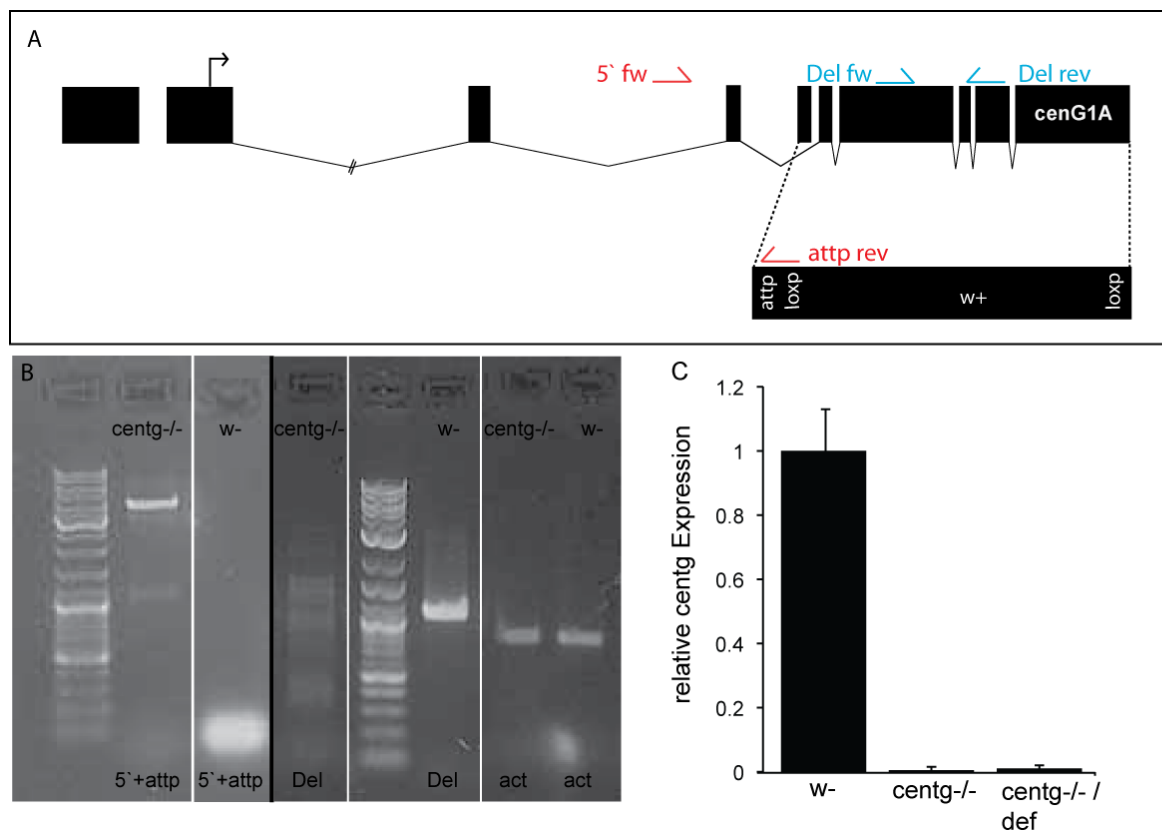
**Abb. 4.13 Genetische Kreuzung für das *Ends-out Gene Targeting* am *centg* Lokus.** In den Nachkommen der Targetingkreuzung wird mit Hilfe eines Hitzeschocks die Flippase aktiviert und dadurch die Mobilisierung des Donorkonstruktes induziert. Außerdem induziert der Hitzeschock die Expression der *hs-hid* Transgens, was zur Letalität aller Männchen und Weibchen, die das *CyO, hs-hid* Balancerchromosom tragen, führt. In den Nachkommen der Screening Kreuzung aktiviert das *Gal4*<sup>221</sup> die Expression des *UAS-reaper* Transgens und führt zur Letalität bei Fliegen, in denen das Donorkonstrukt nicht homolog rekombiniert hat und deshalb das *UAS-reaper* Transgen noch im Genom inseriert ist. Die Balancing Kreuzung dient der Eliminierung des *Gal4* Elements und zur Balancierung der Mutation. (modifiziert nach Huang, 2008)

Anhand der roten Augenfarbe konnten 101 Kandidaten mit einem putativ korrekten homologen Rekombinationsereignis isoliert werden. Diese wurden einzeln mit einer Balancerlinie gekreuzt und Stämme etabliert (Abb. 4.13).

Die 101 Kandidaten wurden mittels genomischer Einzelfliegen-PCR untersucht, ob sie das Donorkonstrukt an der richtigen Stelle im Genom, dem *centg* Lokus, integriert haben. Die Primer für die Screening PCR waren so gewählt, dass der *forward* Primer (5'fw) im genomischen Bereich vor dem 5'Homologiearm bindet und der *reverse* Primer (*attp rev*) in der *attp* Site des Donorkonstrukts. Somit erhält man lediglich ein Produkt, wenn das Konstrukt am korrekten Lokus inseriert ist (Abb. 4.14.). Die genomische DNA wurde mit Primern für den *actin* Lokus überprüft. Zeigte die PCR lediglich ein Produkt für *actin* und nicht für die Screening PCR wurde der Stamm verworfen, da es sich mit großer Wahrscheinlichkeit um ein nicht homologes Integrationsereignis handelte. Auf diese Weise konnten zwei Linien identifiziert werden, bei denen das erwartete Fragment der Screening PCR amplifiziert wurde

(*centg9*, *centg23*). Da die *centg23* Linie homozygot letal war, diese Letalität aber nicht über der Defizienz auftrat, wurde die *centg9* (*centg<sup>-/-</sup>*) für die folgenden Analysen verwendet. Die Linie wurde homozygot gekreuzt und per PCR, zusätzlich zur Integration des Donorkonstrukts, auch auf das Fehlen der Exons 5-10 hin untersucht (Abb. 4.14 A, B). In den homozygoten Mutanten wird mit den Primern, die am wildtypischen Locus in den Exons 5-10 (*Del fw + rev*) binden kein Produkt amplifiziert (Abb. 4.14 B). Die PCR mit der Primerkombination *5'fw + attp rev* ergibt ausschließlich in der Mutante ein Amplifikat (Abb. 4.14. B). Somit wurden in der *centg<sup>-/-</sup>* Linie die Exons 5-10 im Genom erfolgreich deletiert und das Donorkonstrukt an den entsprechenden Locus inseriert.

Zusätzlich wurde die Expression von *centg* mittels *Realtime* RT-PCR Analysen untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass die Exons 5-10 sowohl in der Mutante als auch in Fliegen, die heterozygot für die *centg<sup>-/-</sup>* Mutation über einer *centg* Defizienz sind, nicht exprimiert werden (Abb. 4.14. C).



**Abb. 4.14 Verifizierung der *centg<sup>-/-</sup>* Mutante.** **A** Schematische Darstellung der PCR Strategie zur Verifizierung der erfolgreichen Deletion der Exons 5-10 durch das *pGX-cenORF* Donorkonstrukt. Der Primer *5'fw* bindet im genomischen Bereich vor dem 5'Homologiearm und der Primer *attp rev* in der



attp Site des Donorkonstrukts. Diese Kombination führt lediglich bei erfolgreicher Integration des Donorkonstrukts zu einem Amplifikat (rote Pfeile). Die Deletionsprimer *Del fw* + *Del rev* binden in der genomischen Sequenz der Exons 5-10 von *centg*. Durch die erfolgreiche Deletion dieser Exons, kann in der homozygoten Mutante kein Produkt amplifiziert werden (blaue Pfeile). **B** Durch die PCR mit den 5'fw + attp Primern wird in der putativen *centg*<sup>-/-</sup> Mutante ein Produkt von 3550 bp amplifiziert. In der Kontrolle entsteht, durch das Fehlen der attp Site, kein Produkt. Mit der Del Primerkombination wird nur in der Kontrolle ein Fragment von 1250 bp amplifiziert. In der Nullmutante, in der die Exons 5-10 deletiert sind, wird kein Produkt amplifiziert. Die *actin* Primer binden die genomische Sequenz des *actin* Gens und wurden zur Überprüfung der DNA Qualität verwendet (Fragmentgröße 750 bp). **C** *Realtime* RT-PCR Analyse der *centg* Expression in *w*-, homozygoten *centg*<sup>-/-</sup> und Fliegen, die heterozygot für die *centg* Mutation über einer Defizienz für *centg* sind (*centg*<sup>-/-</sup>/*def*).



### 4.3. *Centaurin gamma* als putativer Regulator des Metabolismus

#### 4.3.1. *Centaurin gamma* als positiver Regulator des Insulinsignalweges

*Centaurin gamma* wurde in einem RNAi Screen in *Drosophila* SL2 Zellen als ArfGAP mit einer putativen Funktion im Insulinsignalweg identifiziert (Gündner, 2008).

In diesem Screen konnte gezeigt werden, dass die Reduktion der *centaurin gamma* Expression mittels doppelsträngiger RNA, zu einer Repression der *4E-BP* Genexpression unter Hungerbedingungen führte und damit eine Anpassung an die veränderten Umweltbedingungen verhinderte (Gündner, 2008). Der Translationsrepressor *4E-BP* ist ein zentraler Effektor des Insulinsignalweges. Diese Beobachtung impliziert eine mögliche Funktion von *centaurin gamma* in der korrekten Wahrnehmung oder Reaktion auf nachteilige Umweltbedingungen, wie Stress oder Hunger.

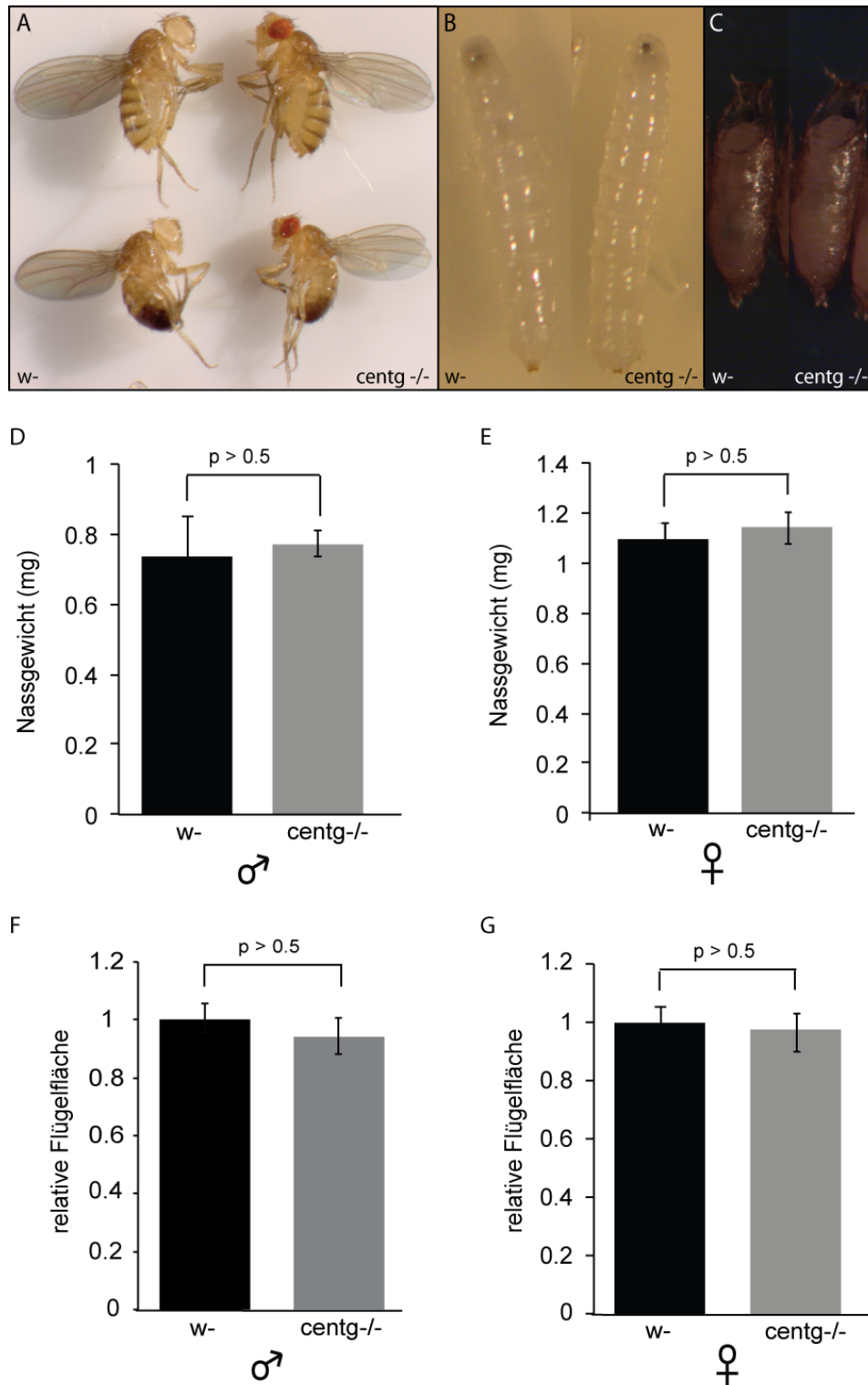
Um eine mögliche Funktion von *centaurin gamma* im Metabolismus *in vivo* zu untersuchen, wurde die zuvor generierte Nullmutante *centg*<sup>-/-</sup> verwendet.

Viele Mutanten mit Mutationen in Genen, die für die Stoffwechselregulation wichtig sind, zeigen oft starke Wachstumsdefekte. Mutanten von positiven Regulatoren des Insulinsignalweges, wie *steppke* oder *chico*, die das Insulinsignal transduzieren, haben eine stark verringertes Körpergewicht und reduzierte Körperlänge (Böhni et al., 1999; Fuss et al., 2006).

Um einen ersten Eindruck zu erhalten, ob die *centaurin gamma* Mutanten einen möglichen Größendefekt aufweisen, wurden Aufnahmen von *centg*<sup>-/-</sup> und *w*- Adulten, Larven und Puppen angefertigt (Abb. 4.15 A-C). Die Mutanten scheinen äußerlich keine Defekte aufzuweisen und sich in keinem Entwicklungsstadium in ihrer Größe von den Kontrollen zu unterscheiden (Abb. 4.15 A-C).

Für eine detaillierte Analyse wurde das Gewicht von Adulten *centg*<sup>-/-</sup> Weibchen und Männchen mit Hilfe einer Feinwaage bestimmt (Abb. 4.15 D+E). Beide Geschlechter zeigen keinen signifikanten Unterschied in ihrem Körpergewicht im Vergleich zu *w*-Kontrollfliegen.

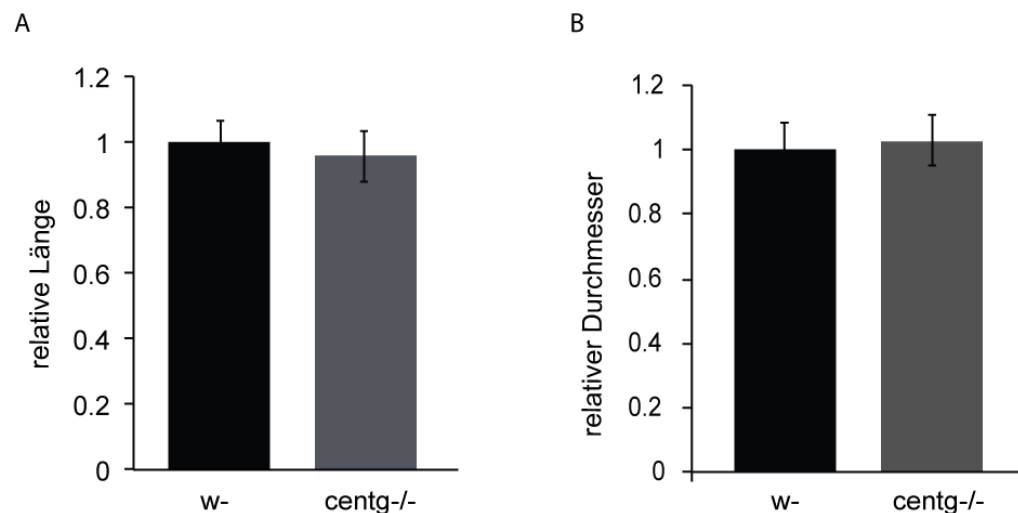
Um einen geringen Wachstumsdefekt, der keinen signifikanten Einfluss auf das Gewicht hat, zu analysieren, wurde die Flügelfläche von *centg*<sup>-/-</sup> und *w*- Fliegen verglichen. Dazu wurden von jeweils 20 männlichen und weiblichen Fliegen die Flügel isoliert und Bilder mit Hilfe eines Lichtmikroskops aufgenommen. Anschließend wurde die Flügelfläche unter Verwendung der Bildbearbeitungssoftware ImageJ bestimmt. Es konnte kein signifikanter Unterschied zwischen der Flügelfläche von Mutanten und Kontrollfliegen festgestellt werden (Abb. 4.15. F+G). Sowohl die Untersuchung des Körpergewichts als auch die Messung der Flügelfläche von *centg*<sup>-/-</sup> Mutanten schließen einen Wachstumsdefekt in adulten Fliegen aus.



**Abb. 4.15** Untersuchung eines putativen Wachstumsdefekts in *centg<sup>-/-</sup>* Adulten. Aufnahmen von *centg<sup>-/-</sup>* und *w-* Adulten (**A**), Larven (**B**) und Puppen (**C**). **D+E** Analyse des Körpergewichts von adulten *centg<sup>-/-</sup>* Nullmutanten im Vergleich zu *w-* Kontrollfliegen. Bei beiden Geschlechtern unterscheidet sich das Gewicht nicht signifikant. **F+G** Analyse der Flügelfläche von adulten *centg<sup>-/-</sup>* Nullmutanten im Vergleich zu *w-* Kontrollfliegen. Sowohl bei den Männchen als auch bei den Weibchen unterscheidet sich die Flügelfläche der Mutanten und der Kontrollfliegen nicht.

Zusätzlich zu den adulten Fliegen wurde die Größe von *centg*<sup>-/-</sup> Larven bestimmt, um einen möglichen Wachstums- bzw. Größendefekt während der Entwicklung zu untersuchen. Die Larven wurden für die Messung durch einen kurzen Hitzeschock immobilisiert, mit einer Kamera über ein Lichtmikroskop aufgenommen und mittels einer Bildverarbeitungssoftware vermessen. Für die Messung wurden 96 Stunden alte Larven verwendet. Es wurde sowohl die Länge als auch der Durchmesser bestimmt. Die Messung des Durchmessers lässt zusätzlich die Untersuchung eines möglichen Fettspeicherungsdefekts zu. Während der drei Larvenstadien können Wachstums- bzw. Fettspeicherungsdefekte leicht festgestellt werden, da in diesen Stadien eine 100fache Gewichtszunahme erfolgt. In den untersuchten Larven des dritten Larvenstadiums konnte weder eine Reduktion der Körperlänge noch des Durchmessers bei den *centg*<sup>-/-</sup> Mutanten im Vergleich zu *w*- Kontrollarven festgestellt werden (Abb. 4.16).

Es konnte gezeigt werden, dass *centaurin gamma* Nullmutanten in keinem untersuchten Entwicklungsstadium einen signifikanten Größendefekt aufweisen.

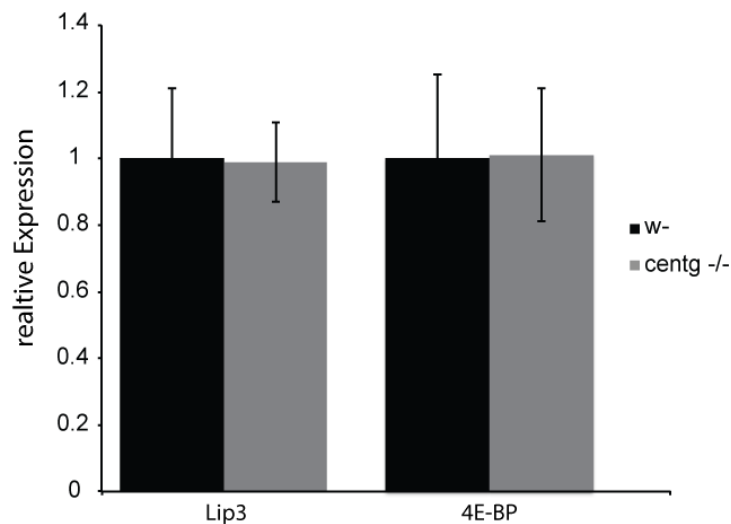


**Abb. 4.16 Untersuchung von Wachstums- und Fettspeicherungsdefekten in *centg*<sup>-/-</sup> Larven.** **A** Die relative Länge von 96 h alten Larven unterscheidet sich nicht signifikant zwischen den *w*- Kontrollarven und den *centg*<sup>-/-</sup> Nullmutanten. **B** Der relative Durchmesser von 96 h alten Larven unterscheidet sich ebenfalls nicht signifikant zwischen den *w*- Kontrollarven und *centg*<sup>-/-</sup> Nullmutanten.

Neben den Wachstumsdefekten, zeigen Mutanten für positive Transduktoren des Insulinsignals, wie *steppke*, eine veränderte Genexpression (Fuss et al., 2006). Die Weiterleitung des Insulinsignals ist in *steppke* Mutanten gestört, dadurch ist , auch

unter günstigen Nahrungsbedingungen, die Genexpression an Hungerbedingungen angepasst. Das fehlende Insulinsignal führt zur vermehrten Expression von *4E-BP* und dem Insulinrezeptor (Fuss et al., 2006). Für *centaurin gamma* wurde bereits gezeigt, dass es in SL2 Zellen ebenfalls einen Einfluss auf die *4E-BP* Expression hat, nun sollte dies auch *in vivo* untersucht werden. Dazu wurden *Realtime* RT PCR Analysen von 96 h alten Larven des dritten Stadiums durchgeführt. Zusätzlich zur *4E-BP* Expression wurde die Expression der Lipase 3 untersucht. *Lip3* dient der Mobilisierung von Fettreserven und wird im Hungerzustand verstärkt exprimiert (Zinke et al., 2002). Die *lip3* Expression dient zur Kontrolle, ob eine veränderte *4E-BP* Expression tatsächlich durch eine Beeinträchtigung des Insulinsignalweges hervorgerufen wird und nicht durch einen zufälligen Hungerzustand.

Die *Realtime* RT-PCR Analysen der *4E-BP* Expression ergaben keinen Unterschied im Expressionslevel in den *centg<sup>-/-</sup>* im Vergleich mit den *w*- Larven (Abb. 4.17). Die veränderte *4E-BP* Expression in SL2 Zellen nach einem RNAi-vermittelten *Knockdown* von *centaurin gamma* wurde *in vivo* nicht bestätigt.



**Abb. 4.17 Die *4E-BP* Expression ist in *centg<sup>-/-</sup>* Mutanten nicht verändert.** *Realtime* RT-PCR Analyse der *lip3* und *4E-BP* Expression in 96 h alten Larven des dritten Stadiums. Die *4E-BP* Expression in *centg<sup>-/-</sup>* Larven unterscheidet sich nicht signifikant von der in *w*- Kontrollarven. Die *lip3* Expression ist ebenfalls nicht verändert.

### 4.3.2. *Centaurin gamma* als negativer Regulator des Insulinsignalweges

Neben den positiven Regulatoren im Insulin/Tor Netzwerk, die bei vorteilhaften Umweltbedingungen aktiv sind und das Insulinsignal weiterleiten, gibt es auch negative Regulatoren. Diese werden aktiviert, sobald kein Insulin vorhanden ist. Zwei Beispiele für negative Regulatoren sind FOXO und *4E-BP* (Jünger et al., 2003; Teleman et al., 2005). Der Transkriptionsfaktor FOXO ist unter normalen Nahrungsbedingungen durch Phosphorylierung inaktiviert und im Zytoplasma lokalisiert. Ist der Organismus Stresskonditionen, wie zum Beispiel Hunger oder oxidativem Stress ausgesetzt, wird FOXO nicht mehr phosphoryliert und kann in den Zellkern translozieren. Im Zellkern aktiviert FOXO Zielgene, die für die Anpassung an die veränderten Umweltbedingungen wichtig sind. Eines dieser Zielgene ist der Translationsrepressor *4E-BP*. *4E-BP* bindet im aktiven Zustand den Translationsinitiationsfaktor 4E-IF und inhibiert so die Translationsmaschinerie.

Da beide Regulatoren ihre essentielle Funktion unter nachteiligen Umweltbedingungen erfüllen, ist es nicht überraschend, dass Mutanten für beide Gene lediglich unter Extrembedingungen starke Defekte zeigen. Mutanten für *4E-BP* und FOXO sind sensitiv gegenüber Hunger und oxidativem Stress und zeigen eine stark verkürzte Überlebensdauer unter beiden Bedingungen (Teleman et al., 2005; Villa-Cuesta et al., 2010).

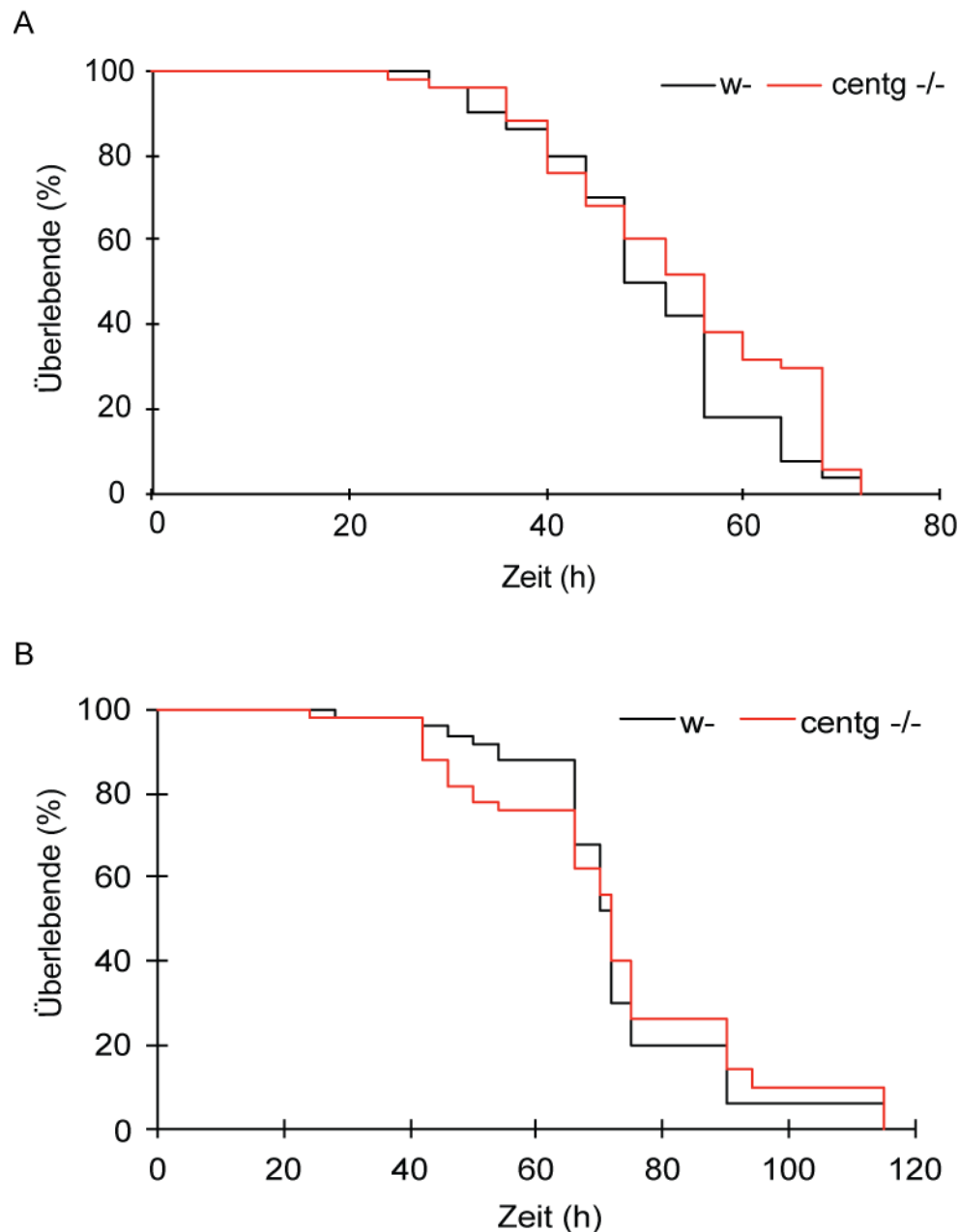
Um zu überprüfen, ob *centaurin gamma* als negativer Regulator im Insulin/Tor Signalweg wirkt, wurde bei *centg*<sup>-/-</sup> Mutanten ebenfalls die Überlebenszeit unter Hunger untersucht. Falls *centaurin gamma* essentiell für die Anpassung an nachteilige Umweltbedingungen ist, sollten die Mutanten eine signifikant verkürzte Überlebensdauer unter Hunger aufweisen.

Für die Hungerexperimente wurden pro Experiment jeweils 50 weibliche und 50 männliche Fliegen verwendet. Diese wurden nach dem Schlüpfen gesammelt und für 24 h gemeinsam auf Standardfutter gehalten, sodass eine Befruchtung der Weibchen möglich war. Danach wurden jeweils 10 Fliegen gleichen Geschlechts in Röhrchen mit Standardfutter überführt. Nach insgesamt 7 Tagen auf Standardfutter wurden die Fliegen auf das Hungermedium transferiert. Dieses bestand aus 0,8% Agarose in PBS. Während des Hungerexperiments wurde alle vier Stunden die Anzahl an toten Fliegen bestimmt.



Die Ergebnisse der Überlebensexperimente wurden mit Hilfe der Statistiksoftware Xlstat ausgewertet. Die Überlebenskurve und die mittlere Überlebensdauer der Fliegen im Experiment wurden mit der Kaplan-Meier-Methode berechnet.

In Abb. 4.18 ist jeweils eine Überlebenskurve für ein Hungerexperiment pro Geschlecht dargestellt. In drei unabhängigen Experimenten konnte für beide Geschlechter kein signifikanter Unterschied in der Überlebensdauer unter Hungerbedingungen festgestellt werden. Sowohl die weiblichen als auch die männlichen *centg*<sup>-/-</sup> Mutanten sind genauso sensitiv gegenüber Hungerstress wie die *w*- Kontrollfliegen (Abb. 4.18). Diese Versuchsergebnisse lassen darauf schließen, dass die Funktion von *centaurin gamma* nicht essentiell für die Anpassung an Hungerstress ist.



**Abb. 4.18** *centg*<sup>-/-</sup> Nullmutanten sind nicht sensitiv gegenüber Hungerbedingungen. **A** Überlebenskurve für ein unabhängiges Hungerexperiment mit 50 Männchen. Die Überlebensdauer der *centg*<sup>-/-</sup> Nullmutanten unterscheidet sich nicht signifikant von derjenigen der *w*- Fliegen ( $p=0,25$ / Log-rank Test). **B** Überlebenskurve für ein unabhängiges Hungerexperiment mit 50 Weibchen. Die Überlebensdauer der *centg*<sup>-/-</sup> Nullmutanten unterscheidet sich nicht signifikant von derjenigen der *w*- Fliegen ( $p=0,583$ / Log-rank Test).

Für den Translationsinhibitor *4E-BP* wurde bereits in anderen Studien im Detail untersucht, was zur verkürzten Überlebensdauer unter Hungerbedingungen führt (Teleman et al., 2005). Die verkürzte Überlebenszeit *4E-BP* Mutanten wird dadurch induziert, dass die Anpassung an den Hungerzustand nicht möglich ist und der

Organismus deshalb die Fettreserven schneller aufbraucht. In *Drosophila melanogaster* wird Fett in Form von Triacylglyceriden (TAGs) im Fettkörper gespeichert. Teleman et al. untersuchten deshalb die TAG Levels von *4E-BP* Mutanten und konnten zeigen, dass die Mutanten zu Beginn des Hungerexperiments über die gleiche Menge an Fettreserven wie die Kontrollen verfügen, diese aber im Laufe des Experiments schneller aufbrauchen und dadurch früher sterben (Telman et al., 2005).

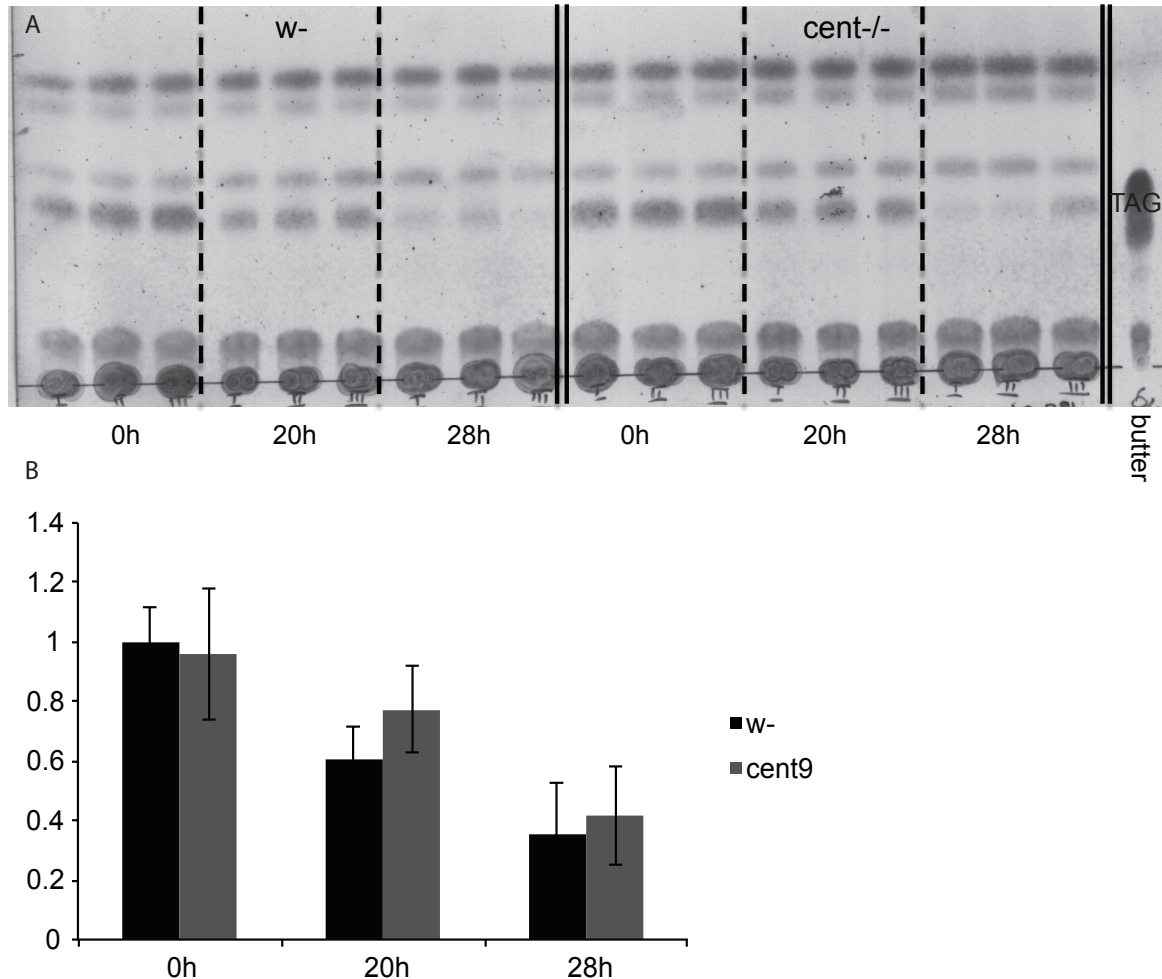
Auch für die *centg*<sup>-/-</sup> Mutante wurden, parallel zu den Hungerexperimenten, die TAG Levels während des Hungerexperiments untersucht. Es sollte analysiert werden, ob *centg*<sup>-/-</sup> Mutanten veränderte TAG Levels besitzen bzw. die Mobilisierung der Fettreserven verändert ist.

Zur Bestimmung von TAG Levels in *Drosophila melanogaster* existieren zwei unterschiedliche Messmethoden. Die TAG Levels lassen sich durch einen kolorimetrischen Assay bestimmen, welcher aber im Feld sehr kontrovers diskutiert wird (Al-Anzi and Zinn, 2010; Hildebrandt et al., 2011). Aus diesem Grund wurde für die folgenden Analysen eine aufwändigere, aber weniger fehleranfällige Methode verwendet, bei der die TAG Levels mittels Dünnschichtchromatographie und anschließender densitometrischer Auswertung bestimmt werden.

Für die TAG Bestimmung wurden *centg*<sup>-/-</sup> Mutanten und *w*- Kontrollfliegen für 7 Tage auf Standardfutter gealtert und anschließend entweder auf Hungermedium transferiert oder bis zum Ende des Experiments auf Standardfutter gehalten. Es wurden 7 Tage alte Fliegen verwendet, da sich in den ersten Tagen nach dem Schlüpfen der adulte Fettkörper noch verändert und dies einen Einfluss auf die gemessene Fettmenge hat. Um unspezifisch lipophile Bestandteile, und damit unter anderem TAGs, zu isolieren, wurden die Fliegen in einer Chloroform/Methanol Mischung mechanisch lysiert, zentrifugiert und der lösliche Überstand für die Analyse mittels Dünnschichtchromatographie verwendet (Abb. 4.19 A). Zur Quantifizierung der TAG Levels wurde die Kieselgelplatte eingescannt und mit Hilfe einer Bildbearbeitungssoftware ausgewertet (Abb. 4.19 B).

Die TAG Levels der adulten Fliegen wurden in Triplikaten an drei Zeitpunkten während des Hungerexperiments gemessen. Die *centg*<sup>-/-</sup> Fliegen besitzen weder zu Beginn (0h) noch im Verlauf des Experiments (20h, 28h) signifikant unterschiedliche TAG Levels im Vergleich zu den Kontrollfliegen (Abb. 4.19.). Die *centg*<sup>-/-</sup>

Nullmutanten verfügen unter Normalbedingungen über die gleiche Speicherfettmenge wie die Kontrollfliegen und können diese genauso effektiv unter Hunger mobilisieren.



**Abb. 4.19 *centg*<sup>-/-</sup> Mutanten zeigen keine Veränderungen in der Mobilisierung ihrer Fettreserven.** **A** Kieselgelplatte, auf der mittels Dünnschichtchromatographie, Lipide aus *centg*<sup>-/-</sup> und *w-* Fliegen aufgetrennt und durch Verkohlungen sichtbar gemacht wurden. Als Marker für TAGs wurde Butter verwendet. Es wurden die TAG Levels von adulten *centg*<sup>-/-</sup> und *w-* Fliegen an 3 verschiedenen Zeitpunkten (0h, 20h, 28h) während des Hungerexperimentes untersucht. **B** Densitometrische Bestimmung und statistische Auswertung der Kieselgelplatte aus A.

Die beschriebenen Experimente zur Untersuchung der Rolle von *centaurin gamma* im Insulin Signalweg konnten zeigen, dass *centaurin gamma* nicht direkt an der Weiterleitung des systemischen Insulinsignals beteiligt ist und eine Anpassung an Hungerbedingungen vermittelt.

### 4.3.3. *Centaurin gamma* unter hochkalorischen Futterbedingungen

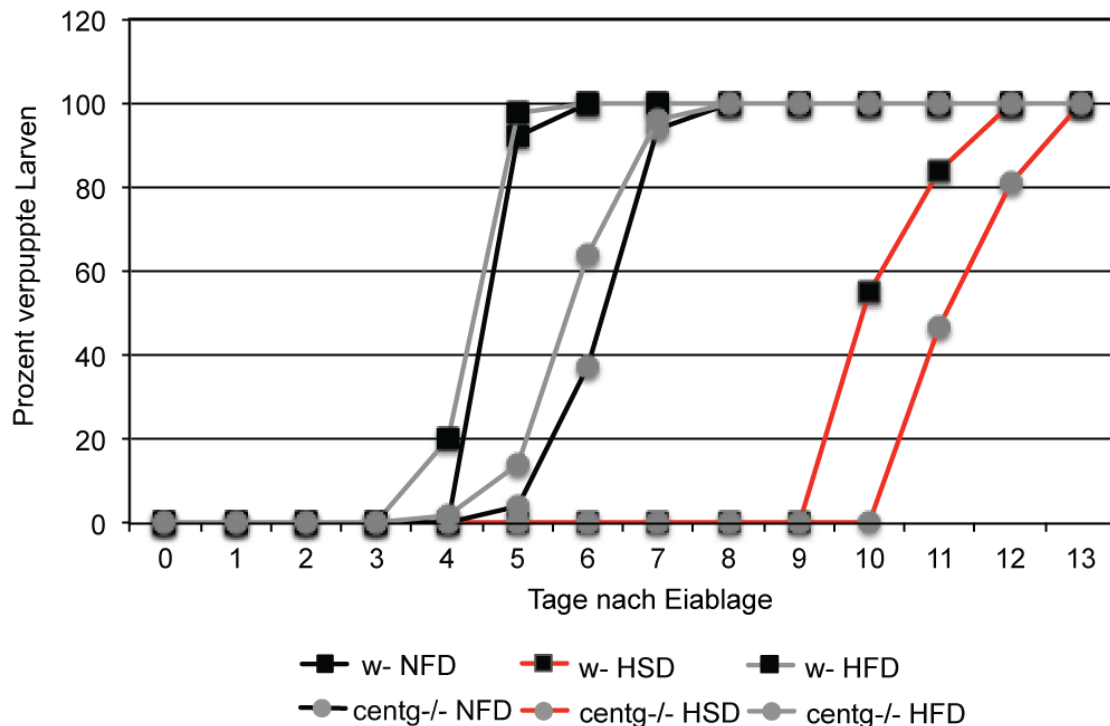
Eine weitere Möglichkeit, Mutanten, die unter Normalbedingungen keine Defekte zeigen, auf eine mögliche Störung in ihrem Stoffwechsel hin zu untersuchen, ist Defekte durch eine hochkalorische Diät zu verstärken und damit sichtbar zu machen. Für Nagetiermodelle (Maus, Ratte) sind Untersuchungen unter hochkalorischen Futterbedingungen weit verbreitet und sehr gut etabliert (Kanasaki and Koya, 2011). Sie werden dazu verwendet, einen möglichen Adipositas- oder Insulinresistenzphänotyp in Mutanten zu untersuchen. Bei Mäusen führt die Gabe von Futter, bei dem 45% der Kalorien aus Fett stammen (HFD), im Gegensatz zu normalem Futter (NFD, 15% Kalorien aus Fett) zu Fettleibigkeit und Insulinresistenz.

Für *Drosophila* sind erst seit kurzem Futterbedingungen bekannt, unter denen Fliegen T2D und Adipositas Phänotypen entwickeln (Birse et al., 2010; Palanker Musselman et al., 2011). Birse et al. konnten zeigen, dass die Gabe eines Futters, das zu 30% aus Kokosnussöl besteht zu erhöhten Triacylglyceridlevels, Insulinresistenz und Herzfehlfunktionen in adulten Fliegen führt (Birse et al., 2010).

Palanker Musselman et al. haben verschiedene hochkalorische Futterbedingungen untersucht und konnten zeigen, dass die Fütterung eines stark zuckerhaltigen Futters (HSD, 70% Saccharose) bei Larven T2D und Adipositas ähnliche Phänotypen induziert. Unter anderem wurde die Entwicklungszeit von Larven auf beiden Futterbedingungen untersucht (Palanker Musselman et al., 2011). Die Entwicklungszeit stellt einen sehr guten Untersuchungsparameter dar, da Mutationen die den Insulinsignalweg betreffen und damit Type-2-Diabetes genetisch abbilden, meistens zu verringertem Wachstum und einer starken Entwicklungsverzögerung führen (Teleman et al., 2012). Es konnte gezeigt werden, dass die Fütterung einer HSD bei den untersuchten Larven zu einer starken Entwicklungsverzögerung, Hyperglykämie und erhöhten TAG Levels führt. Im Gegensatz zum Säugermodell hatte die Fütterung einer HFD (65% Palmfett) keinen Einfluss auf die Entwicklung der Larven und scheint somit keine T2D ähnlichen Phänotypen hervorzurufen (Palanker Musselman et al., 2011).

Um die Entwicklungszeit von *centg*<sup>-/-</sup> Mutanten zu untersuchen, wurden jeweils 50 *centg*<sup>-/-</sup> und *w*- Embryonen auf NFD, HFD und HSD Futter transferiert, sich entwickeln lassen und anschließend die verpuppten Larven gezählt. Abb. 4.20 stellt

graphisch die Entwicklungskurven der beiden Genotypen auf den drei verschiedenen Nahrungsbedingungen dar. Bei beiden Genotypen ist eine starke Entwicklungsverzögerung auf HSD im Vergleich zu den anderen Futterbedingungen festzustellen (Abb. 4.20). Im Vergleich zum Kontrollfutter, auf dem sich die Larven ab Tag 4 verpuppen, verpuppen sich die Larven auf dem HSD Futter erst ab Tag 9. Die HFD hat, wie auch von Palanker-Musselman et al. beschrieben, keinen negativen Einfluss auf die Entwicklungszeit der Larven (Abb. 4.20). Im Vergleich zur *w*-Kontrolle zeigen *centg*<sup>-/-</sup> Mutanten auf allen Futterbedingungen eine leichte Entwicklungsverzögerung (Abb. 4.20). Da diese in allen Futterbedingungen zu beobachten ist, scheint sie aber nicht vom Futter beeinflusst zu sein und keinen metabolischen Ursprung zu haben. Bei den *centg*<sup>-/-</sup> Mutanten lässt sich weder eine Verlängerung noch eine Verringerung der Entwicklungszeit auf verschiedenen Futterbedingungen im Vergleich zur Kontrolle beobachten. Sie entwickeln den gleichen T2D Phänotyp auf dem HSD Futter wie die Kontrolltiere und verpuppen sich 5 Tage später als auf dem Kontrollfutter. Sie haben weder eine erhöhte Sensibilität gegenüber der HSD Bedingung noch zeigen sie eine Resistenz gegenüber den veränderten Nahrungsbedingungen. Die Entwicklungszeit von *centg*<sup>-/-</sup> lässt sich experimentell nicht durch eine Änderung der Nahrungszusammensetzung beeinflussen.

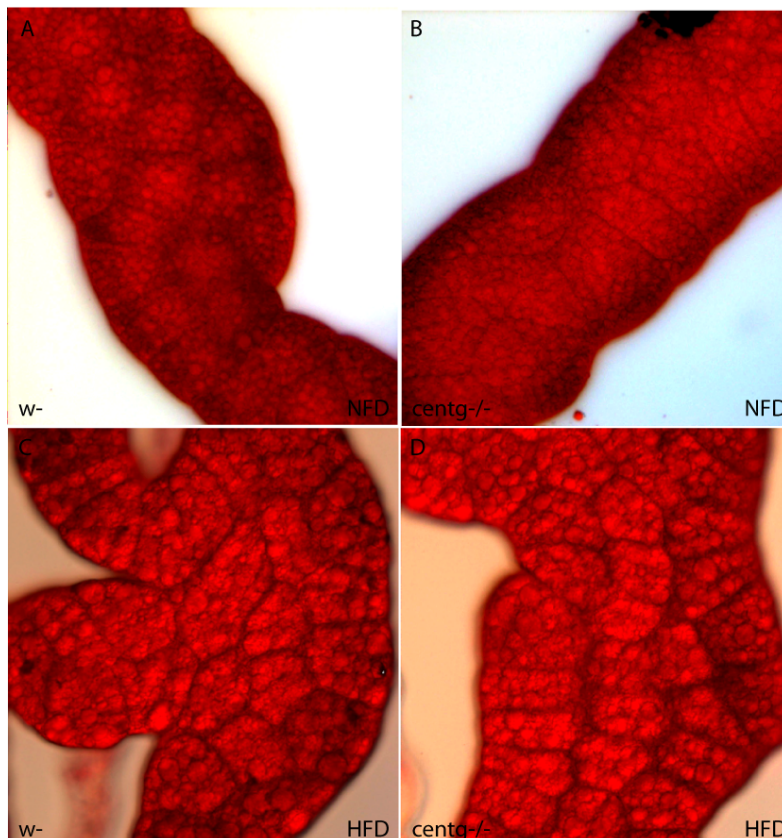


**Abb. 4.20 Die Entwicklungszeit der *centg*<sup>-/-</sup> Nullmutanten auf unterschiedlichen Futterbedingungen ist gleich zu der von Kontrollfliegen.** Die Grafik stellt die Entwicklungszeit (in Tagen) von jeweils 50 *centg*<sup>-/-</sup> (graue Punkte) Larven im Vergleich zu *w*- Larven (schwarze Rechtecke) bis zur Verpuppung auf einem Standardfutter (NFD, grau), einem sehr fetthaltigen Futter (HFD, Schwarz) und einem Futter mit hohem Saccharoseanteil (HSD, rot) dar.

Neben der verlängerten Entwicklungszeit auf dem HSD Futter, konnten Palanker Musselman et al. auch zeigen, dass die HSD die Menge an gespeicherten TAGs drastisch erhöht. Zum Nachweis der TAGs wurde eine Oilred O Färbung des Fettkörpers der Larven durchgeführt (Palanker Musselman et al., 2011). Oilred O ist ein fettlöslicher Azofarbstoff, der neutrale Triacylglyceride und Lipide rot färbt.

Um die *Drosophila centaurin gamma* Nullmutanten auf einen entsprechenden Phänotyp hin zu untersuchen, wurde ebenfalls eine Oilred O Färbung des Fettkörpergewebes durchgeführt. Für die Färbung wurde Fettkörpergewebe aus wandernden *centg*<sup>-/-</sup> und *w*- L3 Larven isoliert und mit Oilred O Lösung inkubiert. Anschließend wurde das gefärbte Fettgewebe eingebettet und mit Hilfe einer Kamera am Lichtmikroskop aufgenommen (Abb. 4.21). Die Aufnahmen zeigen, dass der Fettkörper der *centg*<sup>-/-</sup> Mutanten, die sich auf dem Standardfutter entwickelt haben, gleichartig eingefärbt ist wie bei Kontrollarven (Abb. 4.21 A+B). Die Fettkörperzellen und die Lipidtröpfchen scheinen ebenfalls die gleiche Größe und Morphologie in beiden Genotypen zu haben. Außerdem scheinen die Zellen des

Fettkörpers normal differenziert und die TAG Speicherung nicht beeinträchtigt zu sein. Weiterhin führte die HSD in beiden Genotypen zu einer Vergrößerung der Fettkörperzellen und der Lipidtröpfchen (Abb. 4.21 C+D). Somit induziert die Fütterung der HSD auch in den *centg*<sup>-/-</sup> eine vermehrte Einlagerung von TAGs im Fettkörper und damit einen Adipositas ähnlichen Phänotyp.



**Abb. 4.21** *Centg*<sup>-/-</sup> Mutanten zeigen keine Veränderung in der Anhäufung und Speicherung von TAGs im Fettkörper. Oilred O Färbungen von Fettkörpergewebe von *w*- (**A+C**) und *centg*<sup>-/-</sup> (**B+D**) Larven des dritten Larvenstadiums, die sich entweder auf Standardfutter (NFD; **A+B**) oder einem Futter mit hohem Saccharosegehalt (HSD; **C+D**) entwickelt haben.



#### 4.4. Expressionsmuster von *centaurin gamma*

Neben der detaillierten Analyse einer Nullmutante, kann auch das Expressionsmuster eines Gens wichtige Hinweise auf seine biologische Funktion geben. Aus diesem Grund wurden für das *centaurin gamma* Gen *in situ* Hybridisierungsstudien durchgeführt. Bei der *in situ* Hybridisierung werden chemisch markierte RNA Sonden zur Detektion der endogenen mRNA in fixiertem Gewebe verwendet. Die markierten Sonden binden spezifisch durch homologe Basenpaarung an die Ziel-RNA. Diese Methode ermöglicht das mRNA Expressionsmuster eines Gens in einem Gewebe oder im Gesamtorganismus zu einem bestimmten Zeitpunkt zu untersuchen.

Zur Herstellung einer *centaurin gamma* spezifischen Digoxigenin-UTP markierten RNA-Sonde wurde die Exonssequenz 5-10 verwendet. Die hergestellte Sonde wurde für die Detektion der *centg* RNA in Embryonen und Larvengewebe verwendet.

Um die Spezifität der Sonde zu testen, wurden *in situ* Hybridisierungen mit *centg*<sup>-/-</sup> Embryonen und Embryonen, die *centg* im Streifenmuster des *paired* Gens überexprimieren, durchgeführt (Abb. 4.22 A+B). Die *centg*<sup>-/-</sup> Mutanten, die die Exons 5-10 nicht exprimieren, wiesen keine Färbung auf (Abb. 4.22 A). Die *paired x UAS-centg in situ* Hybridisierung zeigte das charakteristische Streifenmuster und bestätigte somit ebenfalls die Spezifität der Sonde (Abb. 4.22 B). Beide Kontrollen belegen, dass die *centaurin gamma in situ* Sonde spezifisch die *centaurin gamma* mRNA detektiert. Somit konnte die Sonde zur Untersuchung des zeitlichen und räumlichen *centaurin gamma* Expressionsmusters verwendet werden.

Für eine detaillierte zeitliche Expressionsanalyse der *centaurin gamma* Expression wurden *w*- Embryonen einer Übernachtsablage verwendet. Die früheste *centg* Expression während der Entwicklung lässt sich im zellulären Blastoderm Stadium detektieren (Abb. 4.22 C). Zu diesem Zeitpunkt wird *centg* schwach ubiquitär und gleichzeitig sehr stark im Bereich des Kopfektoderms anterior zur entstehenden Kopffalte exprimiert. Ab Stadium 9 ist *centg* stark in Gewebe des sich entwickelnden Nervensystems exprimiert (Abb. 4.22 D). In diesem Stadium lösen sich die proliferierenden Neuroblasten aus dem Neuroektoderm. Eine *centg* Expression lässt sich sowohl in Neuroblasten des Kopfbereiches als auch des ventralen Nervenstrangs detektieren. Außerdem sind Teile des Mitteldarms gefärbt. In den folgenden Stadien ist *centaurin gamma* weiterhin in vielen Bereichen des zentralen

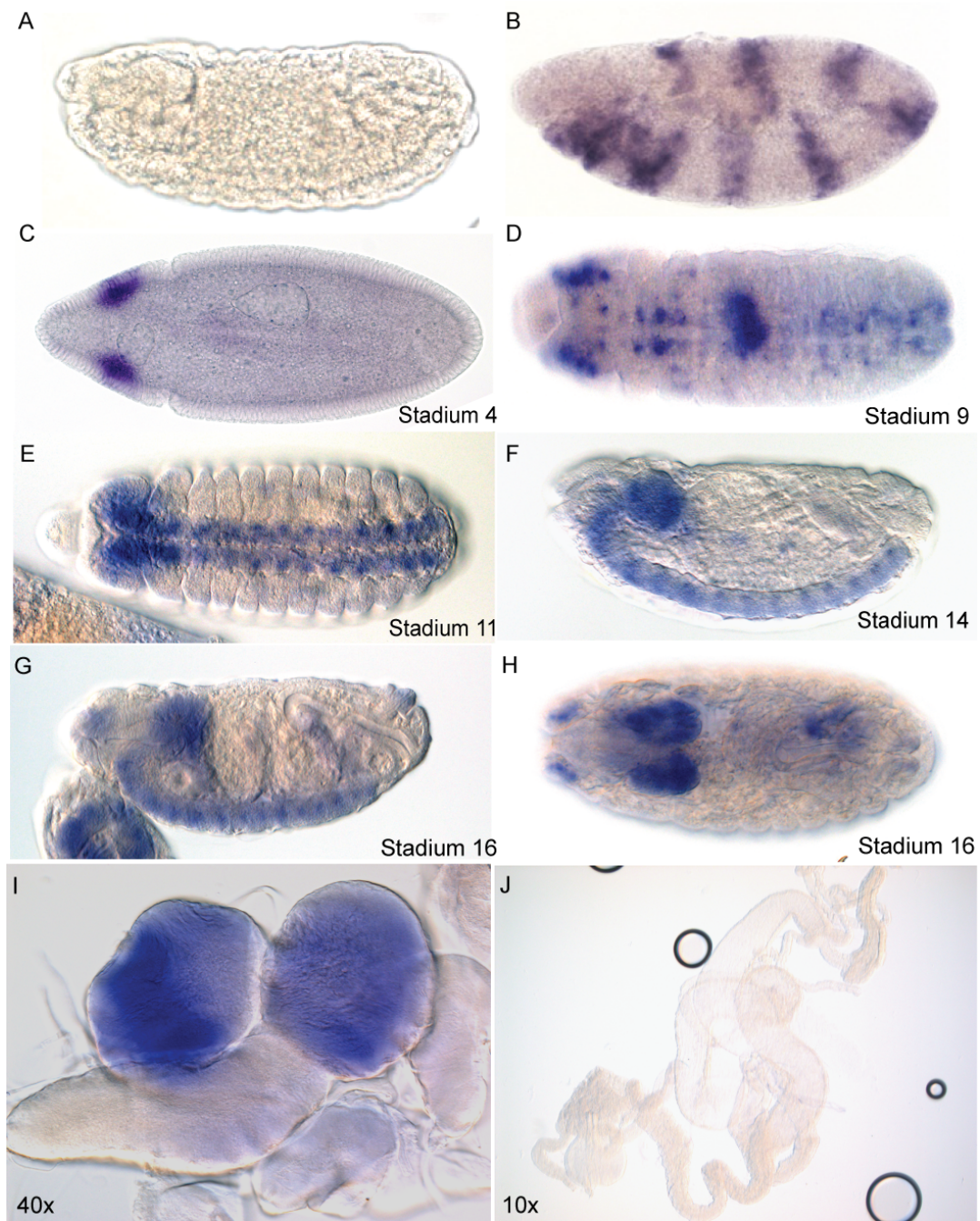
und peripheren Nervensystems exprimiert. Die *centg* mRNA lässt sich in verschiedenen sensorischen Organen (sensorischer Komplex des Kopfes, dorso-lateraler sensorischer Komplex), im Gehirn und im ventralen Nervenstrang detektieren (Abb. 4.22 E-H).

Die *in situ* Analysen der *centaurin gamma* Expression in Embryonen zeigte eine überwiegende Lokalisierung der mRNA in Geweben des Nervensystems zu allen Entwicklungsstadien.

Zusätzlich zu den Untersuchungen in Embryonen wurden auch *in situ* Expressionsanalysen in Larvengeweben durchgeführt. Dazu wurde Gewebe von Larven des dritten Larvenstadiums verwendet.

In Larven ist eine spezifische *centaurin gamma* Expression ausschließlich auf das Gehirn beschränkt (Abb. 4.22 I+J). Es lässt sich im Gegensatz zum Embryo keine *centg* mRNA im Verdauungstrakt detektieren (Abb. 4.22 J). Eine Expression in den Imaginalscheiben konnte nicht eindeutig gezeigt werden, da es sowohl Präparate mit und ohne Färbung in unabhängigen Experimenten gab (Daten nicht gezeigt). Eine eindeutige Expression von *centg* zeigen die optischen Loben des Gehirns. Die intensivste Färbung findet sich in zwei seitlichen Streifen. Dieser Bereich entspricht dem OPC (äußeres proliferatives Zentrum), welches ein Teil des Vorläufergewebes der optischen Loben ist. Hier sind Neuroblasten lokalisiert, die während der späten Larvenentwicklung mitotisch aktiv sind.

Sowohl die Expressionsstudien in Embryonen als auch in Larven zeigen für *centaurin gamma* eine überwiegende Expression in Geweben des Nervensystem, besonders in Neuroblasten, die in mitotisch aktiven Bereichen lokalisiert sind.



**Abb. 4.22 *Centaurin gamma* wird hauptsächlich im Nervensystem exprimiert.** *In situ* Hybridisierungen in Embryonen (A-H) und Larvengeweben mit einer Digoxigenin-markierten antisense RNA-Sonde gegen die Exons 5-10 von *centg*. **A** Im Stadium 4 wird *centg* leicht ubiquitär und sehr stark im procephalen Ektoderm exprimiert. **B-C** Die *centg* Expression lässt sich in den Stadien 9-11 im ventralen procephalen Ektoderm, den procephalen Neuroblasten, dem Gehirn, dem ventralen Nervenstrang, den Neuroblasten des ventralen Nervenstrangs und Teilen des Mitteldarms detektieren. **D-F** In den späteren Stadien (14-16) wird *centg* im Gehirn, in sensorischen Organen des Kopfes, in den dorsalen/ lateralen sensorischen Komplexen, dem ventralen Nervenstrang und teilweise im Mitteldarm exprimiert. **G** In Larven des dritten Larvenstadiums wird *centg* stark in den optischen Loben und schwach im ventralen Nervenstrang und den Imaginalscheiben exprimiert. **H** In Organen des Verdauungstraktes lässt sich keine *centg* Expression detektieren.



## 4.5. *Centaurin gamma* loss- und gain-of-function Studien

### 4.5.1. Generierung und Test der *centaurin gamma* Überexpressions- und RNAi Linien

Die bereits beschriebenen Experimente deuten daraufhin, dass *centaurin gamma* nicht an der Regulation von Wachstum bzw. der Energiehomöostase beteiligt ist. Die durchgeführten Expressionsstudien deuten eher auf eine Funktion im Nervensystem hin. Um zusätzliche Hinweise auf seine biologische Funktion zu erhalten, wurden Überexpressions- und RNAi-Studien durchgeführt.

Dazu wurde das GAL4-UAS System verwendet. Dieses ermöglicht die Überexpression bzw. die Herunterregulation der Expression eines Zielgens *in vivo* zu einem bestimmten Zeitpunkt oder in einem bestimmten Gewebe. Die cDNAs der *centg* Transkripte *cenRA* und *cenRB* wurden hierfür in den pUAST Vektor kloniert. Der pUAST-Vektor kodiert für die UAS (upstream activating sequence) Sequenz, einen Enhancer, der vom GAL4 Transkriptionsfaktor erkannt wird. Der GAL4 Transkriptionsfaktor kann unter einem Zeit- oder Gewebespezifischen Promotor exprimiert werden und so die Expression des Zielgens variieren. Um die *centg* Expression *in vivo* zu modulieren, wurden zwei unabhängige Fliegenlinien verwendet, wovon eine GAL4 exprimiert und eine zweite ein *centg* Konstrukt hinter UAS Sequenzen. Zur Untersuchung von *centaurin gamma* mehrere unabhängige Fliegenlinien für drei unterschiedliche Konstrukte erzeugt. Das Konstrukt *UAS-cenRA* kodiert für die cDNA des *cenRA* Transkripts, ein zweites Konstrukt, *UAS-cenRAHA*, für das *cenRA* Transkript mit einem Hämagluthinin (HA) Tag und das dritte, *UAS-cenRBMyC*, für die *cenRB* cDNA mit einem Myc Tag.

Die Expression der Konstrukte wurde mit Hilfe von verschiedenen Methoden untersucht und bestätigt. Die *Realtime* PCR Analyse und die *in situ* Hybridisierung zeigen die erfolgreiche Überexpression auf Transkriptebene (Abb. 4.22; Abb. 4.23).

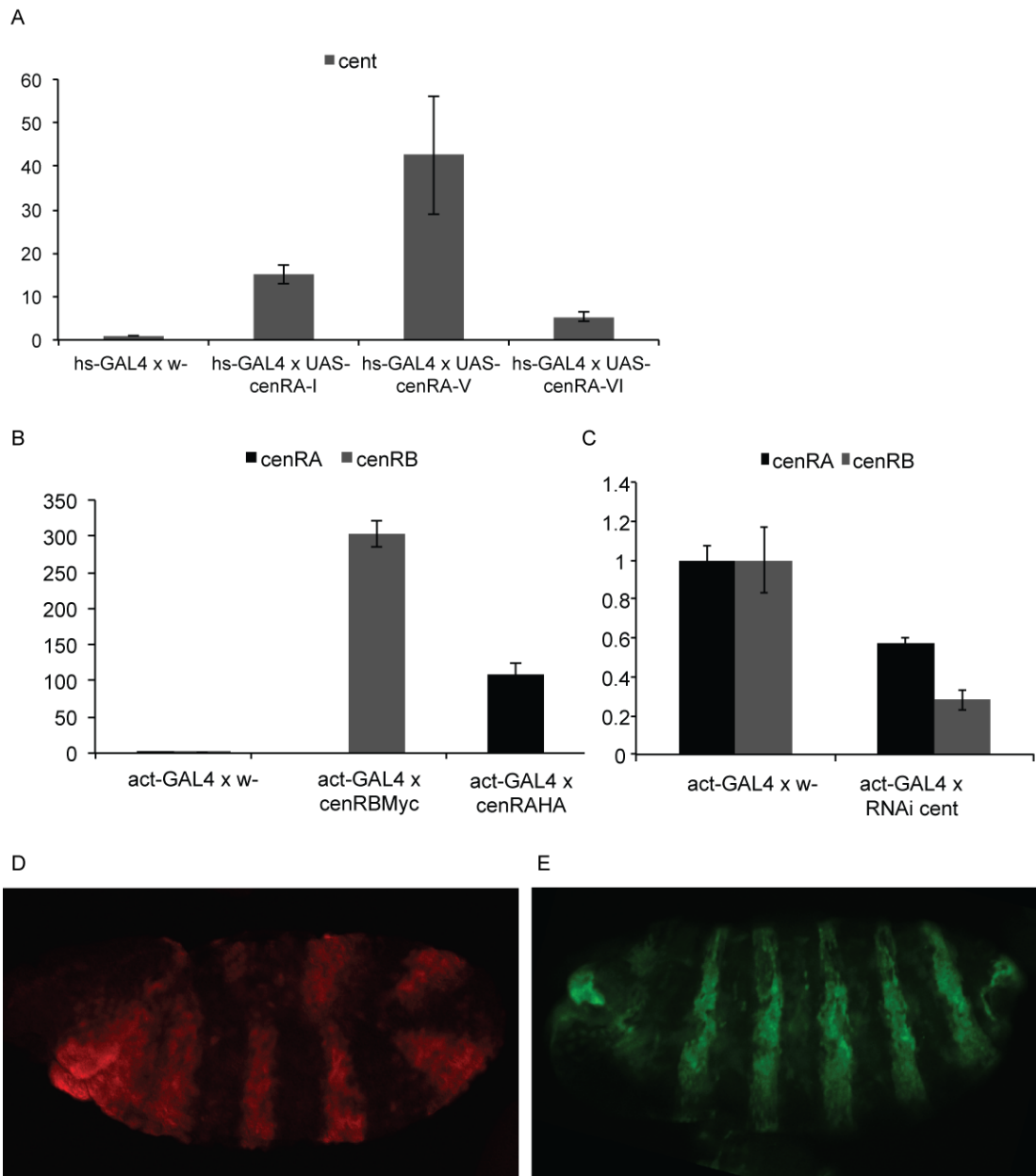
Die Überexpression von *UAS-cenRA* wurde durch die Kreuzung mit einer hs (Hitzeschock) - GAL4 Treiberlinie induziert und die RNA von L3 Larven für die anschließende *Realtime* PCR Analyse verwendet (Abb. 4.23 A). Alle drei unabhängigen Linien zeigen die erwartete erhöhte Expression von *centg*, wobei die Überexpression des *UAS-cenRA-V* Konstruktes die stärkste Induktion zeigt. Für die

Überexpression der *cenRBMyc* und *cenRAHA* Konstrukte wurde eine actin-GAL4 Treiberlinie verwendet und ebenfalls die Überexpression in L3 Larven mittels *Realtime* RT-PCR untersucht (Abb. 4.23 C). Auch für diese Konstrukte konnte eine erhöhte Expression detektiert werden.

Die *in situ* Hybridisierung wurde nach der oben beschriebenen Methode durchgeführt und bestätigte die Überexpression der *UAS-cenRA* Konstrukte. In Abb. 4.22 B ist exemplarisch das Ergebnis für die *UAS-cenRA-V* Linie dargestellt.

Für die beiden getaggen Konstrukte (*UAS-cenRBMyc*, *UAS-cenRAHA*) war zusätzlich eine Verifizierung auf Proteinebene möglich. Hierzu wurden die Konstrukte mit Hilfe einer paired-GAL4 Treiberlinie überexprimiert und die Embryonen mit einem Antikörper gegen den entsprechenden Proteintag detektiert. Beide Färbungen zeigen das charakteristische Streifenmuster des paired Segmentgens (Abb. 4.23 D+E). Es sind exemplarisch die Färbungen für *UAS-cenRAHA-I* und *UAS-cenRBMyc-II* gezeigt.

Zusätzlich zu den Überexpressionskonstrukten wurde eine RNAi Linie charakterisiert, die den *knockdown* der beiden *centg* Transkripte induziert. Es handelt sich dabei um die Linie KK100123, die von der VDRC Stammsammlung bezogen wurde und ebenfalls mittels *Realtime* RT-PCR auf ihre Funktionalität überprüft wurde (Abb. 4.23 C). Die RNAi zeigt einen *knockdown* Effekt auf beide Transkripte, wobei der Einfluss auf das *cenRB* Transkript wesentlich deutlicher ist. Beim *Knockdown* mit dem ubiquitären Treiber actin-GAL4 reduziert sich die Expression von *cenRA* um ca. 40% und von *cenRB* um 80% (Abb. 4.23 C).



**Abb. 4.23 Verifizierung der *centg* Überexpressionskonstrukte.** **A** *Realtime* RT-PCR Analyse der *UAS-cenRA* Konstrukte. *CenRA* wird, induziert durch *hs-GAL4*, in Larven des dritten Entwicklungsstadiums überexprimiert. **B** *Realtime* RT-PCR Analyse der *cenRAHA* und *cenRBMyc* Konstrukte. Die *CenRAHA* und *cenRBMyc* Konstrukte werden, induziert durch *hs-GAL4*, in Larven des dritten Entwicklungsstadiums überexprimiert. **C** *Realtime* RT-PCR Analyse des *cenRA* bzw. *cenRB* Knockdowns in der KK100123 RNAi Linie induziert durch *act-GAL4* in Larven des dritten Entwicklungsstadiums. **D+E** Immunfluoreszenzfärbungen von Embryonen, in denen *UAS-cenRAHA* (rot) und *UAS-cenRBMyc* (grün) überexprimiert und mit dem entsprechenden Tag Antikörper detektiert wurden.

#### 4.5.2. *Centaurin gamma* loss- und gain-of-function Screen

Um mögliche biologische Funktionen von *centaurin gamma* zu untersuchen, wurden die erfolgreich getesteten Überexpressions- bzw. RNAi Linien mit Treiberlinien, die GAL4 in unterschiedlichen Geweben exprimieren, gekreuzt (Tabelle 4.3.).

Anschließend wurden die Nachkommen, die die *centg* Konstrukte exprimieren auf verschiedene Phänotypen hin untersucht.

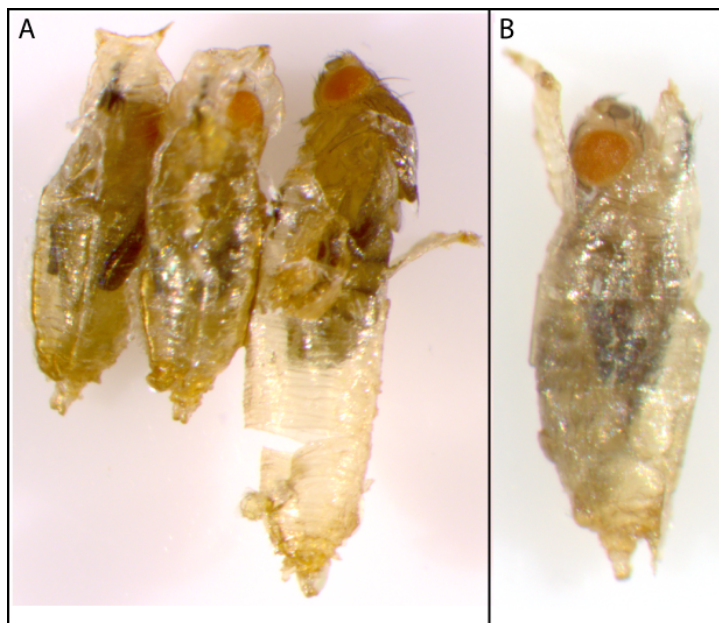
Tabelle 4.3 fasst die Ergebnisse des *gain-* bzw. *loss-of-function* Screens für *centaurin gamma* zusammen. Die Nachkommen der GAL4/UAS Kreuzungen wurden mikroskopisch auf morphologische Veränderungen, auf ihr Flugverhalten und auf Letalität untersucht. Die Überexpression von *centg* mit den starken ubiquitären Treibern *actin-GAL4* und *tubulin-GAL4* führt bei allen Linien zu einer vollständigen Letalität. Die Fliegen sterben im späten Puppenstadium bzw. während des Schlüpfens (Tabelle 4.3). Bei den meisten Puppen ist die Puppenhülle bereits geöffnet und einige Fliegen versuchen die Hülle zu verlassen, sterben aber spätestens während des Schlüpfprozesses (Abb. 4.24).

GAL4- Linien	Gewebe	UAS- cenRBMyc-I	UAS- cenRAHA III	UAS- cenRA V	UAS- RNAi cent
<b>actin</b>	ubiquitär	pupal letal	pupal letal	pupal letal	pupal letal
<b>tubulin</b>	ubiquitär	pupal letal	pupal letal	pupal letal	pupal letal
<b>daughterless</b>	ubiquitär	pupal letal	-	-	Flügelphänotyp
<b>cg</b>	Fettkörper, Hämozyten	-	-	-	-
<b>lsp2</b>	Fettkörper, drittes Instar	-	-	-	-
<b>elav</b>	postmitotische Neurone	-	-	-	-
<b>repo</b>	Gliazellen	-	-	-	-
<b>MHC</b>	Muskeln	-	-	-	-
<b>Mef-2</b>	Muskeln	-	-	-	-
<b>worniu</b>	Neuroblasten	-	-	-	-



<b>31-1</b>	Neuroblasten	-	-	-	-
<b>Ok371</b>	Motoneurone	-	-	-	-
<b>Vglut</b>	Glutamenerge Neurone	-	-	-	-
<b>E105</b>	embryonales NS + Muskeln	-	-	-	-
<b>A51</b>	embryonales NS + Muskeln segmentspezifisch	-	-	-	-

**Tabelle 4.3 Zusammenfassung der Ergebnisse der *loss-* und *gain-of-function* Studien.** In der ersten Spalte sind die GAL4 Treiberlinien aufgeführt. In der zweiten Spalte die Gewebe, in denen die entsprechenden Treiberlinien die Expression induzieren. In den Spalten sind jeweils die beobachteten Phänotypen in den Nachkommen der Kreuzungen zwischen den GAL4 Treiberlinien und den entsprechenden Überexpressionslinien aufgelistet (- bedeutet kein Phänotyp).



**Abb. 4.24 Die ubiquitäre Überexpression von *centaurin gamma* führt zu pupaler Letalität.** Aufnahmen von Fliegen, die *UAS-cenRAHA* unter *actin-GAL4* (A) oder *tubulin-GAL4* (B) überexprimieren, was zu Letalität in der Puppe bzw. während des Schlüpfens führt.

Für das *cenRBMyc* Konstrukt ist neben der Überexpression mit *act-GAL4* und *tub-GAL4* auch die Überexpression mit dem *daughterless-GAL4* Treiber letal. Dieser

ebenfalls sehr starke Treiber induziert die Expression hauptsächlich in mesodermalem Gewebe. Die Letalität von *da-GAL4 x cenRBMyc* Fliegen könnte einerseits auf eine unterschiedliche Expression der zwei *centg* Isoformen hindeuten oder andererseits mit der sehr starken Überexpression des *cenRBMyc* Konstrukts zu erklären sein. Das *cenRBMyc* Konstrukt führte in der Testkreuzung zu einer dreimal so starken Expression wie das *cenRAHA* Konstrukt (Abb. 4.23) und könnte so auch bei einem geringfügig schwächeren Treiber Letalität hervorrufen.

Die Überexpression des *centg* RNAi Konstrukts mit den ubiquitären Treibern *actin-GAL4* und *tubulin-GAL4* führt ebenfalls zu pupaler Letalität bei 100% der Nachkommen. Außerdem führt die Überexpression mit *da-GAL4* zu einem auffälligen Flügelphänotyp. Diese Fliegen sind nicht in der Lage ihre Flügel nach dem Schlüpfen aufzufalten (Daten nicht gezeigt). Die Ergebnisse der RNAi Linie stehen im Widerspruch zu den Analysen der *centg knockout* Mutante, welche weder eine hohe Letalität noch einen Flügelphänotyp aufweist. Eine mögliche Erklärung für diese Diskrepanz könnte ein *off-target* Effekt der RNAi Linie sein. Im Falle des Konstrukts KK100123 ist das noch nicht beschriebene Gen CG4658 als off-target Gen bekannt (VDRC Datenbank), das während der Regeneration von Flügelimaginalscheiben exprimiert wird (Blanco et al., 2010).

Neben der Letalität wurden alle Linien auch auf morphologische Veränderungen und ihre Flugfähigkeit untersucht. Abgesehen von der ubiquitären Expression von *centg* führt keine der gewebespezifischen Überexpressionen zu einem auffälligen Phänotyp. Keine Linie zeigte äußerliche morphologische Veränderungen oder eine Veränderung im Flugverhalten.

Die ubiquitäre *centg* Überexpression führt, besonders während des Puppenstadium, zu schweren Defekten. Außerdem scheint die Überexpression einen Einfluss auf die Bewegungsfähigkeit der Fliegen zu haben, da sich diese nicht oder nur teilweise aus der Puppenhülle befreien können (Abb. 4.24).

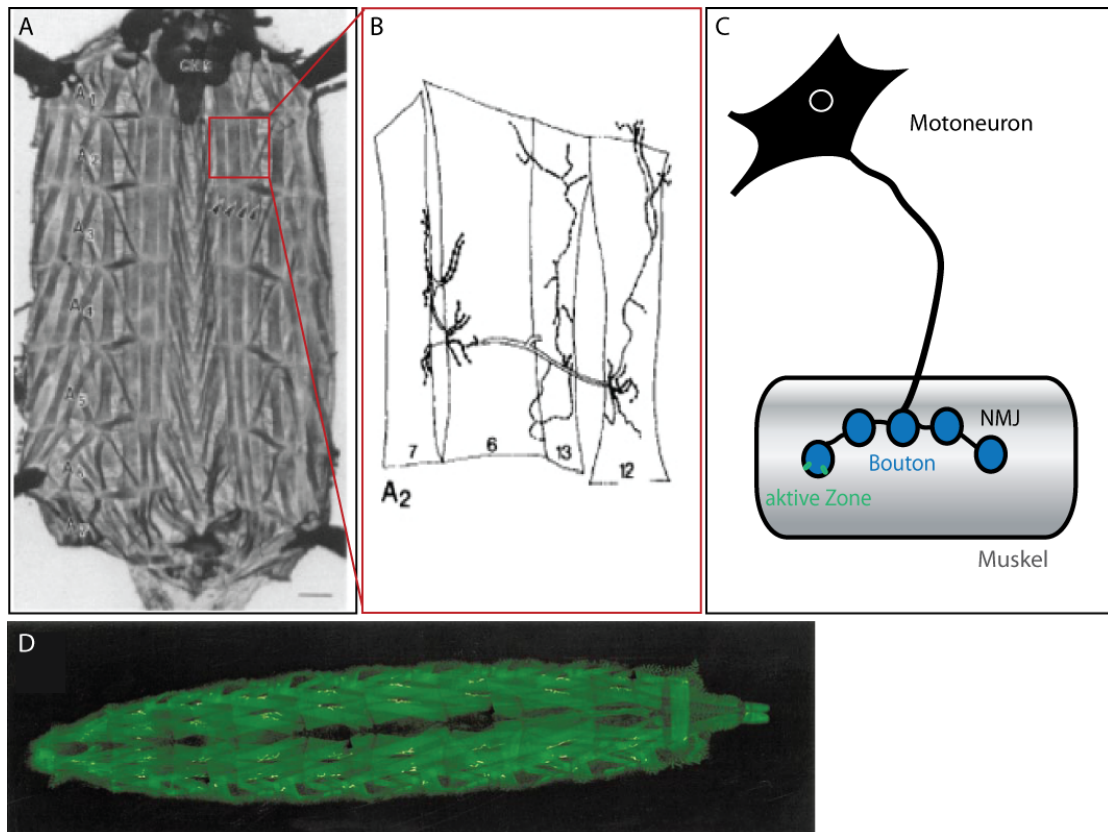
## 4.6. *Centaurin gamma* an den NMJs

### 4.6.1. *centaurin gamma* beeinflusst die Morphologie der Körperwandmuskeln und die Innervierung durch die Motoneurone

Zur Untersuchung möglicher Veränderungen, die für die eingeschränkten Bewegungsfähigkeit bzw. Letalität der *centaurin gamma* Überexpressionslinien verantwortlich sein könnten, wurden die Morphologie und das Innervierungsmuster von peripheren motorischen Neuronen und den entsprechenden Muskeln untersucht.

Ein attraktives Modellsystem, um nervöse oder muskuläre Defekte in *Drosophila melanogaster* zu untersuchen, sind die larvalen NMJs (neuromuskuläre Synapsen). NMJs bilden die Kontaktbereiche zwischen Motoneuronen und den zu innervierenden Körperwandmuskeln (Abb. 4.25C). Die Körperwandmuskeln werden von multikernigen Muskelfasern gebildet, welche in einem repetitiven Muster mit 60 Muskelfasern pro Segment angeordnet sind (Abb. 4.25A, Abb. 4.26B). Obwohl sich die Fläche der Körperwandmuskeln während der Larvenstadien um bis um das 100 fache vergrößert, ist ihre räumliche Anordnung bereits im Embryo festgelegt und in abdominalen Hemisegmenten gleich. Dies erlaubt einzelne Muskeln leicht zu identifizieren und ihre Morphologie bzw. ihre Innervierung zu untersuchen.

Bei den NMJs unterscheidet man den präsynaptischen (nervösen) und den postsynaptischen (muskulären) Bereich, welche durch den synaptischen Spalt voneinander getrennt sind. Kugelförmige axonale Verdickungen, in denen sich die aktiven Bereiche befinden und die Neurotransmitterausschüttung stattfindet, werden Boutons genannt (Abb. 4.29 C). Die ersten Kontakte zwischen den Muskeln und den Motoneuronen werden schon im Embryo gebildet. Im Gegensatz zu NMJs von Säugetieren sind *Drosophila* NMJs aber sehr dynamisch und können während der gesamten larvalen Entwicklung die Anzahl an Boutons und das Verzweigungsmuster ändern. Parallel zum Wachstum der Muskeln verändert sich auch die Morphologie der NMJs. Die Anzahl der Boutons und aktiven Zonen kann sich in dieser Periode um das 10 fache vergrößern. Die Innervierung der Muskeln folgt jedoch einem definierten Muster und befindet sich an einer distinkten Stelle auf dem Muskel.



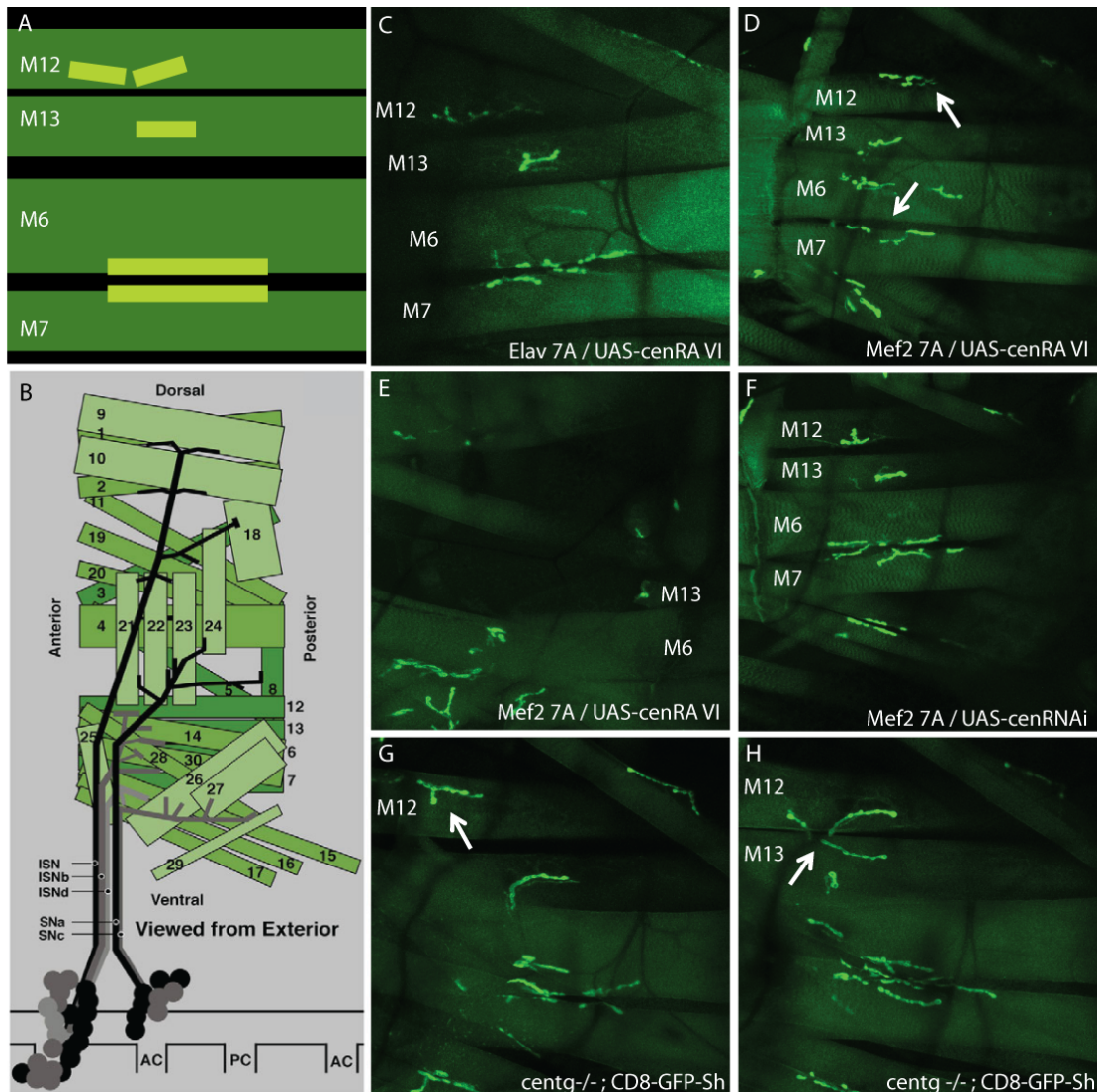
**Abb. 4.25 *Drosophila* NMJs als Modellsystem für die Untersuchung nervöser und muskulärer Defekte.** **A** Filetpräparation einer Larve des dritten Larvenstadiums. A1-A7 markieren die Körpersegmente mit den entsprechenden repetitiv angeordneten Körperwandmuskeln (60 pro Segment) (modifiziert nach (Budnik et al., 1990). **B** Schematische Vergrößerung der Muskelpaare 6/7 und 12/13 des A2 Segmentes und deren innervierende NMJs. **C** Schematische Darstellung eines Körperwandmuskels (grau) und dem zugehörigen motorischen Neuron (schwarz). Die NMJ bildet den Kontaktbereich zwischen Muskel und Neuron. Axonale Verdickungen der NMJ werden Boutons (blau) genannt und beinhalten die aktiven Zonen (grün), in denen die Neurotransmitterausschüttung stattfindet. **D** Konfokale Aufnahme einer L3 Larve, die den Reporter *CD8-GFP-Shaker* exprimiert (Zito et al., 1999). Durch den Reporter werden sowohl die Muskeln (dunkelgrün) als auch die NMJs (hellgrün) sichtbar gemacht.

Um die larvalen NMJs zu analysieren gibt es zwei experimentelle Ansätze. Für detaillierte immunhistochemische oder elektrophysiologische Untersuchungen, werden die Körperwandmuskeln und die innervierenden NMJs, die an der Innenseite der Kutikula liegen, frei präpariert und anschließend analysiert (Abb. 4.29 A) (Budnik et al., 1990). Für morphologische Analysen ist jedoch ein *in vivo* Imaging Ansatz vorteilhafter, da dabei die Larve intakt bleibt und somit ausgeschlossen werden kann, dass morphologische Veränderungen durch die Präparation verursacht werden (Zito et al., 1999). Für diesen Ansatz wird ein GFP-Reporter verwendet, welcher die NMJs durch die Kutikula hindurch sichtbar macht und die Detektion mit einem Laser-Scanning-Mikroskop ermöglicht (Abb. 4.29 D). Das GFP-Protein ist an ein chimäres

CD8-Shaker Protein gekoppelt, welches Teile des humanen T-Lymphozyten-Proteins CD8 zur Membranlokalisierung und den C-terminalen Teil des Shaker Kaliumkanals, welcher mit dem postsynaptischen Dlg Protein assoziiert, kodiert. Zur stabilen Expression des Konstrukts wurde es hinter den MHC (Myosin heavy chain) Promotor kloniert, welcher die Expression in allen Muskelzellen induziert. Somit lassen sich die postsynaptischen Bereiche aller NMJs der Körperwandmuskeln visualisieren (Abb. 4.29 D).

Das CD8-GFP-Sh Konstrukt kann sowohl für die Analyse der Überexpressionsfliegen als auch der Mutante verwendet werden. Zur Untersuchung der *centaurin gamma* Überexpression werden die UAS-*centg* Linien mit GAL4 Linien gekreuzt, welche zusätzlich das CD8-GFP-Sh Konstrukt exprimieren. In den folgenden Experimenten wurde die *Elav-GAL4, CD8-GFP-Sh* Linie zur Expression im Nervensystem und die *Mef2-GAL4, CD8-GFP-Sh* Linie zur Expression in den Muskeln verwendet. Um die *centg*<sup>-/-</sup> Mutanten auf mögliche NMJ Defekte hin zu analysieren wurde mittels mehrerer Kreuzungsschritte eine Fliegenlinie erzeugt, welche homozygot auf dem zweiten Chromosom die *centg* Mutation und auf dem dritten das CD8-GFP-Sh Konstrukt trägt.

Für die *in vivo* Analysen der NMJs wurden Larven des späten dritten Larvenstadiums verwendet. Die Larven wurden durch einen kurzen Hitzeschock immobilisiert, in Glycerin eingebettet und Aufnahmen mit einem konfokalen Laser-Scanning-Mikroskop generiert. Die Morphologie und das Innervierungsmuster wurde an den Muskeln 6/7 und 12/13 untersucht (Abb. 4.25 B, Abb. 4.26 A). Der Muskel 12 eignet sich besonders für *in vivo* Analysen, da er dicht unterhalb der Kutikula lokalisiert ist (Abb. 4.26 B). Die Muskeln 6/7 werden hauptsächlich für immunhistochemische und elektrophysiologische Analysen verwendet und sind daher sehr gut charakterisiert. Die Synapse an den Muskeln 6/7 befindet sich im Spalt zwischen den beiden Muskeln und innerviert beide Muskeln an der Innenseite. Die Synapse von Muskel 13 ist mittig auf dem Muskel lokalisiert, wohingegen die Synapse von Muskel 12 ventral liegt (Abb. 4.26 A).



**Abb. 4.26 Die Überexpression und das Fehlen von Centaurin gamma beeinflussen die Morphologie der larvalen Körperwandmuskeln und die Innervierung durch die Motoneurone. A** Schematische Darstellung der Körperwandmuskelpaare 6/7 und 12/13 (dunkelgrün) sowie deren entsprechende NMJs (hellgrün). **B** Schematische Darstellung des Innervierungsmusters der Körperwandmuskeln eines Hemisegments (von außen betrachtet). Die 30 Muskeln werden von 5 sich verzweigenden Motoneuronen innerviert (grau/schwarz) (modifiziert nach (Meyer, 2006)). **C-H** Konfokale Aufnahmen durch die Kutikula von intakten L3 Larven (Sicht von außen). NMJs und Muskeln wurden durch die Expression des CD8-GFP-Shaker Konstrukts sichtbar gemacht. **C** Die Überexpression von *centaurin gamma* im Nervensystem, mit dem *elav-GAL4* Treiber, induziert keine Veränderung der Muskeln oder der innervierenden NMJs. **D** Die Überexpression des *cenRA* Transkripts im Muskel, mit dem *Mef2-GAL4* Treiber, führt zu Defekten im nervösen Innervierungsmuster (weiße Pfeile). Die Synapse an Muskel 12 ist misslokalisiert und innerviert den Muskel dorsal anstatt ventral. Die Synapse zwischen den Muskeln 6/7 ist nur teilweise vorhanden und am Muskel 6 fehlt die Innervierung. **E** Zusätzlich führt die Überexpression im Muskel teilweise zu Veränderungen in der Muskelmorphologie. Die Muskeln 12 und 13 scheinen größtenteils degeneriert. **F** Die Überexpression des RNAi Konstrukts beeinflusst das Muskel-/NMJ-Muster nicht. **G+H** In der *centaurin gamma* Nullmutante *centg*<sup>-/-</sup> ist das Innervierungsmuster ebenfalls verändert. Teilweise sind die NMJs misslokalisiert (G, weißer Pfeil) bzw. durch andere NMJs als im wildtypischen Zustand innerviert (H, weißer Pfeil).

Zur Untersuchung möglicher morphologischer Defekte an den NMJs durch eine *centaurin gamma* Überexpression wurden die Linien *UAS-cenRA-VI*, *UAS-cenRAHAIII*, *UAS-cenRBMyc* mit den Treiberlinien *Elav-GAL4*, *CD8-GFP-Sh* und *Mef2-GAL4*, *CD8-GFP-Sh* gekreuzt. Anschließend wurde bei den Larven, die die *centaurin gamma* Konstrukte entweder im Muskel oder im Nervensystem überexprimieren, die Morphologie der Muskeln, das Vorhandensein aller Synapsen und deren korrekte Lokalisierung analysiert. Bei allen *cenRA* Überexpressionslinien induziert die Expression im Nervensystem (*Elav-GAL4*, *CD8-GFP-Sh*) keine Veränderung der Muskelmorphologie oder des Innervierungsmusters. Beispielhaft ist das Ergebnis für die *UAS-cenRA-VI* Linie gezeigt (Abb. 4.26C). Alle Muskeln haben eine wildtypische Morphologie und werden an den korrekten Stellen innerviert. Bei den Konstrukten *UAS-cenRBMyc* und *UAS-cenRNAi* sind sowohl bei der Expression im Muskel als auch im Nervensystem keine Veränderungen zu beobachten (Abb. 4.26F, nicht gezeigt). Die Überexpression des *cenRB* Transkripts scheint, im Gegensatz zum *cenRA* Transkript, keinen Einfluss auf die korrekte Morphologie und Innervierung der Muskeln zu haben. Dieses Ergebnis könnte auf verschiedene Funktionen der beiden Transkripte hindeuten, wobei *cenRB* keine Funktion in der Motoneuronen/Muskel Interaktion zu haben scheint. Die Überexpression des *cenRNAi* Kontrukts führt anders als die *centg<sup>-/-</sup>* Nullmutante ebenfalls zu keinen morphologischen Veränderungen (Abb. 4.26F). Dieses Ergebnis ist ein zusätzliches Indiz dafür, dass die beobachteten Phänotypen der RNAi Linie nicht auf das Fehlen von *centaurin gamma* zurückzuführen sind, sondern sehr wahrscheinlich ein off-target Effekt vorliegt.

Im Gegensatz dazu verursacht die Überexpression des *cenRA* Transkripts in den Muskeln (*Mef2-GAL4*, *CD8-GFP-Sh*) starke Defekte und auffällige Veränderungen einerseits der Muskeln und andererseits im Innervierungsmuster der NMJs. Abb. 4.26D zeigt beispielhaft zwei beobachtete Defekte an den Muskeln 6/7 und 12 (weiße Pfeile). Die Synapse zwischen den Muskeln 6/7 ist nur teilweise vorhanden und es fehlt die komplette Innervierung von Muskel 6. Am Muskel 12 führt die Überexpression von *centaurin gamma* zu einer Mislokalisierung der Synapse. Im wildtypischen Zustand wird der Muskel 12 ventral innerviert, wohingegen er im vorliegenden Fall dorsal innerviert wird. In Abb. 4.26E ist exemplarisch ein Muskeldefekt, der durch die Überexpression von *centaurin gamma* hervorgerufen

wird, dargestellt. Vom Muskel 13 ist in diesem Fall nur ein geringer Teil vorhanden und er wirkt degeneriert.

Die beobachteten Defekte konnten ebenfalls mit der HA getaggen Überexpressionlinie *UAS-cenRAHAIII* bestätigt werden (Daten nicht gezeigt).

Neben den Überexpressionslinien wurde auch die *centg*<sup>-/-</sup> Mutante auf Muskel- oder Innervierungsphänotypen hin untersucht. In den Mutanten lassen sich ebenfalls sowohl Veränderungen in der Muskelmorphologie als auch im Innervierungsmuster beobachten. In den Abb. 4.26G und Abb. 4.26H sind exemplarisch zwei unterschiedliche Innervierungsdefekte der *centg*<sup>-/-</sup> Mutanten dargestellt. Abb. 4.26G zeigt einen Defekt an Muskel 12, wo das Fehlen von *centaurin gamma* den gleichen Mislokalisierungsphänotyp induziert wie die Überexpression in den Muskeln. Der Muskel wird dorsal anstatt ventral innerviert. In der zweiten Abbildung befindet sich ein Defekt an den Muskeln 12 und 13, wo Muskel 13 nicht korrekt innerviert wird und eine Rettungsinervation von der dorsalen Seite vorliegt (Abb. 4.26 H).

Um die Penetranz der muskulären und nervösen Defekte in den verschiedenen Genotypen zu quantifizieren, wurden Defekte am Muskel 12 (lateral) in 20 Hemisegmenten pro Genotyp ausgezählt (Tabelle 4.4). Die Ergebnisse sind in Tabelle 4.4 zusammengefasst.

	% Muskeldefekte	% Innervierungsdefekte
w;; CD8-GFP-Sh	0	0
cent <sup>-/-</sup> ; CD8-GFP-Sh	25	25
Mef2-Gal4; CD8-GFP-Sh/UAS-cenRA VI	37	11
Elav-Gal4; CD8-GFP-Sh/UAS-cenRA VI	5	0

**Tabelle 4.4 Frequenz von muskulären und nervösen Defekten in den verschiedenen *centg* Genotypen.** Dargestellt ist die Anzahl an beobachteten Veränderungen der Muskeln oder NMJs in Prozent. Pro Genotyp wurden Defekte am Muskel 12 (lateral) in 20 Hemisegmenten quantifiziert (n=20).

Die Überexpression von *centaurin gamma* mit der *Mef2-GAL4*, *CD8-GFP-Sh* Treiberlinie führt in 37 % Prozent der Fälle zu muskulären Defekten. Als Defekt gilt dabei das Fehlen des Muskels, eine teilweise Degeneration oder eine offensichtliche Beschädigung. Gleichzeitig führt die *Mef2-GAL4* Überexpression an 11 % der Muskeln zu Innervierungsdefekten. Als Veränderungen an der Synapse gelten: fehlende Synapsen, mislokalisierte Synapsen oder Rettungssynapsen.



Bei der *centg*<sup>-/-</sup> Nullmutante lassen sich an 25% der untersuchten Muskeln Veränderungen feststellen. Das Fehlen von *centaurin gamma* führt im gleichen Maße zu Veränderungen der Muskeln (25%) wie zu Veränderungen des neuronalen Innervierungsmusters (25%).

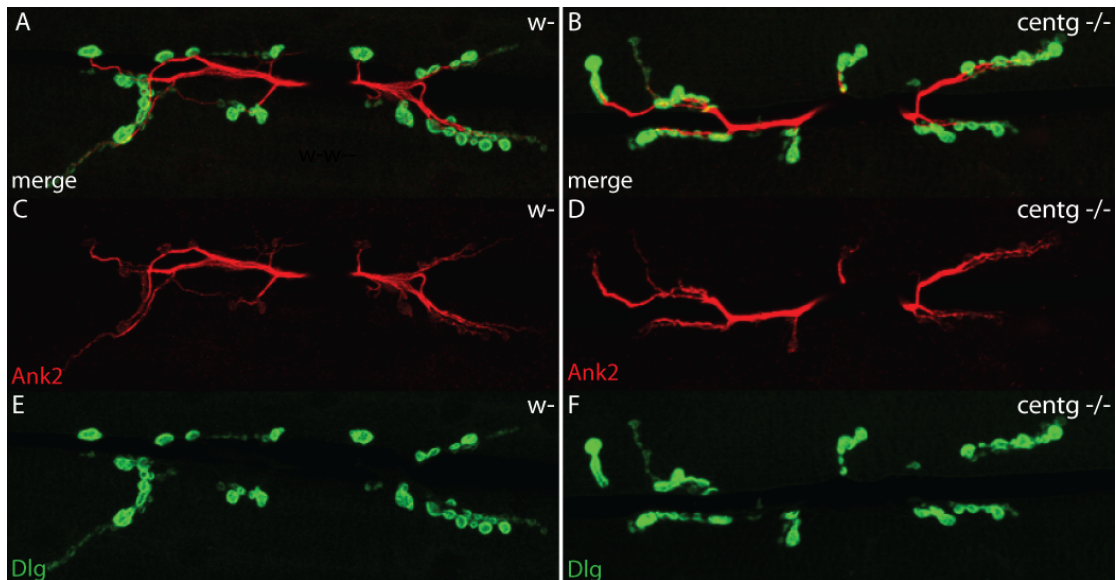
Somit zeigen die *loss-* und *gain-of-function* Studien, dass eine Missregulation der *centaurin gamma* Expression einen signifikanten Einfluss auf die Muskelstruktur und deren korrekte Innervierung haben kann. Dabei führt die muskuläre Überexpression des *cenRA* Transkripts (*UAS-cenRA VI ; UAS-cenRAHA///*) und auch das Fehlen von *centaurin gamma* (*centg*<sup>-/-</sup>) zu signifikanten Veränderungen einerseits der Muskeln und andererseits der neuronalen Innervierung.

#### **4.6.2. *Centg*<sup>-/-</sup> Mutanten zeigen keine Veränderung der Feinstruktur der NMJs**

Neben den *in vivo Imaging* Analysen wurden zusätzlich immunhistochemische Analysen zur detaillierten Untersuchung der NMJs und Muskeln der *centg*<sup>-/-</sup> Nullmutante durchgeführt. Dazu wurden Filetpräparationen von *centg*<sup>-/-</sup> und *w-* L3 Larven angefertigt (Abb. 4.25 A). Die isolierten Kutikulas wurden fixiert und anschließend mit Antikörpern gegen verschiedene Markerproteine gefärbt.

Abb. 4.27 zeigt jeweils eine Synapse am Muskel 6/7 im Segment A3 einer *w-* Larve und einer *centg*<sup>-/-</sup> Mutante, die mit Antikörpern gegen das postsynaptisch lokalisierte Protein Dlg und das präsynaptische Ank2 detektiert wurden (Abb. 4.27). Dlg gehört zur Familie der MAGUK (membrane-associated guanylate kinase homologs) Proteine, die an Zell-Zell Verbindungen lokalisiert sind. Dlg ist ein Strukturprotein des subsynaptischen Reticulum (SSR), einer postsynaptischen Spezialisierung der Synapse (Lahey et al., 1994; Budnik et al., 1996). Ank2 ist mit dem präsynaptischen Zytoskelett assoziiert und vermittelt die Verankerung mit dem synaptischen Mikrotubuliskelett (Pielage et al., 2008; Koch et al., 2009). Durch die Doppelfärbung mit beiden Markerproteinen lässt sich einerseits die Anordnung und die Morphologie der Boutons (Dlg Färbung) und andererseits die Nervenstränge und die Integrität des Zytoskeletts untersuchen (Abb. 4.27A+B). Beide Färbungen zeigen keine Veränderung in der *centg*<sup>-/-</sup> Mutante. Die Anordnung, Anzahl und Struktur der Boutons in der Mutante unterscheidet sich an der gezeigten Synapse nicht von der

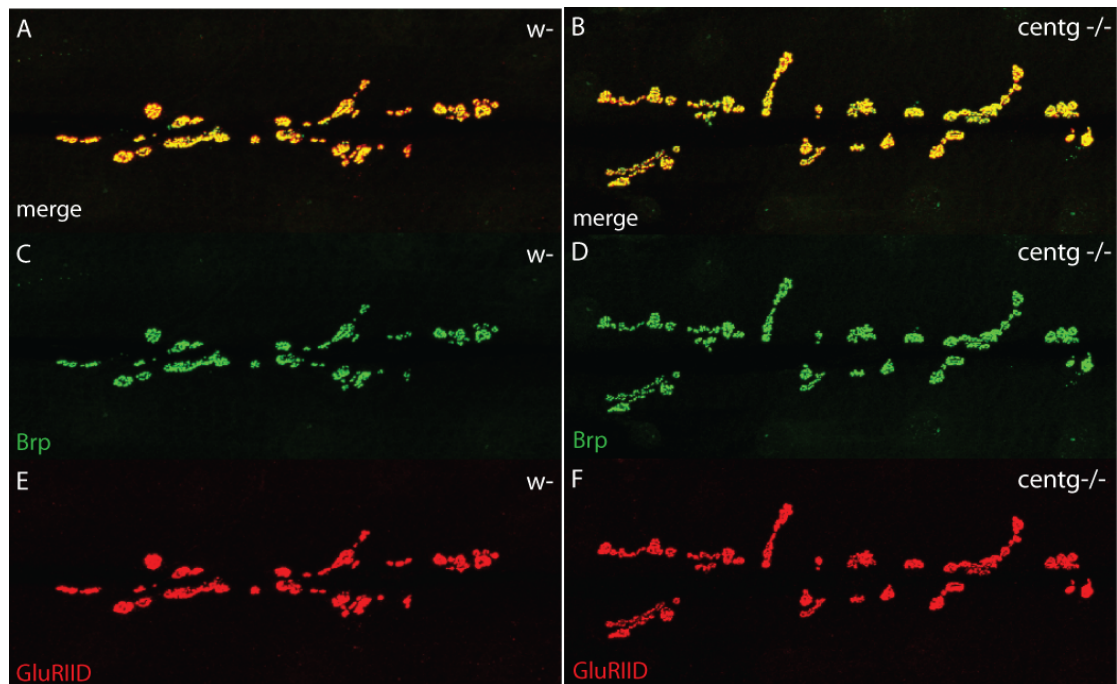
Kontrolle (Abb. 4.27 E+F). Auch das Verzweigungsmuster und die Zytoskelettstruktur zeigen keine auffälligen Abweichungen (Abb. 4.27 C+D).



**Abb. 4.27 *Centg*<sup>-/-</sup> Nullmutanten zeigen keine Veränderung in ihrem Ank2 bzw. Dlg Expressionsmuster.** **A+B** Kofärbung der beiden Markerproteine Ank2 und Dlg. **C+D** Das Ank2 Protein (rot), als Bestandteil des kortikalen Membranskeletts in Motoneuronen, ist in den *centg*<sup>-/-</sup> Mutanten wildtypisch lokalisiert. **E+F** Das Dlg Protein, welches an der postsynaptischen Membran lokalisiert ist, zeigt eine wildtypische Morphologie, Anordnung und Anzahl an synaptischen Boutons in der *centaurin gamma* Mutante (grün).

Für eine zweite immunhistochemische Analyse wurden die Markerproteine Bruchpilot (Brp) und die Glutamatrezeptoruntereinheit D (GluRIID) gefärbt (Abb. 4.28). Brp ist an den aktiven Zonen der NMJs lokalisiert und wichtig für die intakte Struktur der aktiven Zonen und die Neurotransmitterausschüttung (Wagh et al., 2006). GluRIID ist eine Untereinheit des Glutamatrezeptors und ist an der Rezeptorzusammensetzung und –stabilisierung an den NMJs beteiligt und lokalisiert an der postsynaptischen Membran (Featherstone, 2005). Mit der Brp/GluRIID Doppelfärbung lässt sich die korrekte Anordnung der aktiven Zonen im präsynaptischen und dem entsprechenden postsynaptischen Bereiche überprüfen. Die Brp Färbung zeigt in der *centg*<sup>-/-</sup> Mutante das erwartete punktförmige Expressionsmuster (Abb. 4.28 C+D). Da beide Proteine einander gegenüber an der Synapse angeordnet sind, ist bei einer wildtypischen Lokalisierung ein hoher Anteil an Kolo-kalisation zwischen Brp und GluRIID zu erwarten. An den NMJs der Mutante ist keine Veränderung der Kolo-kalisation der Markerproteine zu beobachten und die Anordnung entspricht der des Wildtypes (Abb.

4.28 A+B). Da es sich bei den NMJs von *Drosophila* um glutamaterge Synapsen handelt, ist das Vorhandensein und die korrekte Lokalisierung des Rezeptors an der postsynaptischen Seite essentiell. Die Färbung gegen die GluRIID Einheit des Rezeptors zeigt, dass er in der *centg*<sup>-/-</sup> Mutante normal exprimiert wird und an der erwarteten Position, gegenüber der aktiven Zonen, wo Glutamat ausgeschüttet wird, vorhanden ist.

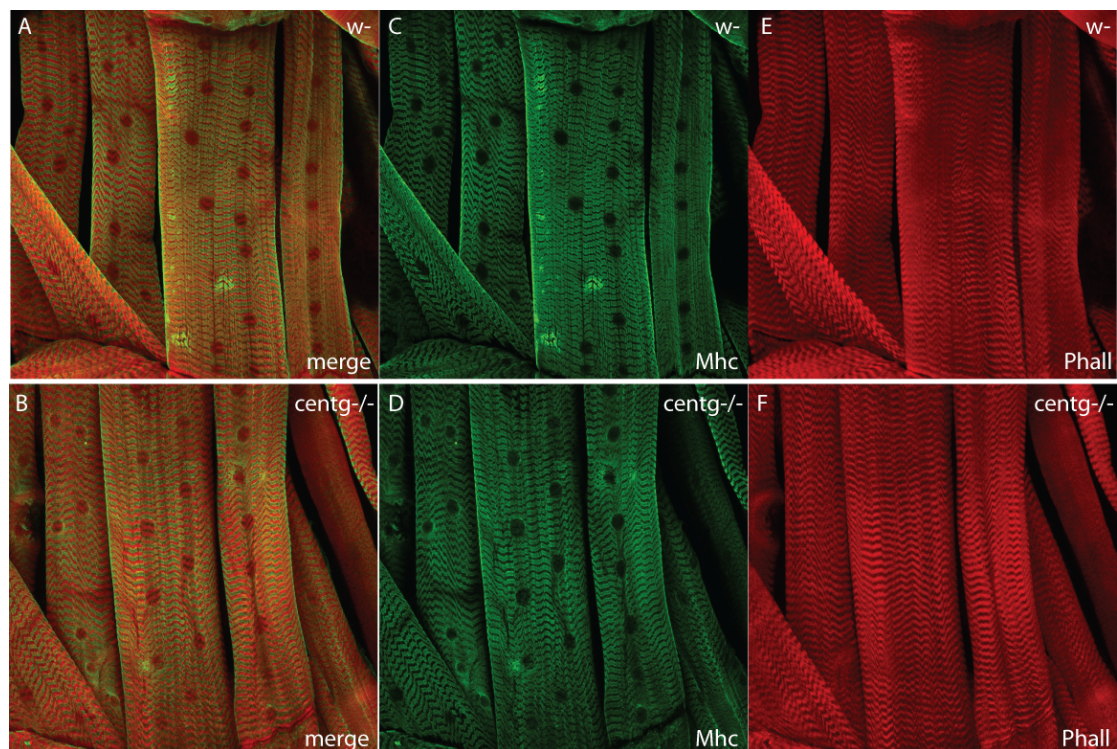


**Abb. 4.28 Centaurin gamma Nullmutanten zeigen keine Veränderung in ihrem Brp bzw. GluRIID Expressionsmuster.** **A+B** Kofärbung der beiden Markerproteine Brp und GluRIID. **C+D** Das Brp Protein (grün), welches die aktiven Zonen der NMJs markiert, ist in den *centg*<sup>-/-</sup> Mutanten wildtypisch lokalisiert und verteilt. **E+F** Die GluRIID Untereinheit des Glutamaterezeptors befindet sich in der *centg*<sup>-/-</sup> Nullmutante wie in der Kontrolle gegenüber der aktiven Zonen auf der postsynaptischen Seite (rot).

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass die Feinstruktur der NMJs in der *centg*<sup>-/-</sup> Mutante nicht offensichtlich verändert ist. Die überprüften Markerproteine zeigen ihr erwartetes Expressionsmuster. Das Expressionslevel der Proteine ist nicht verändert noch sind sie in irgendeiner Form mislokalisiert.

Neben der Feinstruktur der motorischen Synapsen, sollte auch die Struktur der Körperwandmuskeln untersucht werden. Dazu wurden Filepräparationen von wandernden L3 Larven mit einem Antikörper gegen Mhc (Myosin-heavy-chain) und Phalloidin gefärbt (Abb. 4.29). Das Mhc Peptid bildet die Kopfdomäne des Myosin-

Motorproteins, das mit Actinfilamenten assoziiert ist. Phalloidin ist ein Toxin, welches an F-Actin von Actinfilamenten bindet. Somit lässt sich durch die Kofärbung der beiden Marker, die Integrität und Struktur der Muskelfasern indirekt anhand ihrer Actinfilamente analysieren. Abb. 4.29 zeigt die Doppelfärbung mit den beiden muskelspezifischen Markern. Sowohl die Mhc (Abb. 4.29 C+D) als auch die Phalloidin Färbung (Abb. 4.29 E+F) zeigen keine Veränderung der Muskelfeinstruktur in der *centg*<sup>-/-</sup> Mutante im Vergleich zur *w*- Kontrolle. Die Actinfilamente sind regelmäßig angeordnet und zeigen keine auffälligen Veränderungen. In der Doppelfärbung ist zusätzlich zu sehen, dass das Motorprotein Mhc gleichmäßig zwischen den Actinfilamenten angeordnet ist (Abb. 4.29A+B).



**Abb. 4.29 Die Feinstruktur der Körperwandmuskeln ist in *centaurin gamma* Mutanten nicht verändert. A+B** Kofärbung der beiden muskelspezifischen Markerproteine Mhc und Actin. **C+D** Mhc, als Bestandteil des Motorproteins Myosin ist wildtypisch zwischen den Actinfilamenten lokalisiert. **E+F** Die Phalloidin Färbung zeigt regelmäßig angeordnete Actinfilamente im Wildtyp und in der *centaurin gamma* Mutante *centg*<sup>-/-</sup>.

Somit scheint das Fehlen von *centaurin gamma* die Feinstruktur der Körperwandmuskeln, wie auch auf die Feinstruktur der NMJs, keinen Einfluss zu haben. Die *centg*<sup>-/-</sup> Mutanten zeigen eine wildtypische Expression und Lokalisierung der untersuchten Markerproteine.

Zusammenfassend zeigen die durchgeführten Experimente an den NMJs von wandernden L3 Larven, dass das Fehlen von *centaurin gamma* bzw. die Überexpression im Muskel die Lokalisierung und Innervierungsmuster der motorischen Synapsen sowie die Muskelmorphologie beeinflussen.



## 5. Diskussion

In der vorliegenden Arbeit konnten wichtige Erkenntnisse über die biologische Funktion des *centaurin gamma* Gens in *Drosophila melanogaster* gewonnen werden.

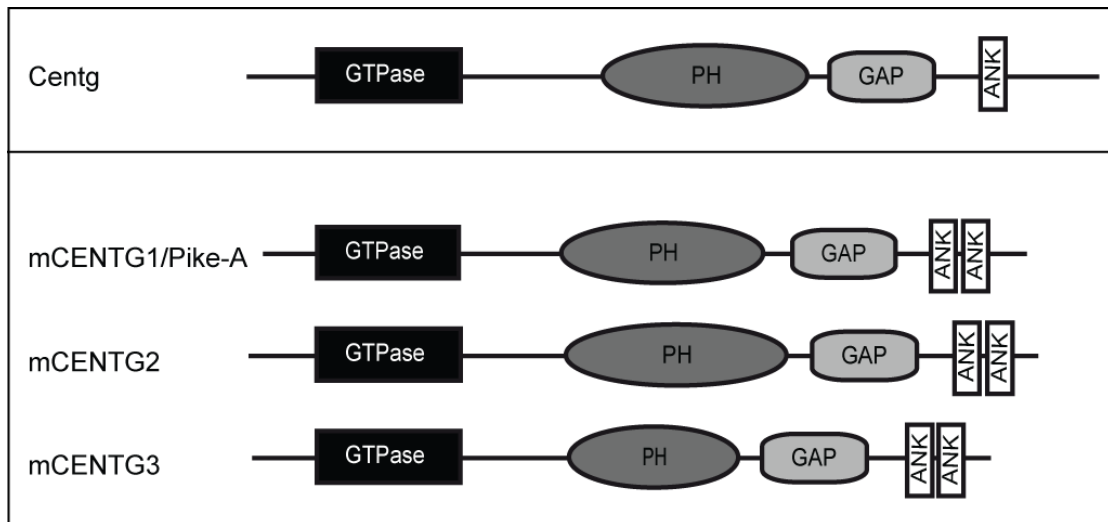
### 5.1. *Centaurin gamma* kodiert für eine funktionelle GTPase mit interner katalytischer GAP Domäne

Centaurine bilden eine Familie von Multidomänenproteinen und haben sowohl in *Drosophila* als auch in Säugern die gleiche, einzigartige Domänenstruktur. Mitglieder der *Centaurin gamma* Familie besitzen eine GTPase Domäne, eine PH Domäne, eine ArfGAP Domäne und Ankyrin Wiederholungsmotive (Xia et al., 2003) (Abb). Für die murinen *Centaurin gamma* (Centg) Proteine ist bereits bekannt, dass es sich um funktionelle GTPasen handelt, die GTP binden und hydrolysieren können (Xia et al., 2003; Qin et al., 2006). Außerdem konnte für CentG1 und CentG2 gezeigt werden, dass die eigene GAP Funktion die GTPase Reaktion katalysieren kann (Qin et al., 2006).

Das *centaurin gamma* Gen stellt das einzige Homolog zu den drei murinen CentG Genen in *Drosophila* dar (Bernards and Settleman, 2004). Wie die murinen Proteine kodiert auch das *Drosophila centaurin gamma* die vier charakteristischen Proteindomänen.

Durch die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten *in vitro* Experimente konnte auch für das *Drosophila* Homolog *Centaurin gamma* gezeigt werden, dass es sich um eine funktionelle GTPase handelt. Die in Bakterien exprimierte und aufgereinigte *Centaurin gamma* GTPase Domäne zeigte im kolorimetrischen GTPase Assay eine stabile Hydrolyseaktivität von freiem GTP. Außerdem konnte die Hydrolyse durch die Zugabe der *Centaurin gamma* GAP Domäne katalysiert werden.

Damit konnte für *Drosophila Centaurin gamma* neben der beschriebenen Sequenzhomologie auch eine funktionelle Homologie zu den humanen und murinen *Centaurin Gamma* Proteinen gezeigt werden.



**Abb. 5.1 Schematische Darstellung der Domänenstruktur des *Drosophila* Centaurin gamma Proteins und der drei murinen Homologe.** Das *Drosophila* Protein besitzt die gleiche konservierte Domänenstruktur wie die murinen Proteine. Sie kodieren eine N-terminale GTPase Domäne, eine PH (Pleckstrin Homology) Domäne, eine GAP (GTPase Activating Protein) Domäne und Ankyrin Wiederholungsmotive.



## 5.2. Centaurin gamma und seine putative Funktion im Insulin/TOR Signalnetzwerk

Ein RNAi Screen in Zellkultur identifizierte Centaurin gamma als putatives ArfGAP im Insulinsignalweg (Gündner, 2008). Der *Knockdown* von *centaurin gamma* zeigte einen Einfluss auf die Transkription des Zielgens *4E-BP*, welcher als Translationsrepressor ein Haupteffektor des Insulin/TOR Signalnetzwerkes ist. Außerdem wurde für *centaurin gamma* gezeigt, dass es nach einer Insulinstimulation in Kc-Zellen transkriptionell herunterreguliert wird und im Promotorbereich für FHREs (Forkhead Response Elements) kodiert (Jünger et al., 2003). Zusätzlich zeigen Yeast-two-Hybrid Experimente eine mögliche Interaktion mit der Akt Kinase, welche ein wichtiger Signalüberträger der Insulin/TOR Signalkaskade ist (Stark, 2006).

Aufgrund der Hinweise aus den *in vitro* und Zellkulturexperimenten sollte die biologische Funktion von *centaurin gamma* mit Hilfe einer Nullmutante *in vivo* untersucht werden. Zu diesem Zweck wurde eine *knockout* Fliegenlinie mittels homologer Rekombination erzeugt. Das Konstrukt für die homologe Rekombination wurde so gewählt, dass die Exons 5 bis 10, die die funktionellen Domänen der verschiedenen Transkripte kodieren, deletiert wurden. Die erfolgreich generierte *centaurin gamma* Nullmutante konnte anschließend zur Untersuchung einer möglichen Funktion im Metabolismus verwendet werden. Es wurde analysiert, ob die Mutanten, die für Stoffwechselmutanten bekannte Phänotypen zeigen und wie sie mit veränderten Nahrungsbedingungen zurechtkommen.

Viele Mutanten, die Mutationen in Genen tragen, die für die Stoffwechselregulation wichtig sind, zeigen starke Wachstumsdefekte. Mutanten von „positiven“ Regulatoren des Insulinsignalweges, wie *steppke* oder *chico*, die das Insulinsignal transduzieren, haben ein stark verringertes Körpergewicht und eine verringerte Körpergröße (Fuss, 2006; Böhni, 1999). Aus diesem Grund wurde sowohl das Körpergewicht als auch die Flügelfläche von adulten *centg<sup>-/-</sup>* Mutanten bestimmt. Bei den adulten Fliegen konnte weder bei der Flügelfläche noch im Körpergewicht ein signifikanter Unterschied festgestellt werden. Auch die Messung der Länge und des Durchmesser von 96 h alten *centg<sup>-/-</sup>* Larven ergab keinen Größenunterschied. Somit weisen *centg<sup>-/-</sup>* Mutanten nicht die charakteristischen Größen- beziehungsweise Wachstumsphänotypen von positiven Regulatoren des Insulin/TOR Signalnetzwerkes auf. Außerdem zeigen die *centg<sup>-/-</sup>* Mutanten keine veränderte *4E-*

*BP* Expression *in vivo* im Gegensatz zu den Ergebnissen aus dem RNAi Screen um im Vergleich mit *steppke*.

Neben den positiven Regulatoren im Insulin/Tor Netzwerk, die bei vorteilhaften Umweltbedingungen aktiv sind und das Insulinsignal weiterleiten, gibt es zusätzlich negative Regulatoren. Diese werden aktiviert, sobald kein Insulin vorhanden ist. Zwei Beispiele für negative Regulatoren sind der Transkriptionsfaktor FOXO und der Translationsrepressor *4E-BP* (Jünger et al., 2003; Teleman et al., 2005). Beide Regulatoren erfüllen ihre essentielle Funktion unter nachteiligen Umweltbedingungen, daher ist es nicht überraschend, dass Mutanten für beide Gene lediglich unter Extrembedingungen starke Defekte zeigen. Mutanten für *4E-BP* und FOXO sind sensitiv gegenüber Hunger und oxidativem Stress und zeigen unter beiden Bedingungen eine stark verkürzte Überlebensdauer (Teleman et al., 2005; Villa-Cuesta et al., 2010). Um eine mögliche Funktion von *centaurin gamma* als negativer Regulator zu untersuchen, wurden adulte Fliegen unter Hungerbedingungen gehalten und ihr Überleben im Vergleich zu Kontrollfliegen untersucht. Die Überlebensdauer der Mutanten unterscheidet sich nicht von der von Kontrollfliegen. Das Fehlen von *centaurin gamma* hat weder einen negativen noch einen positiven Effekt auf die Überlebensfähigkeit unter Hungerstress. Die Untersuchung der Menge an gespeicherten Fettreserven und deren Mobilisierung während des Hungerexperiments zeigte ebenfalls keinen signifikanten Unterschied im Vergleich zu den Kontrollfliegen.

Die oben beschriebenen Ergebnisse deuten darauf hin, dass *centaurin gamma* nicht als Regulator des systemisch-aktiven Insulin-/TOR Signalnetzwerkes fungiert.

### **5.3. Centaurin gamma als funktionelles Homolog von CentG1 in ernährungsbedingter Adipositas und Insulin Resistenz**

2010 wurde die erste *in vivo* Studie zur Funktion von CentG GTPasen in Säugern veröffentlicht (Chan et al., 2010b). Mit Hilfe des Cre/loxP Systems wurde eine *knockout* Mutante für alle drei Transkripte des CentG1 Locus erzeugt und die Mutanten phänotypisch untersucht. Da für zwei Transkripte von CentG1 in Zellkulturexperimenten bereits gezeigt wurde, dass sie mit PI3K interagieren, wurden diese PIKE (PI3K Enhancer) genannt. Chan et al. konnten zeigen, dass der ubiquitäre *knockout* von PIKE zu einer signifikanten Reduktion des weißen Fettgewebes in Mäusen führt. Das weiße Fettgewebe ist der Hauptspeicherort für Lipidreserven und wird durch Adipozyten gebildet. Adipozyten entstehen durch die Differenzierung von mesenchymalen Stammzell-abgeleiteten Präadipozyten, die durch den Prozess der Adipogenese zu Adipozyten reifen. Die Reduktion des weißen Fettgewebes in PIKE Mutanten ist eine Folge defekter Adipogenese (Chan et al., 2010b).

Die starke Gewichtszunahme bei Fettleibigkeit wird hauptsächlich durch eine Vermehrung des weißen Fettgewebes verursacht. Da PIKE Mutanten eine Störung in der Adipogenese aufweisen, sind diese gegen ernährungsbedingte Adipositas weitestgehend geschützt. Die Fütterung eines hochkalorischen Futters führt bei PIKE Mutanten im Vergleich zu Kontrolltieren zu einem wesentlich geringeren Anstieg des Körpergewichts und der Fettgewebemasse (Chan et al., 2010b). Da in PIKE Mutanten weniger Fett in Fettgewebe gespeichert wird, würde man eine ektopische Ablagerung der Lipide in peripheren Geweben erwarten. Dies ist jedoch in PIKE Mutanten nicht der Fall und überschüssige Lipide scheinen stattdessen metabolisiert zu werden. Die Muskeln und das Fettgewebe von PIKE Mutanten weisen eine erhöhte Aktivität der AMP Kinase und ihrem Zielprotein ACC (Acetyl CoA Carboxylase) auf, was zu einer verstärkten  $\beta$ -Oxidation in den entsprechenden Geweben führt (Chan et al., 2010b). Zusätzlich sind PIKE Mutanten weniger sensitiv gegenüber einer ernährungsbedingten Insulinresistenz (T2D). In der Studie wurde beschrieben, dass sowohl das Fettgewebe als auch die Muskeln der Mutanten hypersensitiv gegenüber Insulin sind. Außerdem sind die Raten an zirkulierendem Insulin in den Mutanten geringer und die Glukoseaufnahme nach Insulinstimulation in

beiden Geweben wesentlich höher (Chan et al., 2010b). Somit schützt die Mutation des *Centg1* Gens Mäuse vor ernährungsbedingter Adipositas und Insulinresistenz.

Um eine mögliche Rolle von *centaurin gamma* in der Entwicklung von Adipositas beziehungsweise Insulinresistenz in *Drosophila* zu untersuchen, wurden mit *centg*<sup>-/-</sup> Nullmutanten ebenfalls Fütterungsexperimente mit hochkalorischem Futter untersucht.

Die Ergebnisse zur Messung des Körpergewichts von *centg*<sup>-/-</sup> Larven beziehungsweise Fliegen ergaben, dass diese, im Gegensatz zu den PIKE mutanten Mäusen, kein verändertes Körpergewicht auf Standardfutter aufweisen.

Für Fliegen sind erst seit kurzem Futterbedingungen bekannt, unter denen sie T2D und Adipositas Phänotypen entwickeln (Birse et al., 2010; Palanker Musselman et al., 2011). Birse et al. zeigen in ihrer Studie, dass die Gabe eines Futters, das zu 30% aus Kokosnussöl besteht zu erhöhten Triacylglyceridleveln, Insulinresistenz und Herzfehlfunktionen in adulten Fliegen führt.

Musselman et al. haben verschiedene hochkalorische Futterbedingungen untersucht und konnten zeigen, dass die Fütterung eines stark zuckerhaltigen Futters (HSD, 70% Saccharose) bei Larven T2D und Adipositas ähnliche Phänotypen induziert. Die Fütterung einer HSD führt bei den untersuchten Larven zu einer starken Entwicklungsverzögerung, Hyperglykämie und erhöhten TAG Levels im Fettkörper (Palanker Musselman et al., 2011).

Die Experimente zur Entwicklungszeit von *centg*<sup>-/-</sup> Nullmutanten unter hochkalorischen Futterbedingungen (HFD, HSD) zeigen keine Unterschiede im Vergleich mit der Kontrolle. *Centg*<sup>-/-</sup> Mutanten weisen in allen untersuchten Bedingungen eine leichte Entwicklungsverzögerung auf, die aber nicht durch die verschiedenen Futterkonditionen beeinflusst wird. Die Fütterung des zuckerhaltigen Futters (HSD) führte bei den Mutanten, genau wie bei den Kontrolltieren, zu einer starken Entwicklungsverzögerung. Sowohl die *centg*<sup>-/-</sup> als auch die *w*- Larven verpuppen sich 5 Tage später als auf dem Kontrollfutter. Die HFD hatte, wie auch bei den Kontrolltieren, keinen negativen Einfluss auf die Entwicklungszeit der Nullmutanten. Somit scheinen die *centg*<sup>-/-</sup> Mutanten nicht resistent gegenüber hochkalorischem Futter zu sein und den gleichen T2D ähnlichen Phänotyp wie die Kontrolllarven zu entwickeln.

Da die murinen PIKE<sup>-/-</sup> Mutanten offensichtliche Defekte bei der Fähigkeit zur Lipidspeicherung aufweisen, sollte das Fettgewebe der *Drosophila centg*<sup>-/-</sup> Mutanten auf entsprechende Defekte hin analysiert werden. Dazu wurde die Struktur und die Anzahl der Lipidtröpfchen im Fettkörper, dem funktionellen Homolog zum weißen Fettgewebe der Maus, untersucht. Analog zu den Mausexperimenten wurde eine Oilred O Färbung durchgeführt. Oilred O färbt die neutralen Lipide und macht so die TAG Speicherlipide in den Fettkörperzellen sichtbar. Die Färbungen ergaben, dass in den *centg*<sup>-/-</sup> Mutanten die Morphologie beziehungsweise die Größe der Lipidtröpfchen nicht verändert ist. Außerdem führt die Fütterung einer hochkalorischen Diät bei den Mutanten zur gleichen Erhöhung der Anzahl an Lipidtröpfchen im Fettkörper wie den Kontrollen. Somit lässt sich in den Mutanten keine veränderte Fähigkeit zur Lipidspeicherung feststellen. Die *centg*<sup>-/-</sup> Mutanten speichern Lipide im gleichen Umfang wie die Kontrolllarven und sind nicht gegen Phänotypen, die durch eine hochkalorische Diät induziert werden, geschützt.

*Drosophila centaurin gamma* Nullmutanten zeigen im Gegensatz zu den murinen CentG1 Mutanten weder Hinweise, die auf eine Adipositas noch auf eine Insulinresistenz hindeuten. Die biologische Funktion von CentG1 als negativer Regulator der AMP Kinase bei Adipositas und Type-2-Diabetes scheint damit in *Drosophila* nicht konserviert zu sein.



## 5.4. Eine Organ-spezifische Funktion für Centaurin gamma

Die systematische Analyse der *centg*<sup>-/-</sup> Nullmutante im Bezug auf eine Funktion als Regulator des Insulinsignalweges, deutet daraufhin, dass *centaurin gamma* keine essentielle Funktion im systemisch aktiven Insulin/TOR Signalnetzwerk übernimmt. Jedoch belegen Zellkultur- und *in vitro* Experimente, dass *centaurin gamma* in SL2 Zellen einen Einfluss auf die *4E-BP* Expression hat, es transkriptionell bei Insulinstimulation in Kc Zellen herunterreguliert wird und es ein putativer Interaktionspartner der Akt Kinase ist.

Eine mögliche Erklärung für diesen Widerspruch stellt eine lokale Funktion von *centaurin gamma* in einem bestimmten Gewebe dar, welche nicht die systemische Energiehomöostase und Wachstumskontrolle beeinflusst. Das Expressionsmuster von *centaurin gamma*, visualisiert durch *in situ* Hybridisierungsexperimente, stützt diese Hypothese. Es konnte sowohl in Embryonen als auch in Larvengewebe eine vorwiegende Expression von *centaurin gamma* im Nervensystem detektiert werden. *Centaurin gamma* wird im Embryo in verschiedenen Zelltypen des Nervensystems, wie postmitotischen Neuronen, Gliazellen sowie Neuroblasten (multipotente Stammzellähnliche Zellen) exprimiert. In Larven des späten dritten Stadiums lässt sich die *centaurin gamma* mRNA hauptsächlich in den proliferativen Bereichen der optischen Loben des zentralen Nervensystems detektieren und scheint auch hier von verschiedenen Zelltypen exprimiert zu werden.

Ein gewebespezifischer Prozess, der kürzlich identifiziert wurde und der durch Komponenten des Insulin Signalweges gesteuert wird, ist die Proliferation von Neuroblasten im zentralen Nervensystem von *Drosophila melanogaster* {Cheng:2011gl}.

Bei allen Lebewesen, von der Fliege bis zum Menschen, ist eine optimale Nährstoffversorgung während der Entwicklung essentiell. Kommt es während den Entwicklungsphasen zu einer verringerten Versorgung mit Nährstoffen, beeinträchtigt dies das Wachstum und die Entwicklung der Organe. Dies gilt aber nicht für alle Organe gleichermaßen.

Werden zum Beispiel Föten im Mutterleib nicht ausreichend mit Sauerstoff oder Nährstoffen versorgt, induziert dies eine Veränderung der Blutzirkulation, um eine

bevorzugte Versorgung des Gehirns im Vergleich zu anderen Organen zu ermöglichen. Dies führt dazu, dass Kinder geboren werden, die einen vergrößerten Kopf im Verhältnis zum Rest ihres Körpers haben. Die bevorzugte Versorgung des Gehirns während der Entwicklung wird als „Brain Sparing“ bezeichnet (Roza et al., 2008).

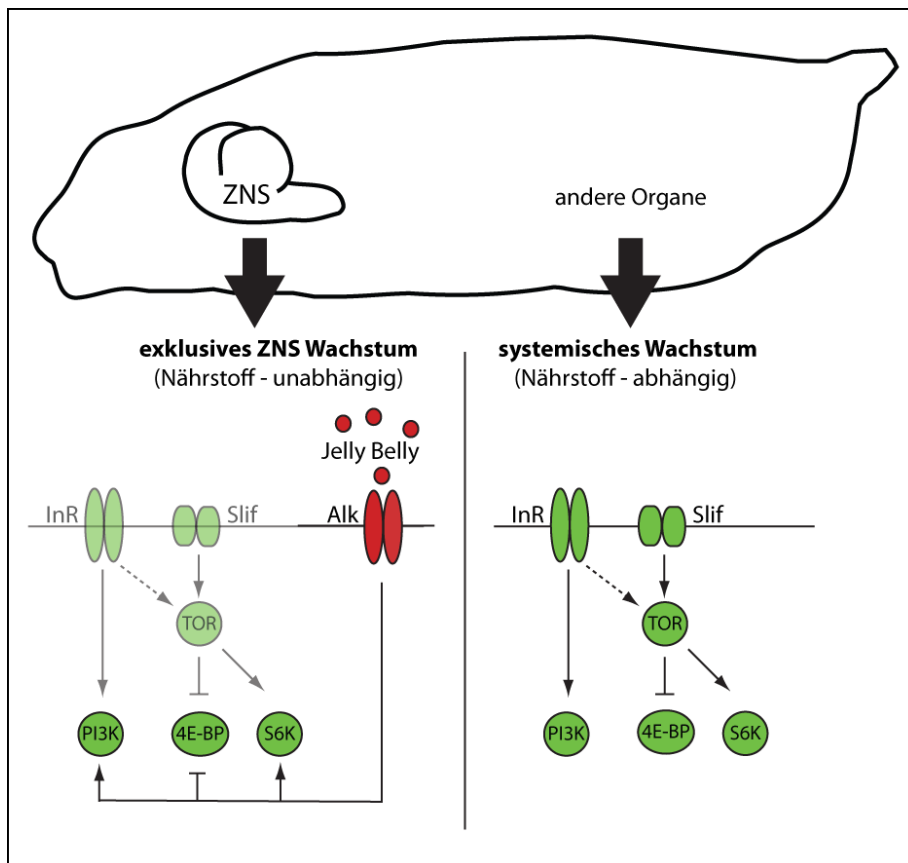
Dieser Effekt ist konserviert und lässt sich auch bei Fruchtfliegen beobachten. Werden *Drosophila* Larven, nach dem kritischen Zeitpunkt von 60 Stunden nach dem Schlüpfen, ohne Futter gehalten, entwickeln sich diese ohne Entwicklungsverzögerung zu kleinen adulten Fliegen. Wobei wichtige Organe im Verhältnis in ihrem Wachstum weniger beeinträchtigt werden (Shingleton, 2010).

Ein Organ, das auch in Fliegenlarven vor den negativen Folgen einer Unterversorgung verstärkt geschützt wird, ist das Gehirn (Cheng et al., 2011). Um die zellulären Mechanismen des „Brain Sparing“ in *Drosophila* zu analysieren, wurden Neuroblasten, aus denen ein Großteil des zentralen Nervensystems entsteht, untersucht (Cheng et al., 2011). Klonale Analysen zeigten, dass sich die diploiden Neuroblasten, im Gegensatz zu den polyploiden Geweben, wie der Speicheldrüse oder dem Fettkörper, unter Hungerbedingungen genauso oft teilen wie unter normalen Futterbedingungen und sich die Klone in ihrer Größe nicht unterscheiden (Cheng et al., 2011). Im Gegensatz dazu war das Wachstum der polyploiden Gewebe, wie des Gehirns und der Imaginalscheiben, stark reduziert {Cheng:2011gl}. Sowohl das Nährstoffabhängige Wachstum von polyploidem als auch von diploidem Gewebe wird durch das InR/TOR Signalnetzwerk kontrolliert (Teleman, 2009).

Cheng et al. konnten mit ihrer Studie zum ersten Mal zeigen, dass Wachstumsprozesse in Neuroblasten unter Hungerbedingungen zwar von wichtigen Effektoren des Insulin/TOR Signalnetzwerkes gesteuert werden, diese aber unabhängig von den Schlüsselkomponenten, TOR Kinase und dem Insulinrezeptor sind. Sowohl das Fehlen von TOR als auch des InR hatte keinen Einfluss auf das Wachstum und die Teilung der Neuroblasten. Im Gegensatz dazu wurde das Wachstum der Neuroblasten durch das Fehlen wichtiger Effektoren des aktiven Insulin/TOR Netzwerkes, wie S6K, 4E-BP, PI3K und Akt stark beeinträchtigt. Die Autoren identifizieren die Alk Rezeptortyrosinkinase (Anaplastic lymphoma kinase) als Schlüsselprotein, welches die Effektoren des Insulin/TOR Signalnetzwerkes, unabhängig von InR und TOR, in Neuroblasten des späten dritten Larvenstadiums aktiviert und somit ein Nährstoff unabhängiges Wachstum des Gehirns ermöglicht.



Aktiviert wird die Alk durch ihren Liganden Jelly belly, welcher von Gliazellen exprimiert wird (Cheng et al., 2011). Somit existiert in Larven des späten dritten Entwicklungsstadiums ein Mechanismus, der unabhängig von den verfügbaren Nährstoffen und vom körperweiten Wachstum, das Wachstum des Zentralen Nervensystems ermöglicht. Dazu werden wichtige Effektoren des Insulin/TOR Signalnetzwerkes unabhängig vom Vorhandensein von ILPs beziehungsweise Aminosäuren über die Alk Kinase aktiviert und ermöglichen somit ein gewebespezifisches Wachstum.



**Abb. 5.2 Modell des Insulinrezeptor/TOR unabhängigen Wachstums im ZNS.** In den meisten Geweben führt die Aktivierung des InR durch ILPs und die Aktivierung der TOR Kinase durch Nährstoffe und Wachstumsfaktoren zum Zellwachstum. Das Zellwachstum wird durch Effektoren, wie PI3K, S6K und 4E-BP vermittelt (linke Spalte). Im Gegensatz dazu werden diese Effektoren im ZNS hauptsächlich durch die Alk Kinase unabhängig, vom InR und TOR, reguliert. Alk wird Nährstoff-unabhängig durch ihren Liganden Jelly belly aktiviert, der von Gliazellen exprimiert wird (modifiziert nach Teleman, 2011).

Das Expressionsmuster von *centaurin gamma* in den optischen Loben könnte ein erster Hinweis auf eine gewebespezifische Funktion von *centaurin gamma* im Nervensystem und eventuell auf eine Beteiligung am Alk Signalweg sein. Wie

*centaurin gamma* wird auch die Alk Kinase und ihr Ligand Jelly belly in den optischen Loben exprimiert. Die Expression der beiden Proteine wird, wie bei *centaurin gamma* in Neuroblasten, Gliazellen und Neuronen detektiert.

Um die putative Funktion von *centaurin gamma* im Alk Signalweg zu untersuchen, könnten detailliertere Expressions- und Kolkalisationsanalysen auf Proteinebene durchgeführt werden. Für diesen Zwecke wurde ein gegen den C-Terminus von Centaurin gamma gerichteter Peptidantikörper generiert. Jedoch zeigte dieser keine spezifische Färbung. Ein kommerziell erhältlicher Antikörper gegen das murine CentG1 Protein wies keine Kreuzreaktion mit dem *Drosophila* Protein auf (Daten nicht gezeigt). Die generierte Nullmutante ermöglicht jedoch in Zukunft Untersuchungen auf Proteinebene. Mit Hilfe der Phi Integrase können *centg* Konstrukte, die z.B. mit einem Proteintag markiert sind, über die *attp site* am *centg* Locus inseriert und unter dem endogenen Promotor exprimiert werden können.

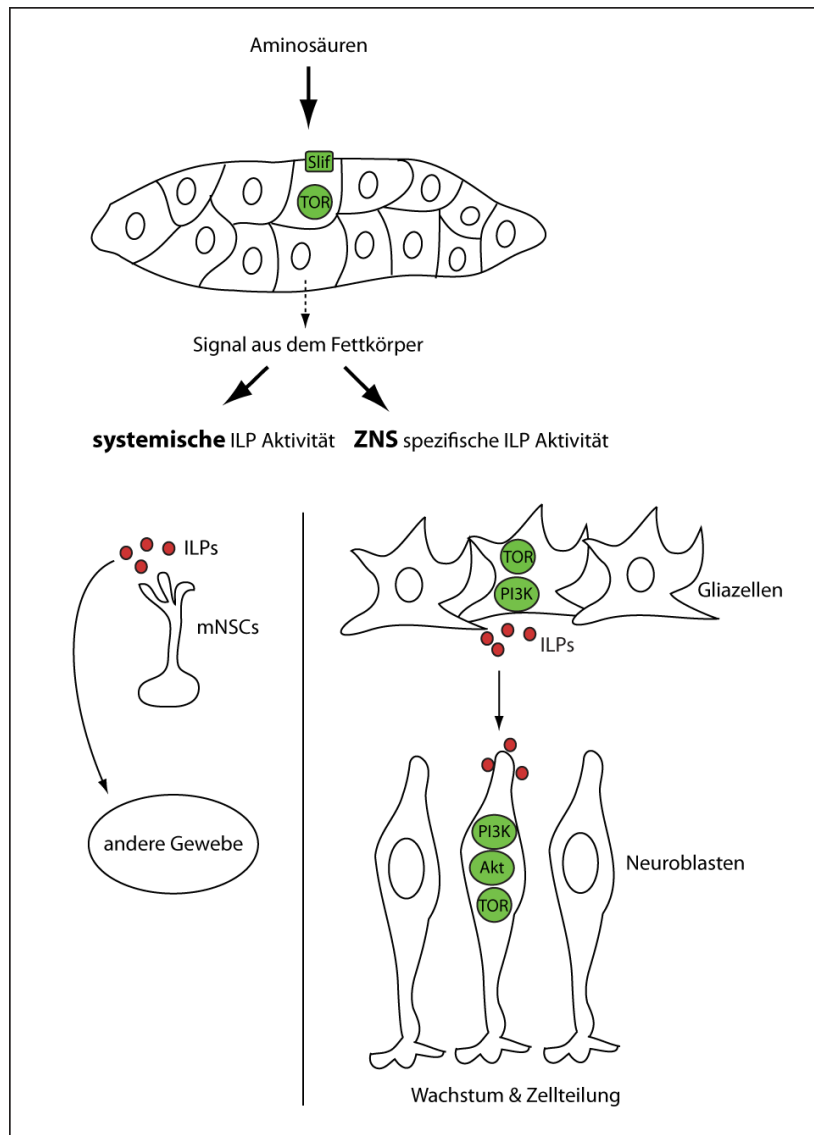
Weitere Hinweise, ob *centaurin gamma* ein Regulator das Wachstum von Neuroblasten beeinflusst, könnten klonale Analysen erbringen. Diese könnten ebenfalls unter Verwendung der generierten *centg*<sup>-/-</sup> Nullmutante und den verschiedenen Überexpressionskonstrukten durchgeführt werden. Falls *centaurin gamma* eine essentielle Funktion im Alk Signalweg hat, würde dies, wie bei den anderen Komponenten des Signalweges, zu Veränderungen in der Größe der Neuroblastenklone führen.

Neben dem „Brain Sparing“ wird ein weiterer zentraler Prozess während der Nervensystementwicklung, nämlich die Reaktivierung von Neuroblasten, lokal durch Komponenten des Insulinsignalweges gesteuert (Chell and Brand, 2010; Sousa-Nunes et al., 2011).

Während der embryonalen und frühen larvalen Entwicklung gehen Neuroblasten des zentralen Nervensystems durch verschiedene Proliferations- beziehungsweise Ruhephasen. Der Übergang von einer Ruhephase in eine Proliferationsphase wird dabei in Abhängigkeit von verfügbaren Aminosäuren aus der Nahrung reguliert (Britton and Edgar, 1998). Die verfügbaren Aminosäuren werden vom Fettkörper detektiert und ein noch unbekannter Faktor sekretiert (Sousa-Nunes et al., 2011). Dieser Faktor wiederum induziert die Sekretion von ILPs aus den mNSC (medianen neurosekretorischen Zellen) zur Regulierung des körperweiten Wachstums

(Colombani et al., 2003). Die Reaktivierung der Neuroblasten wird jedoch nicht durch die Sekretion der ILPs aus den mNSCs beeinflusst (Sousa-Nunes et al., 2011). Das Wachstum und die Zellteilung der Neuroblasten wird durch ILPs, die von Gliazellen, die die Neuroblasten umgeben, sekretiert werden, unabhängig vom Ernährungszustand gesteuert. In den Neuroblasten vermittelt das InR/TOR Signalnetzwerk die Weiterleitung des ILP Signals (Chell and Brand, 2010; Sousa-Nunes et al., 2011).

Die Expression von *centaurin gamma* in den proliferativen Bereichen der optischen Loben könnte neben einer Funktion im „Brain Sparing“ auch auf eine mögliche Funktion bei der Reaktivierung von Neuroblasten hindeuten. Das *centaurin gamma* Expressionsmuster ähnelt stark den veröffentlichten EdU (5'-Ethynyl-2'-Deoxyuridin) Färbungen von Sousa-Nunes (Sousa-Nunes et al., 2011). EdU ist ein Thymidin Analog, welches spezifisch proliferative Zellen in der S-Phase detektiert und somit auch die reaktivierten Neuroblasten in Larvengehirnen markiert. Die *centaurin gamma* mRNA wird verstärkt in den proliferativen Bereichen der optischen Loben exprimiert. Um eine mögliche Funktion von *centaurin gamma* in der Reaktivierung von Neuroblasten zu untersuchen, könnten sowohl mit Gehirnen der Nullmutante als auch mit Gehirnen einer Neuroblasten-spezifischen Überexpression, EdU Färbungen durchgeführt werden. Falls *centaurin gamma* als z.B. als positiver Regulator des TOR/Insulin Signalnetzwerkes in Neuroblasten fungiert, sollte es in den Mutanten zu einer Unterdrückung der Reaktivierung kommen, wohingegen die Überexpression zu einer frühzeitigen Reaktivierung führen würde. Außerdem könnte überprüft werden, ob die Überexpression von *centaurin gamma* zu einer Reaktivierung der Neuroblasten in gehungerten Larven führt.



**Abb. 5.3 Modell zur Aminosäuren abhängigen Regulation der Neuroblastenreaktivierung und des systemischen Körperwachstums.** Aminosäuren aus der Nahrung werden durch den Fettkörper detektiert und vermitteln die Sekretion eines unbekanntes Faktors in die Hämolymphe. Dieser stimuliert einerseits die Sekretion von ILPs aus den mNSCs zur Regulation des systemischen Wachstums und von ZNS-spezifischen ILPs aus Gliazellen. Die ZNS-spezifischen ILPs aktivieren den InR/PI3K/Akt Signalweg in Neuroblasten und induzieren dadurch das Zellwachstum und den Wiedereintritt in den Zellzyklus.

## 5.5. Centaurin gamma im peripheren Nervensystem

Neben dem zentralen Nervensystem kontrollieren Schlüsseleffektoren des Insulin/TOR Signalnetzwerkes auch wichtige zelluläre Prozesse im peripheren Nervensystem. Für die PI3K Kinase konnte gezeigt werden, dass sie die Synaptogenese von larvalen NMJs beeinflusst (Martín-Peña et al., 2006). Die Überexpression von PI3K oder Akt führt zu einer Vergrößerung der NMJs und entsprechend mehr aktiven Zonen. Mutanten für beide Kinasen zeigen den gegenteiligen Effekt und bilden kleinere Synapsen mit weniger aktiven Zonen (Martín-Peña et al., 2006). Außerdem sind die Kinasen PI3K, Akt, S6K und der Transkriptionsfaktor FOXO an einer negativen Rückkopplungsschleife (feedback loop) unterhalb des DmGluRA Rezeptors beteiligt, die die Erregbarkeit von NMJs steuert (Howlett et al., 2008). Beide Studien belegen eine essentielle Funktion für Effektoren des Insulin/TOR Signalnetzwerkes an den glutamatergen NMJs von *Drosophila melanogaster*.

Die durchgeführten Überexpressionsstudien für *centaurin gamma* könnten ebenfalls eine Funktion für *centaurin gamma* an den NMJs vermuten lassen. Die ubiquitäre Überexpression von *centaurin gamma* führt zu vollständiger Letalität im späten Puppenstadium beziehungsweise während des Schlüpfens. Dabei sterben einige Fliegen während des Versuchs sich aus der Puppenhülle zu befreien, was auf Bewegungsdefekte zurückzuführen sein könnte.

Um eine mögliche Funktion von *centaurin gamma* an den NMJs zu untersuchen, wurden sowohl Färbungen an präparierten Larven als auch *in vivo imaging* Analysen durchgeführt.

Im Gegensatz zu den beschriebenen Komponenten des Insulin/TOR Signalnetzwerkes zeigen die NMJs von *centaurin gamma* Nullmutanten keine morphologischen Veränderungen beziehungsweise keine offensichtliche Veränderung der Anzahl an aktiven Zonen, was mit Hilfe von Färbungen verschiedener Markerproteine an Filetpräparaten untersucht wurde. Mittels einer Doppelfärbung der beiden Markerproteine, DLG und Ank2, wurden einerseits die Anordnung und die Morphologie der Boutons und andererseits die Nervenstränge und die Integrität des Zytoskeletts untersucht. Mit der Brp/GluRIID Doppelfärbung wurde die korrekte Anordnung der aktiven Zonen im präsynaptischen und dem entsprechenden postsynaptischen Bereiche überprüft. GluRIID ist eine Untereinheit

des Glutamatrezeptors und lokalisiert an der postsynaptischen Membran der NMJs. Beide Doppelfärbungen zeigten keine offensichtlichen Unterschiede zwischen den NMJs der *centg*<sup>-/-</sup> Nullmutante und denen der *w*- Kontrollpräparate. Somit scheint das Fehlen von *centaurin gamma* weder die Größe noch die Feinstruktur der NMJs zu beeinflussen. Im Gegensatz zu den Ergebnissen der Untersuchungen von PI3K scheint *centaurin gamma* keinen Einfluss auf die Synaptogenese zu haben und damit nicht am gleichen Signalweg beteiligt zu sein.

Putative Veränderungen der Erregbarkeit könnten mit elektrophysiologischen Methoden an der Mutante oder an den Überexpressionslinien untersucht werden. Diese Analysen könnten Aufschluss darüber geben, ob *centaurin gamma* analog zu FOXO, Akt, S6K und PI3K die Erregbarkeit der NMJs beeinflusst (Howlett et al., 2008).

Die *in vivo imaging* Analysen der *centg*<sup>-/-</sup> Nullmutante, die mit Hilfe des CD8-GFP-Shaker Reporters (Zito et al., 1999) durchgeführt wurden, zeigten deutliche Veränderungen im Innervierungsmuster der NMJs und der Morphologie der Körperwandmuskeln. Die Quantifizierung der Defekte ergab, dass 25 % der untersuchten Muskeln in den *centg*<sup>-/-</sup> Nullmutanten teilweise degeneriert waren beziehungsweise der entsprechende Muskel fehlte. Außerdem konnten an 25 % der untersuchten Muskeln Veränderungen der innervierenden NMJs festgestellt werden. Zu den beobachteten NMJ Defekten zählten fehlende Synapsen und mislokalisierte Synapsen. Somit deuten die *in vivo imaging* Analysen der *knockout* Mutante daraufhin, dass *centaurin gamma* das NMJ Targeting und die korrekte Lokalisierung der Synapsen einerseits und die Morphologie der Muskeln andererseits beeinflusst.

Weitere wichtige Erkenntnisse zur Funktion von *centaurin gamma* konnten durch Überexpressionsstudien gewonnen werden. Dabei wurde *centaurin gamma* jeweils in den Muskeln und dem Nervensystem überexprimiert und die Auswirkungen auf die NMJs mit Hilfe des CD8-GFP-Shaker Reporters untersucht. Die Überexpression von *centaurin gamma* im Nervensystem führte zu keinen deutlichen Veränderungen an den NMJs beziehungsweise den Muskeln. Lediglich 5% der NMJs haben Defekte im Innervierungsmuster auch die Morphologie der Muskeln ist nicht verändert. Im Gegensatz zur Überexpression in den Neuronen verursacht die Überexpression im postsynaptischen, muskulären Bereich deutliche Defekte. In 37% der Fälle führt die Überexpression zu Muskeldefekten und in 11% hat die Überexpression einen Einfluss auf die Synapse. Somit unterstützen die Überexpressionsstudien die

Hypothese, dass *centaurin gamma* eine wichtige Funktion an den NMJs beziehungsweise den entsprechenden Körperwandmuskeln übernimmt.

Die Überexpression im Muskel, wo *centaurin gamma* endogen nicht exprimiert wird, führt zu starken Defekten, wohingegen die Überexpression im Nervensystem, wo *centaurin gamma* endogen vorhanden ist, keinen signifikanten Einfluss hat. Eine mögliche Erklärung hierfür könnte sein, dass *centaurin gamma* im Muskel unspezifisch mit einem Protein, welches im Nervensystem nicht vorkommt, interagiert und so die Defekt induziert. Eine andere Erklärung wäre, dass die *centaurin gamma* Expression endogen im Nervensystem sehr streng reguliert wird, in den Muskeln hingegen ein solcher Regulationsmechanismus fehlt und dadurch bei einer ektopischen Überexpression starke Veränderungen hervorgerufen werden. Die endogene Funktion von *centaurin gamma* müsste dann auch die Muskeln beeinflussen, da der *knockout* auch dort zu Defekten führt. Eine mögliche Erklärung hierfür könnte sein, dass *centaurin gamma* das *Targeting* der Motoneurone beeinflusst. Sobald *centaurin gamma* fehlt, finden die wandernden Motoneurone teilweise nicht die determinierte Stelle, an der sie ihre Zielmuskelzelle innervieren sollen. Dadurch kommt es zu Fehlinnervierungen und fehlenden Synapsen. In diesem Szenario wären die Muskeldefekte ein sekundärer Effekt, welcher durch die fehlende oder fehlerhafte Innervierung induziert wird. Die Muskeln würden als Folge geringer Innervierung atrophieren.

Eine zweite Erklärung für die Muskeldefekte könnte eine veränderte Aktivität der Motoneurone darstellen. Falls *centaurin gamma* zu einer eingeschränkten Reizweiterleitung führt, könnte dies ebenfalls zu Defekten an den Muskelzellen führen, die durch eine fehlende oder zu geringe Innervierung atrophieren.

Weitere Hinweise, ob *centaurin gamma* wichtig für das *Targeting* von Motoneuronen ist, könnten immunhistochemische Analysen mit Motoneuronen spezifischen Markern an Embryonen erbringen. Damit kann das Verhalten der Motoneurone während der Entwicklung verfolgt und analysiert werden. Außerdem könnten elektrophysiologische Analysen Aufschluss darüber geben, ob die Reizweiterleitung durch das Fehlen oder die Überexpression von *centaurin gamma* beeinflusst wird und dadurch die Morphologie der Muskeln beeinflusst wird.





## 5.6. Centaurin gamma als funktionelles Homolog von CentG1 im Nervensystem

Das *Drosophila centg* Gen stellt das einzige Homolog zu den drei murinen CentG Genen dar, wovon CentG1 besonders gut charakterisiert ist. Durch alternatives Splicing entstehen aus dem murinen CentG1 (PIKE) Gen drei Isoformen: PIKE-S, PIKE-L und PIKE-A (Chan and Ye, 2007). PIKE-A und PIKE-L kodieren für die gleichen funktionellen Domänen wie das *Drosophila centg* Gen. PIKEs sind multifunktionelle Proteine, die diverse zelluläre Prozesse, wie Apoptose, Zellmigration, Transformation, Rezeptor- und Endosomentrafficking, Transkription und die Energiehomöostase kontrollieren (Chan and Ye, 2012).

Die PIKE-A Isoform wird in Mäusen in verschiedenen Geweben, wie dem Gehirn, der Lunge, der Leber, den Muskeln, der Milz, dem Dünndarm, den Leukozyten, dem weißen und braunen Fettgewebe und dem Brustepithel exprimiert (Chan and Ye, 2011). In einer Vielzahl von Krebsarten findet sich eine erhöhte Expression von PIKE-A, weshalb es als ubiquitäres Proto-Onkogen beschrieben wird (Ahn et al., 2004). Da PIKE-S und PIKE-L ausschließlich im Nervensystem exprimiert werden, postulieren Chan et al., dass die metabolischen Defekte der PIKE<sup>-/-</sup> Mäuse im Fettgewebe, den Muskeln und der Leber durch das Fehlen von PIKE-A hervorgerufen werden und damit PIKE-A eine essentielle Funktion in diesen Geweben übernimmt (Chan et al., 2010a). Wie bereits diskutiert, belegen unter anderem die Fütterungsexperimente mit hochkalorischem Futter, dass die Funktion von PIKE-A im Metabolismus in *Drosophila* nicht konserviert zu sein scheint.

### CentG1 als Übermittler von Überlebenssignalen in Neuronen

Die PIKE-L Isoform wird ausschließlich im Nervensystem exprimiert und ist verstärkt in den postsynaptischen Verdickungen (PSDs) lokalisiert (Rong et al., 2003).

Für PIKE-L konnte sowohl in Zellkulturexperimenten als in *in vivo* Studien gezeigt werden, dass es an mehreren Signalwegen beteiligt ist, die die Transduktion von verschiedenen Überlebenssignalen in Neuronen vermitteln (Rong et al., 2003; Chan and Ye, 2010; Chan et al., 2010b).

Unter anderem ist PIKE-L eine Komponente des Netrin1- Signalweges und interagiert sowohl mit den Netrin-abhängigen Rezeptoren UNC5 und DCC (Deleted in Colorectal Cancer) Rezeptor (Tang et al., 2008). Netrin1 ist ein chemotropher

Faktor, der in Vertebraten die Migration und die Verzweigung von neuronalen Axonen steuert, die Synapsenbildung während der Entwicklung kontrolliert und kultivierte Hippocampus Neurone vor induzierter Apoptose schützt (Tang et al., 2008; Sun et al., 2011). Der Schutz vor Apoptose wird durch die Interaktion von Netrin1 mit dem UNC5 Rezeptor vermittelt. Die Netrin1 Stimulation führt zur Aktivierung von UNC5, woraufhin PIKE-L mit dem UNC5 Rezeptor interagiert und die PI3 Kinase aktiviert (Tang et al., 2008).

In *Drosophila* wurde für die Netrine bisher eine Funktion als bifunktionelle Führungsmoleküle, die Axone sowohl anziehen als auch abweisen können, gezeigt (Winberg et al., 1998). Netrine werden von Mittellinienzellen des zentralen Nervensystems und spezifischen peripheren Muskeln exprimiert und vermitteln dadurch die Attraktion von Kommissuren- und Motoraxonen, die den DCC (frazzled) Rezeptor exprimieren. Der *Drosophila* UNC5 Rezeptor wirkt als repulsiver Netrin Rezeptor und ist ebenfalls am Motoraxon Targeting beteiligt (Keleman and Dickson, 2001). Neben Defekten im ZNS konnte gezeigt werden, dass sowohl eine Doppelmutante für die beiden Netrine als auch die Überexpression in den Muskeln in Embryonen zu peripheren Innervierungsdefekten führt (Mitchell et al., 1996). In der Doppelmutante lassen sich in der Peripherie Defekte im Innervierungsmuster des ISN (intersegmentale Motornerve) beobachten. Dabei kommt es zur verstärkten Innervierung dorsaler Muskelregionen und zur Innervierung von benachbarten Segmenten. Die ektopische Expression in allen Muskeln führt dazu, dass der ISN sich vorzeitig verzweigt, zu weit wandert beziehungsweise falsche Muskeln innerviert (Mitchell et al., 1996). Frazzled Mutanten zeigen den gleichen Phänotyp wie die Netrin Doppelmutante (Kolodziej et al., 1996)

In *centg*<sup>-/-</sup> Larven führte das Fehlen von *centaurin gamma* zu signifikanten Änderungen im Motorneuronen Innervierungsmuster in Larven. Es konnten fehlerhafte Innervierungen und das Fehlen von Synapsen beobachtet werden. Ein mögliches Modell, das die Defekte erklären könnte, wäre, dass *centaurin gamma*, wie auch das murine Homolog PIKE-L am Netrin Signalweg beteiligt sein könnte und dadurch das Motoraxon *Targeting* beeinflusst. Das Fehlen von *centaurin gamma* würde in den Mutanten zu einer Störung der Detektion des Attraktionssignals führen. Als Folge würden Axone nicht oder nur ungenügend von den Zielmuskeln angezogen werden und es würde zu einer fehlerhaften Innervierung kommen.

Da die meisten bereits bekannten Phänotypen für die beiden Netrine und deren

Rezeptoren in *Drosophila* in Embryonen untersucht wurden, sollte eine mögliche Beteiligung von *centaurin gamma* am Netrin Signalweg ebenfalls in Embryonen untersucht werden. Detaillierte Analysen des Innervierungsmusters in Embryonen könnten mit der *centg*<sup>-/-</sup> Mutante und mit den Überexpressionslinien durchgeführt werden. Diese könnten Aufschluss darüber geben, ob die in den Larven beobachteten Innervierungsdefekte bereits im Embryo vorhanden sind. Außerdem könnten Kolokalisationsstudien zwischen *centaurin gamma* und den Netrinrezeptoren eine mögliche Interaktion zeigen.

Neben den bereits beschriebenen Überlebenssignalwegen, sind die PIKE Isoformen zusätzlich in die Signalübertragung der Wachstumsfaktoren NGF (Nerve Growth Factor) und BDNF (Brain Derived Nerve Growth Factor) involviert (Chan and Ye, 2012).

PIKE-S ist die kürzeste PIKE Isoform und unterscheidet sich von den anderen beiden Isoformen dadurch, dass sowohl die ArfGAP Domäne als auch die Ankyrin Motive fehlen. PIKE-S ist ein Neuronen-spezifisches Protein und lokalisiert intrazellulär im Zellkern (Chan and Ye, 2012). PIKE-S wird durch NGF (Nerve Growth Factor) Stimulation aktiviert und interagiert in seinem aktiven Zustand mit der PI3K. Über PI3K wird die Akt Kinase im Zellkern aktiviert und vermittelt über die Phosphorylierung von verschiedenen Zielproteinen die antiapoptotische Funktion von NGF (Ahn et al., 2004).

NGF und BDNF gehören zur Klasse der Neutrophine (NTs), der wichtigsten Klasse von Molekülen, die das Überleben von Neuronen in Vertebraten vermitteln. Außerdem kontrollieren sie die Zellproliferation, die neurale Differenzierung und sind für das Auswachsen und Verzweigen von Axonen und Dendriten essentiell {Zhu:2008d}.

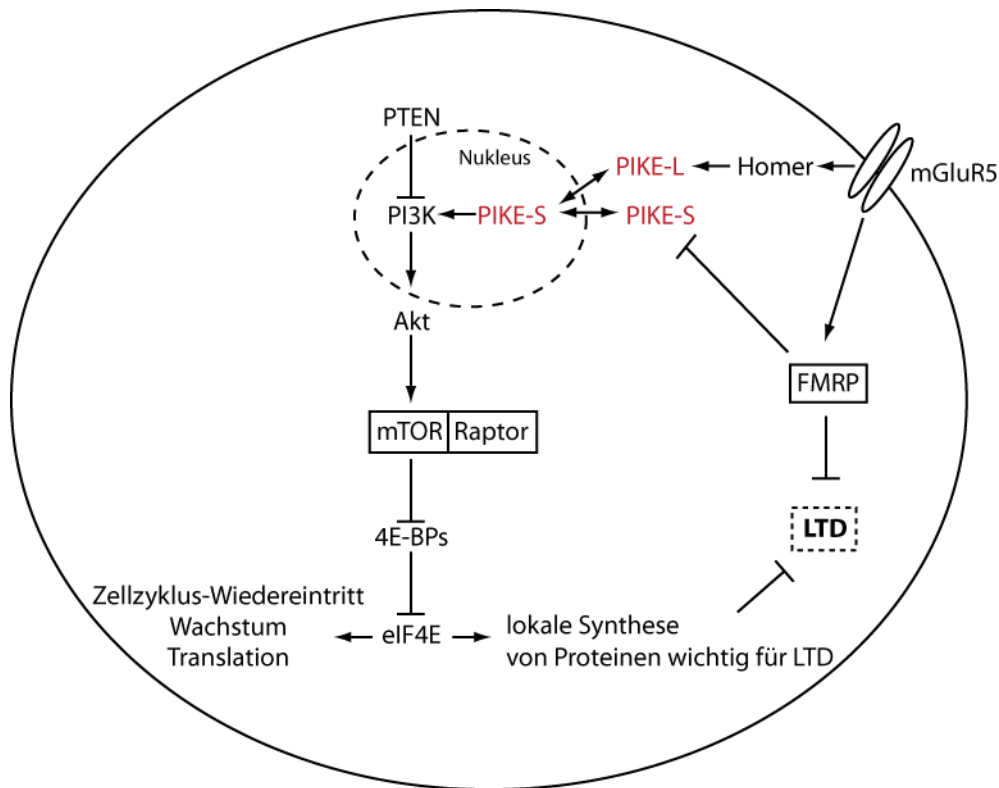
Neutrophine, wurden erst 2008 in *Drosophila* entdeckt und charakterisiert (Zhu et al., 2008). Zur Familie der NTs in *Drosophila* gehören NT1, NT2 und Spätzle. Mutanten für NT1 sind homozygot lebensfähig, weisen jedoch eine erhöhte Apoptoserate in späten Stadien der Embryonalentwicklung auf und das Motoraxon Targeting ist verändert (Zhu et al., 2008).

Da die PIKE Isoformen Überlebenssignale transduzieren, könnte in zukünftigen Experimenten adressiert werden, ob die beobachteten Targeting Defekte, die in den

*centaurin gamma loss-* und *gain-of-function* Analysen beobachtet wurden, auf die Störung eines Neutrophinsignals zurückgehen. Um dies zu untersuchen könnte ebenfalls das Innervierungsmuster der Motoraxone in Embryonen analysiert und mit dem der NT Mutanten verglichen werden. Außerdem könnten mit den *centg*<sup>-/-</sup> Mutanten und den NT Mutanten genetische Interaktionsstudien durchgeführt werden. Eine mögliche konservierte anti-apoptotische Wirkung von *centaurin gamma* könnte durch die Analyse der Apoptoserate, mit Hilfe von Apoptose-Markern, in *centg*<sup>-/-</sup> Mutanten analysiert werden.

### **Centg1 als Regulator der lokalen Proteintranslation in Dendriten**

*In vivo* Studien an einem murinen Fragiles-X-Syndrom Modell postulieren außerdem eine Funktion für PIKEs in der mGluR5/mTOR kontrollierten lokalen Proteintranslation in Dendriten (Sharma et al., 2010). Fragiles-X-Syndrom ist die häufigste erbliche Form geistiger Behinderung und die Hauptursache für erblich bedingten Autismus. Studien an *Fmr1 knockout* Mäusen, bei denen das RNA Bindeprotein FMRP (fragile X mental retardation protein) mutiert wurde, zeigen eine Hyperaktivierung des Gruppe 1 mGluR Signalweges und erhöhte mGluR- LTD (Langzeitdepression). mGluR-LTD beschreibt eine dauerhafte Abschwächung der Signalübertragung an neuronalen Synapsen und vermittelt Aspekte von synaptischer Plastizität (LUscher and Huber, 2010). Sharma et al. konnten zeigen, dass in *Fmr1* Mutanten sowohl der mGluR als auch der mTOR Signalweg im Hippocampus hyperaktiviert sind. Zusätzlich zu den bekannten Effektoren des mTOR Signalweges detektierten die Autoren eine erhöhte Menge des PIKE-S Proteins in Hippocampuslysaten. Außerdem belegt eine weitere Studie, dass die PIKE RNA ein direktes Ziel von FMRP ist (Darnell et al., 2011). Aus diesen Ergebnissen leiten die Autoren ein Modell ab, in dem unter normalen Bedingungen FMRP PIKE und andere Effektoren des PI3K/Akt Signalweges reprimiert und die lokale Proteintranslation von synaptischen Proteinen unterdrückt wird. Die Aktivierung des mGluR Rezeptors wiederum stimuliert die Initiation der Translation von synaptischen Proteinen in Dendriten und dadurch mGluR-LTD. Sie postulieren weiterhin, dass die veränderte Aktivität von PIKE und der mTOR abhängigen Proteintranslation in Dendriten, eine Ursache für die kognitiven Veränderungen und Defizite im Sozialverhalten von Fragile-X-Syndrom Patienten sein könnten.



**Abb. 5.4 Modell zur Interaktion von FMRP, mTOR und PIKE.** FMRP reprimiert PIKE und andere Aktivatoren des PI3K/Akt Signalweges und reguliert so mTOR. Die Aktivierung des mGluR5 Rezeptors führt zur Bildung des mGluR/ Homer/ PIKE Komplexes und induziert PI3K/Akt Signaling (Rong, 2003). Die Aktivierung von mTOR stimuliert die lokale Synthese von synaptischen Proteinen in Dendriten und damit zu mGluR-LTD. In FMRP Mausmutanten ist PIKE hochreguliert, mTOR Signaling hyperaktiviert und es kommt zur verstärkten Synthese von synaptischen Proteinen und Proteinsynthese-unabhängigen mGluR-LTD (modifiziert nach Sharma et al., 2010).

An glutamatergen Motorneuronen von *Drosophila* Larven führt die Aktivierung des mGluR Rezeptors, DmGluRA, ebenfalls zur Herunterregulation der neuronalen Erregbarkeit (Bogdanik et al., 2004). Wie bereits beschrieben wird durch Glutamat PI3K aktiviert und vermittelt über die Akt Kinase und den Transkriptionsfaktor FOXO die Reduktion der Erregbarkeit (Howlett et al., 2008).

Für *Drosophila melanogaster* wurde ebenfalls ein Fragile-X-Modell generiert und charakterisiert (Zhang et al., 2001). Das Fehlen von dFMRP in *fmr1* Mutanten führt zu starken Defekten an den larvalen glutamatergen NMJs. Es kommt zu einer Vergrößerung der Synapsen (größere Fläche, mehr Verzweigungen, mehr synaptische Boutons), einer Anhäufung von Satellitenboutons und Veränderungen in der Reizweiterleitung (Zhang et al., 2001; Gatto and Brodie, 2011). Eine Interaktion zwischen *Drosophila* FMRP und dem DmGluRA Rezeptor wurde ebenfalls bereits

gezeigt (Pan et al., 2008). Außerdem gibt es Studien, die belegen, dass die lokale Proteintranslation eine wichtige Funktion an den larvalen NMJs hat. Die postsynaptische Translation beeinflusst sowohl die Morphologie als auch die Reizweiterleitung an den NMJs (Sigrist et al., 2000).

Eine morphologische Veränderung der NMJs, wie die der *fmr1* Mutanten, konnte an den NMJs der *centg*<sup>-/-</sup> Mutanten, die mit den verschiedenen Markerproteinen analysiert wurden, nicht beobachtet werden. Das Fehlen von *centaurin gamma* führt weder zu stark vergrößerten noch stark verkleinerten Synapsen. Aufschluss darüber ob, die Reizweiterleitung in den *centg*<sup>-/-</sup> Mutanten, oder bei einer prä- oder postsynaptischen Überexpression, verändert ist, könnten zusätzliche elektrophysiologische Untersuchungen geben. Detaillierte Expressionsstudien mit endogen exprimierten getagten *centg* Konstrukten oder einem Antikörper gegen *centg* könnten zusätzlich zeigen, ob *centaurin gamma* prä- oder postsynaptisch an den larvalen NMJs lokalisiert ist. Weiterhin könnte an den NMJs von *fmr1* Mutanten untersucht werden, ob *centaurin gamma* wie PIKE-S vermehrt an den Synapsen lokalisiert. Durch den Einsatz der spezifischen *centaurin gamma in situ* Sonde könnte zusätzlich analysiert werden, ob das FMRP Protein und die *centg* mRNA an Synapsen kolokalisieren.

Die durchgeführten Analysen an den larvalen NMJs von *Drosophila* geben erste Hinweise darauf, dass Funktionen des murinen Centg1 Gens in *Drosophila* konserviert sein könnten. Detaillierte Analysen der beschriebenen Signalwege könnten damit einen Beitrag zum Verständnis der molekularen Mechanismen von neuronalen Erkrankungen im Menschen leisten, die durch eine Veränderung dieser Signalwege hervorgerufen werden.







## 6. Anhang

### Plasmidkarten

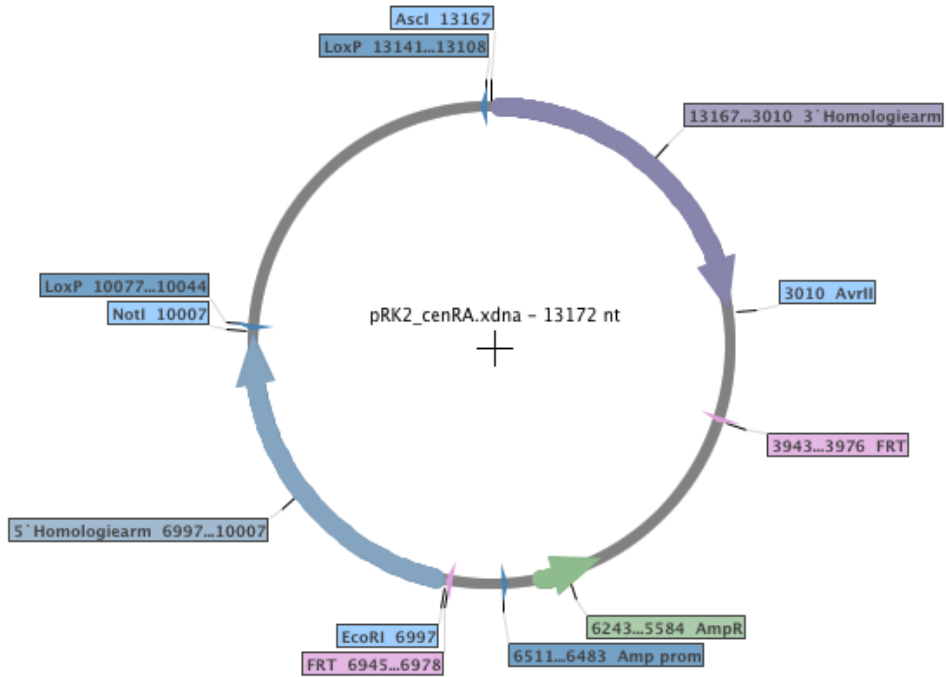


Abb. 6.1 Plasmidkarte des generierten pRK2-cenRA Plasmids (ends-out Gene Targeting).

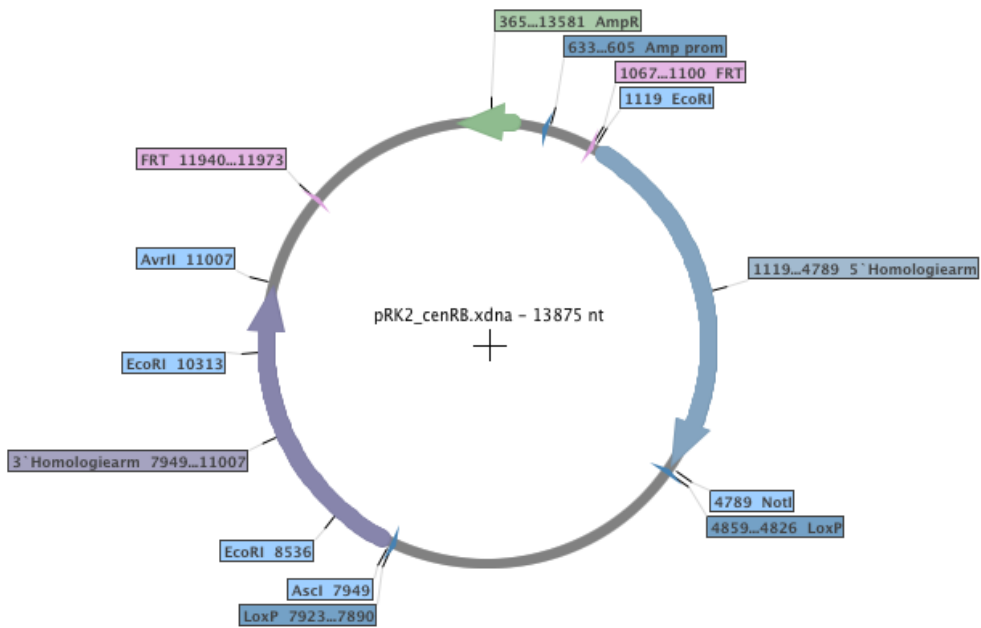


Abb. 6.2 Plasmidkarte des generierten pRK2-cenRB Plasmids (ends-out Gene Targeting).

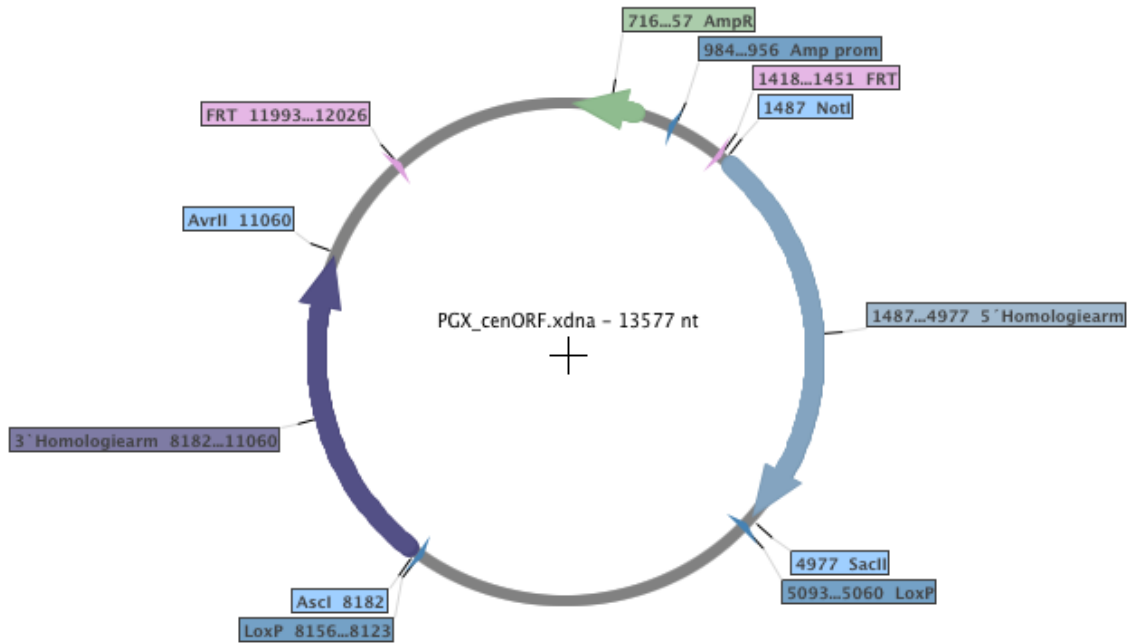


Abb. 6.3 Plasmidkarte des generierten pGX-cenORF Plasmids (ends-out Gene Targeting).

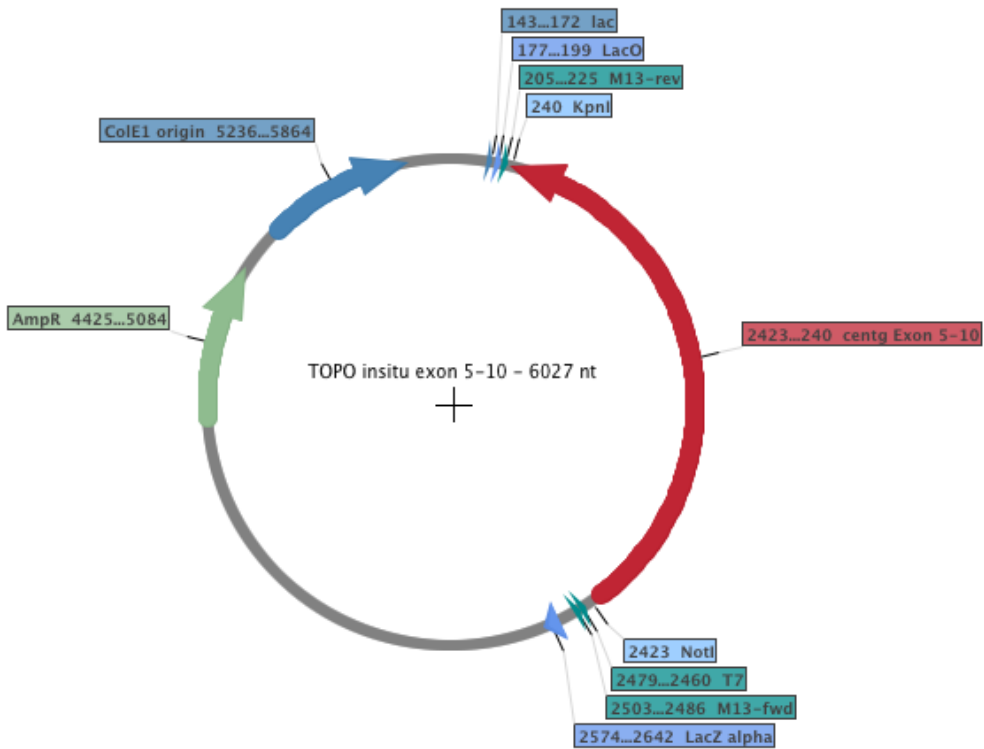


Abb. 6.4 Plasmidkarte des generierten Plasmids TOPO-Exon5-10 (in situ RNA-Sonde).

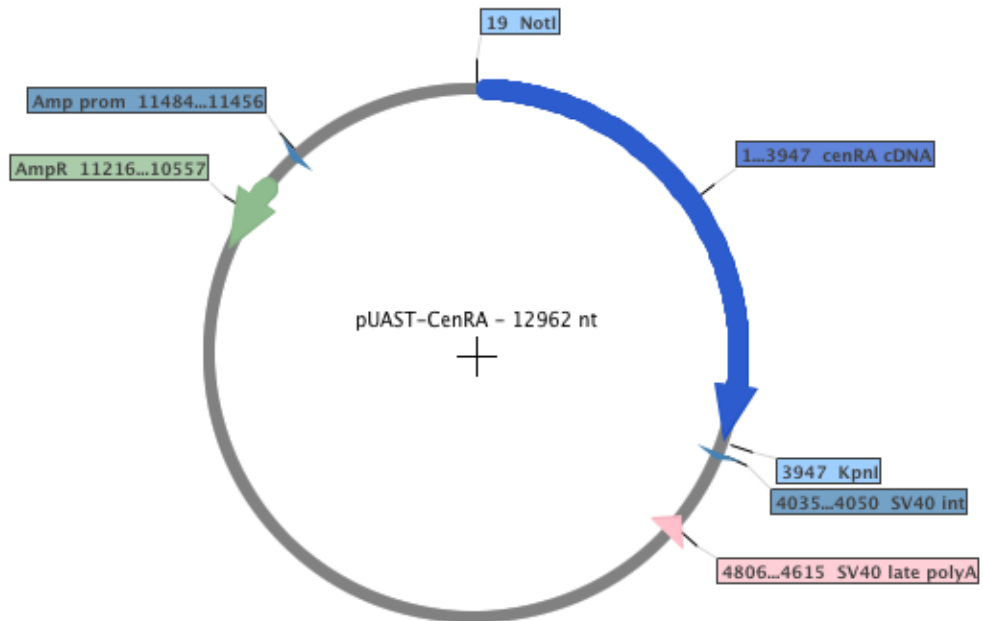


Abb. 6.5 Plasmidkarte des generierten pUAST-cenRA Plasmids (Überexpressionslinien).

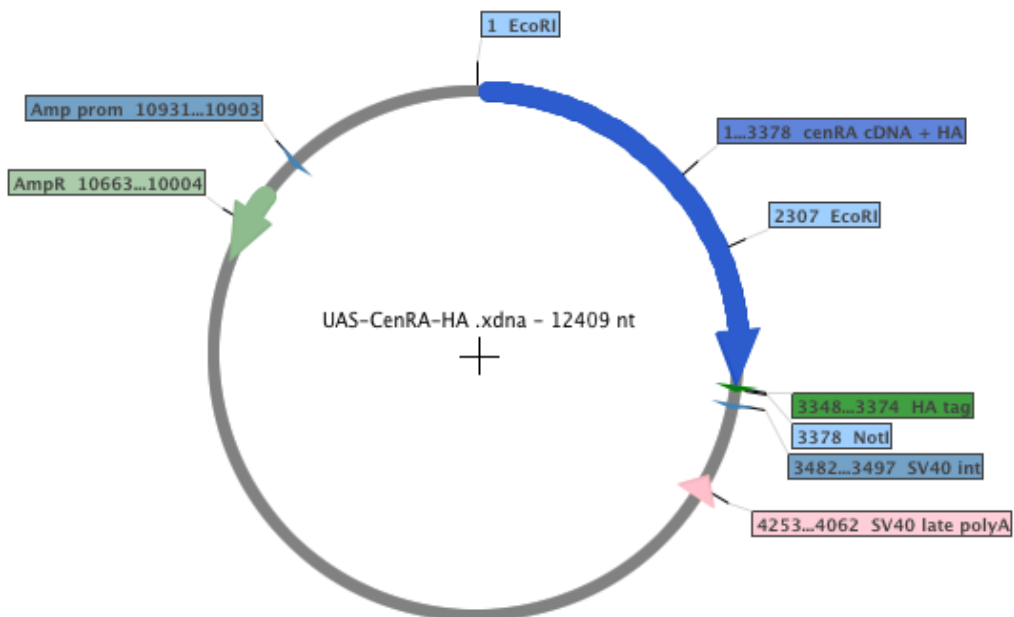


Abb. 6.6 Plasmidkarte des generierten pUAST-cenRAHA Plasmids (Überexpressionslinien).

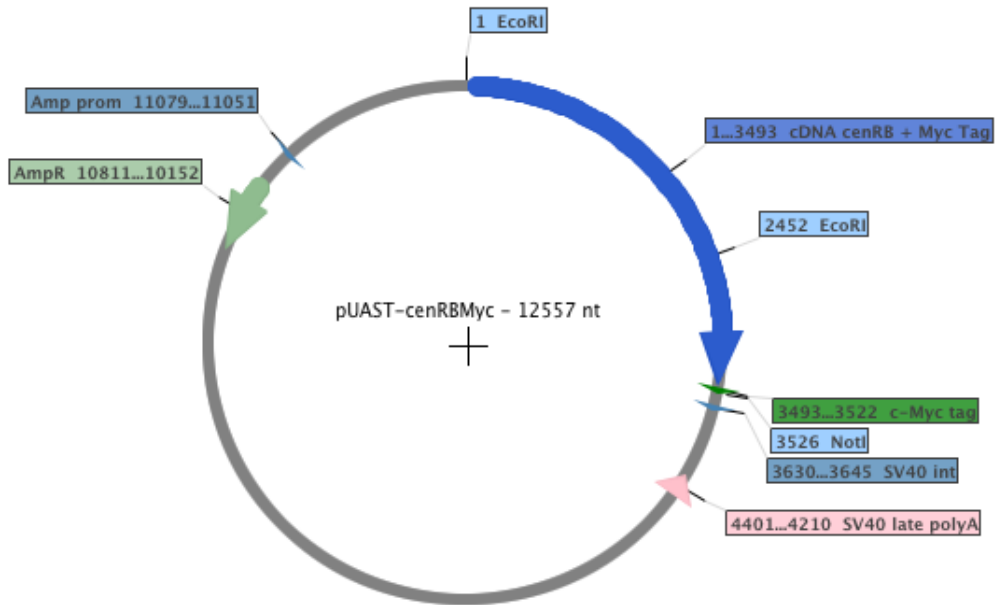


Abb. 6.7 Plasmidkarte des generierten pUAST-cenRBMyc Plasmids (Überexpressionslinien)

## 7. Literaturverzeichnis

Gündner A (2008) Diplomarbeit. Untersuchungen zur Funktion von Centaurin Gamma im Insulinsignalweg von *Drosophila melanogaster*. Universität Bonn

Sendscheid O (2010) Diplomarbeit. Molecular analysis of ADP ribosylation factor GTPase activation proteins (ArfGAPs) in *Drosophila melanogaster*. Universität Bonn

Wegner M (2008) Diplomarbeit. CG8243, ein neuer Kandidat im Insulin Signalweg von *Drosophila melanogaster*?. Universität Bonn

WHO (2012) Obesity and overweight Fact sheet N°311 May 2012

Ahn J-Y, Rong R, Liu X, Ye K (2004) PIKE/nuclear PI 3-kinase signaling mediates the antiapoptotic actions of NGF in the nucleus. *EMBO J* 23:3995–4006.

Al-Anzi B, Zinn K (2010) Colorimetric Measurement of Triglycerides Cannot Provide an Accurate Measure of Stored Fat Content in *Drosophila*. *PLoS ONE* 5:e12353EP–.

Antony B, Beraud-Dufour S, Chardin P, Chabre M (2012) N-Terminal Hydrophobic Residues of the G-Protein ADP-Ribosylation Factor-1 Insert into Membrane Phospholipids upon GDP to GTP Exchange†. *Biochemistry* 36:4675–4684.

Arquier N, Géminard C, Bourouis M, Jarretou G, Honegger B, Paix A, Léopold P (2008) *Drosophila* ALS Regulates Growth and Metabolism through Functional Interaction with Insulin-Like Peptides. *Cell Metab* 7:333–338.

Barsh GS, Farooqi IS, O'Rahilly S (2000) Genetics of body-weight regulation. *Nature* 404:644–651.

Bernards A (2003) GAPs galore! A survey of putative Ras superfamily GTPase activating proteins in man and *Drosophila*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer* 1603:47–82.

Bernards A, Settleman J (2004) GAP control: regulating the regulators of small GTPases. *Trends in Cell Biology* 14:377–385.

Bill A, Schmitz A, Albertoni B, Song J-N, Heukamp LC, Walrafen D, Thorwirth F, Verveer PJ, Zimmer S, Meffert L, Schreiber A, Chatterjee S, Thomas RK, Ullrich RT, Lang T, Famulok M (2010) Cytohesins Are Cytoplasmic ErbB Receptor Activators. *Cell* 143:201–211.

Birse RT, Choi J, Reardon K, Rodriguez J, Graham S, Diop S, Ocorr K, Bodmer R, Oldham S (2010) High-Fat-Diet-Induced Obesity and Heart Dysfunction Are Regulated by the TOR Pathway in *Drosophila*. *Cell Metab* 12:533–544.

Blanco E, Ruiz-Romero M, Beltran S, Bosch M, Punset A, Serras F, Corominas M (2010) Gene expression following induction of regeneration in *Drosophila* wing imaginal discs. Expression profile of regenerating wing discs. *BMC Dev Biol* 10:94.

Bogdanik L, Mohrmann R, Ramaekers A, Bockaert J, Grau Y, Brodie K, Parmentier M-L (2004) The *Drosophila* metabotropic glutamate receptor DmGluRA regulates activity-dependent synaptic facilitation and fine synaptic morphology. *Journal of Neuroscience* 24:9105–9116.

Bonini JBANM (2012) DROSOPHILA AS A MODEL FOR HUMAN NEURODEGENERATIVE DISEASE. :1–21.

Bos JL, Rehmann H, Wittinghofer A (2007) GEFs and GAPs: Critical Elements in the Control

- of Small G Proteins. *Cell* 129:865–877.
- Böhni R, Riesgo-Escovar J, Oldham S, Brogiolo W, Stocker H, Andruss BF, Beckingham K, Hafen E (1999) Autonomous control of cell and organ size by CHICO, a *Drosophila* homolog of vertebrate IRS1-4. *Cell* 97:865–875.
- Britton JS, Edgar BA (1998) Environmental control of the cell cycle in *Drosophila*: nutrition activates mitotic and endoreplicative cells by distinct mechanisms. *Development* 125:2149–2158.
- Brogiolo W, Stocker H, Ikeya T, Rintelen F, Fernandez R, Hafen E (2001) An evolutionarily conserved function of the *Drosophila* insulin receptor and insulin-like peptides in growth control. *Current Biology* 11:213–221.
- Budnik V, Koh YH, Guan B, Hartmann B, Hough C, Woods D, Gorczyca M (1996) Regulation of synapse structure and function by the *Drosophila* tumor suppressor gene *dlg*. *Neuron* 17:627–640.
- Budnik V, Zhong Y, Wu CF (1990) Morphological plasticity of motor axons in *Drosophila* mutants with altered excitability. *J Neurosci* 10:3754–3768.
- Bun Chan C, Liu X, Pradoldej S, Hao C, An J, Yepes M, Luo HR, Ye K (2011) Phosphoinositide 3-Kinase Enhancer Regulates Neuronal Dendritogenesis and Survival in Neocortex. *Journal of Neuroscience* 31:8083–8092.
- Campbell B, O'Rourke MT, Lipson SF (2003) Salivary testosterone and body composition among *Ariaal* males. *Am J Hum Biol* 15:697–708.
- Carrera-Bastos P, Fontes, O'Keefe, Lindeberg, Cordain (2011) The western diet and lifestyle and diseases of civilization. *RRCC*:15.
- Casanova JE (2007) Regulation of Arf Activation: the Sec7 Family of Guanine Nucleotide Exchange Factors. *Traffic* 8:1476–1485.
- Chan CB, Liu X, Ensslin MA, Dillehay DL, Ormandy CJ, Sohn P, Serra R, Ye K (2010a) PIKE-A is required for prolactin-mediated STAT5a activation in mammary gland development. *EMBO J* 29:956–968.
- Chan CB, Liu X, Jung DY, Jun JY, Luo HR, Kim JK, Ye K (2010b) Deficiency of Phosphoinositide 3-Kinase Enhancer Protects Mice From Diet-Induced Obesity and Insulin Resistance. *Diabetes* 59:883–893 Available at: <http://diabetes.diabetesjournals.org/cgi/doi/10.2337/db09-1404>.
- Chan CB, Ye K (2007) PIKE GTPase are phosphoinositide-3-kinase enhancers, suppressing programmed cell death. *J Cell Mol Med* 11:39–53.
- Chan CB, Ye K (2010) Multiple Functions of Phosphoinositide-3 Kinase Enhancer (PIKE). *TheScientificWorldJOURNAL* 10:613–623.
- Chan CB, Ye K (2011) What we have learnt about PIKE from the knockout mice. *Int J Biochem Mol Biol* 2:228–239.
- Chan CB, Ye K (2012) Phosphoinositide 3-kinase enhancer (PIKE) in the brain: is it simply a phosphoinositide 3-kinase/Akt enhancer? *Reviews in the Neurosciences* 23:153–161.
- Chell JM, Brand AH (2010) Nutrition-Responsive Glia Control Exit of Neural Stem Cells from Quiescence. *Cell* 143:1161–1173.
- Chen C, Jack J, Garofalo RS (1996) The *Drosophila* insulin receptor is required for normal growth. *Endocrinology* 137:846–856.
- Cheng LY, Bailey AP, Leever SJ, Ragan TJ, Driscoll PC, Gould AP (2011) Anaplastic Lymphoma Kinase Spares Organ Growth during Nutrient Restriction in *Drosophila*. *Cell* 146:435–447.
- Chien S, Reiter LT, Bier E, Gribskov M (2002) Homophila: human disease gene cognates in

- Drosophila*. *Nucleic Acids Research* 30:149–151.
- Colombani J, Raisin S, Pantalacci S, Radimerski T, Montagne J, Léopold P (2003) A nutrient sensor mechanism controls *Drosophila* growth. *Cell* 114:739–749.
- Darnell JC, Van Driesche SJ, Zhang C, Hung KYS, Mele A, Fraser CE, Stone EF, Chen C, Fak JJ, Chi SW, Licatalosi DD, Richter JD, Darnell RB (2011) FMRP Stalls Ribosomal Translocation on mRNAs Linked to Synaptic Function and Autism. *Cell* 146:247–261.
- Donaldson JG (2000) Filling in the Gaps in the ADP-ribosylation factor story. *Proc Natl Acad Sci USA* 97:3792–3794.
- Donaldson JG, Honda A (2005) Localization and function of Arf family GTPases. *Biochem Soc Trans* 33:639–642.
- Donaldson JG, Jackson CL (2011) ARF family G proteins and their regulators: roles in membrane transport, development and disease. *Nat Rev Mol Cell Biol* 12:362–375.
- Dyer N, Rebollo E, Dominguez P, Elkhatib N, Chavrier P, Daviet L, González C, Gonzalez-Gaitan M (2007) Spermatocyte cytokinesis requires rapid membrane addition mediated by ARF6 on central spindle recycling endosomes. *Development* 134:4437–4447.
- Featherstone DE (2005) An Essential *Drosophila* Glutamate Receptor Subunit That Functions in Both Central Neuropil and Neuromuscular Junction. *Journal of Neuroscience* 25:3199–3208.
- Fernandez R, Tabarini D, Azpiazu N, Frasch M, Schlessinger J (1995) The *Drosophila* insulin receptor homolog: a gene essential for embryonic development encodes two receptor isoforms with different signaling potential. *EMBO J* 14:3373–3384.
- Ferrandon D, Imler J-L, Hetru C, Hoffmann JA (2007) The *Drosophila* systemic immune response: sensing and signalling during bacterial and fungal infections. *Nat Rev Immunol* 7:862–874.
- Fontana L, Partridge L, Longo VD (2010) Extending Healthy Life Span—From Yeast to Humans. *Science* 328:321–326.
- Franke TF (2008) PI3K/Akt: getting it right matters. *Oncogene* 27:6473–6488.
- Fuss B, Becker T, Zinke I, Hoch M (2006) The cytohesin Steppke is essential for insulin signalling in *Drosophila*. *Nature* 444:945–948.
- Gao X (2001) TSC1 and TSC2 tumor suppressors antagonize insulin signaling in cell growth. *Genes Dev* 15:1383–1392.
- Gatto CL, Broadie K (2011) Fragile X mental retardation protein is required for programmed cell death and clearance of developmentally-transient peptidergic neurons. *Developmental Biology*:1–17.
- Gillingham AK, Munro S (2007) The Small G Proteins of the Arf Family and Their Regulators. *Annu Rev Cell Dev Biol* 23:579–611.
- Goberdhan DC, Paricio N, Goodman EC, Mlodzik M, Wilson C (1999) *Drosophila* tumor suppressor PTEN controls cell size and number by antagonizing the Chico/PI3-kinase signaling pathway. *Genes Dev* 13:3244–3258.
- Greenberg L, Hatini V (2011) Systematic expression and loss-of-function analysis defines spatially restricted requirements for *Drosophila* RhoGEFs and RhoGAPs in leg morphogenesis. *Mechanisms of Development* 128:5–17.
- Grewal SS, Evans JR, Edgar BA (2007) *Drosophila* TIF-IA is required for ribosome synthesis and cell growth and is regulated by the TOR pathway. *The Journal of Cell Biology* 179:1105–1113.
- Grönke S, Mildner A, Fellert S, Tennagels N, Petry S, Müller G, Jäckle H, Kühnlein RP (2005) Brummer lipase is an evolutionary conserved fat storage regulator in *Drosophila*. *Cell*

- Metab 1:323–330.
- Gutierrez E, Wiggins D, Fielding B, Gould AP (2006) Specialized hepatocyte-like cells regulate *Drosophila* lipid metabolism. *Nature* 445:275–280.
- Hafner M, Schmitz A, Grüne I, Srivatsan SG, Paul B, Kolanus W, Quast T, Kremmer E, Bauer I, Famulok M (2006) Inhibition of cytohesins by SecinH3 leads to hepatic insulin resistance. *Nature* 444:941–944.
- Hildebrandt A, Bickmeyer I, Kühnlein RP (2011) Reliable *Drosophila* Body Fat Quantification by a Coupled Colorimetric Assay Samakovlis C, ed. *PLoS ONE* 6:e23796.
- Honegger B, Galic M, Köhler K, Wittwer F, Brogiolo W, Hafen E, Stocker H (2008) Imp-L2, a putative homolog of vertebrate IGF-binding protein 7, counteracts insulin signaling in *Drosophila* and is essential for starvation resistance. *J Biol* 7:10.
- Howlett E, Lin CC-J, Lavery W, Stern M (2008) A PI3-Kinase-Mediated Negative Feedback Regulates Neuronal Excitability. *PLoS Genet* 4:e1000277.
- Huang J, Zhou W, Dong W, Watson AM, Hong Y (2009) From the Cover: Directed, efficient, and versatile modifications of the *Drosophila* genome by genomic engineering. *Proc Natl Acad Sci USA* 106:8284–8289.
- Huang J, Zhou W, Watson AM, Jan YN, Hong Y (2008) Efficient Ends-Out Gene Targeting In *Drosophila*. *Genetics* 180:703–707.
- Ikeya T, Galic M, Belawat P, Nairz K, Hafen E (2002) Nutrient-dependent expression of insulin-like peptides from neuroendocrine cells in the CNS contributes to growth regulation in *Drosophila*. *Current Biology* 12:1293–1300.
- Inoki K, Guan KL (2009) Tuberous sclerosis complex, implication from a rare genetic disease to common cancer treatment. *Human Molecular Genetics* 18:R94–R100.
- Jackson TR, Brown FD, Nie Z, Miura K, Foroni L, Sun J, Hsu VW, Donaldson JG, Randazzo PA (2000) ACAPs are arf6 GTPase-activating proteins that function in the cell periphery. *The Journal of Cell Biology* 151:627–638.
- Johnson EC, Kazgan N, Bretz CA, Forsberg LJ, Hector CE, Worthen RJ, Onyenwoke R, Brenman JE (2010) Altered Metabolism and Persistent Starvation Behaviors Caused by Reduced AMPK Function in *Drosophila*. *PLoS ONE* 5:e12799.
- Jünger MA, Rintelen F, Stocker H, Wasserman JD, Végh M, Radimerski T, Greenberg ME, Hafen E (2003) The *Drosophila* forkhead transcription factor FOXO mediates the reduction in cell number associated with reduced insulin signaling. *J Biol* 2:20.
- Kanasaki K, Koya D (2011) Biology of Obesity: Lessons from Animal Models of Obesity. *Journal of Biomedicine and Biotechnology* 2011:1–11.
- Keleman K, Dickson BJ (2001) Short- and long-range repulsion by the *Drosophila* Unc5 netrin receptor. *Neuron* 32:605–617.
- Kim SK, Rulifson EJ (2004) Conserved mechanisms of glucose sensing and regulation by *Drosophila corpora cardiaca* cells. *Nature* 431:316–320.
- Koch I, Schwarz H, Beuchle D, Goellner B, Langegger M, Aberle H (2009) *Drosophila* Ankyrin 2 Is Required for Synaptic Stability. *Neuron* 58:210–222 Available at: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0896627308002651>.
- Kolanus W (2007) Guanine nucleotide exchange factors of the cytohesin family and their roles in signal transduction. *Immunological Reviews* 218.
- Kolodziej PA, Timpe LC, Mitchell KJ, Fried SR, Goodman CS, Jan LY, Jan YN (1996) frazzled encodes a *Drosophila* member of the DCC immunoglobulin subfamily and is required for CNS and motor axon guidance. *Cell* 87:197–204.
- Kramer JM, Davidge JT, Lockyer JM, Staveley BE (2003) Expression of *Drosophila* FOXO



- regulates growth and can phenocopy starvation. *BMC Dev Biol* 3:5.
- Lahey T, Gorczyca M, Jia XX, Budnik V (1994) The *Drosophila* tumor suppressor gene *dlg* is required for normal synaptic bouton structure. *Neuron* 13:823–835.
- Leevers SJ, Weinkove D, MacDougall LK, Hafen E, Waterfield MD (1996) The *Drosophila* phosphoinositide 3-kinase *Dp110* promotes cell growth. *EMBO J* 15:6584–6594.
- Lloyd TE, Taylor JP (2010) Flightless flies: *Drosophila* models of neuromuscular disease. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1184:e1–e20.
- LUscher C, Huber KM (2010) Group 1 mGluR-Dependent Synaptic Long-Term Depression: Mechanisms and Implications for Circuitry and Disease. *Neuron* 65:445–459.
- Martín-Peña A, Acebes A, Rodríguez J-R, Sorribes A, de Polavieja GG, Fernández-Fúnez P, Ferrús A (2006) Age-Independent Synaptogenesis by Phosphoinositide 3 Kinase. *Journal of Neuroscience* 26:10199–10208.
- Mayer C, Zhao J, Yuan X, Grummt I (2004) mTOR-dependent activation of the transcription factor TIF-IA links rRNA synthesis to nutrient availability. *Genes Dev* 18:423–434.
- Meyer F (2006) At the next stop sign turn right: the metalloprotease Tolloid-related 1 controls defasciculation of motor axons in *Drosophila*. *Development* 133:4035–4044.
- mi RCPN-K, Lévy M, Ligeti E (2012) Small G proteins and their regulators in cellular signalling. *Molecular and Cellular Endocrinology* 353:10–20.
- Miron M, Lasko P, Sonenberg N (2003) Signaling from Akt to FRAP/TOR targets both *4E-BP* and *S6K* in *Drosophila melanogaster*. *Molecular and Cellular Biology* 23:9117–9126.
- Mitchell KJ, Doyle JL, Serafini T, Kennedy TE, Tessier-Lavigne M, Goodman CS, Dickson BJ (1996) Genetic analysis of Netrin genes in *Drosophila*: Netrins guide CNS commissural axons and peripheral motor axons. *Neuron* 17:203–215.
- Nakae J, Kido Y, Accili D (2001) Distinct and overlapping functions of insulin and IGF-I receptors. *Endocr Rev* 22:818–835.
- Neel JV (1962) Diabetes mellitus: a “thrifty” genotype rendered detrimental by ‘progress’? *American journal of human genetics* 14:353.
- Oldham S, Montagne J, Radimerski T, Thomas G, Hafen E (2000) Genetic and biochemical characterization of dTOR, the *Drosophila* homolog of the target of rapamycin. *Genes Dev* 14:2689–2694.
- Palanker L, Tennesen JM, Lam G, Thummel CS (2009) *Drosophila* HNF4 Regulates Lipid Mobilization and  $\beta$ -Oxidation. *Cell Metab* 9:228–239.
- Palanker Musselman L, Fink JL, Narzinski K, Ramachandran PV, Sukumar Hathiramani S, Cagan RL, Baranski TJ (2011) A high-sugar diet produces obesity and insulin resistance in wild-type *Drosophila*. *Disease Models & Mechanisms* 4:842–849.
- Pan L, Woodruff E, Liang P, Broadie K (2008) Mechanistic relationships between *Drosophila* fragile X mental retardation protein and metabotropic glutamate receptor A signaling. *Mol Cell Neurosci* 37:747–760.
- Penney J, Tsurudome K, Liao EH, Elazzouzi F, Livingstone M, Gonzalez M, Sonenberg N, Haghghi AP (2012) TOR Is Required for the Retrograde Regulation of Synaptic Homeostasis at the *Drosophila* Neuromuscular Junction. *Neuron* 74:166–178.
- Pielage J, Cheng L, Fetter RD, Carlton PM, Sedat JW, Davis GW (2008) A Presynaptic Giant Ankyrin Stabilizes the NMJ through Regulation of Presynaptic Microtubules and Transsynaptic Cell Adhesion. *Neuron* 58:195–209.
- Polonsky KS (2012) The Past 200 Years in Diabetes. *N Engl J Med* 367:1332–1340.
- Porstmann T, Santos CR, Griffiths B, Cully M, Wu M, Leevers S, Griffiths JR, Chung Y-L, Schulze A (2008) SREBP Activity Is Regulated by mTORC1 and Contributes to Akt-

- Dependent Cell Growth. *Cell Metab* 8:224–236.
- Potter CJ, Huang H, Xu T (2001) Drosophila Tsc1 functions with Tsc2 to antagonize insulin signaling in regulating cell growth, cell proliferation, and organ size. *Cell* 105:357–368.
- Puig O (2003) Control of cell number by Drosophila FOXO: downstream and feedback regulation of the insulin receptor pathway. *Genes Dev* 17:2006–2020.
- Qin Q, Inatome R, Hotta A, Kojima M, Yamamura H, Hirai H, Yoshizawa T, Tanaka H, Fukami K, Yanagi S (2006) A novel GTPase, CRAG, mediates promyelocytic leukemia protein-associated nuclear body formation and degradation of expanded polyglutamine protein. *The Journal of Cell Biology* 172:497–504.
- Quast T, Tappertzhofen B, Schild C, Grell J, Czeloth N, Forster R, Alon R, Fraemohs L, Dreck K, Weber C, Lammermann T, Sixt M, Kolanus W (2009) Cytohesin-1 controls the activation of RhoA and modulates integrin-dependent adhesion and migration of dendritic cells. *Blood* 113:5801–5810.
- Ramachandrappa S, Farooqi IS (2011) Genetic approaches to understanding human obesity. *J Clin Invest* 121:2080–2086.
- Randazzo PA, Miura K, Nie Z, Orr A, Theibert AB, Kearns BG (2001) Cytohesins and centaurins: mediators of PI 3-kinase regulated Arf signaling. *Trends Biochem Sci* 26:220–221.
- Rintelen F, Stocker H, Thomas G, Hafen E (2001) PDK1 regulates growth through Akt and S6K in Drosophila. *Proc Natl Acad Sci USA* 98:15020–15025.
- Rong R, Ahn J-Y, Huang H, Nagata E, Kalman D, Kapp JA, Tu J, Worley PF, Snyder SH, Ye K (2003) PI3 kinase enhancer–Homer complex couples mGluRI to PI3 kinase, preventing neuronal apoptosis. *Nat Neurosci* 6:1153–1161.
- Roza SJ, Steegers EAP, Verburg BO, Jaddoe VWV, Moll HA, Hofman A, Verhulst FC, Tiemeier H (2008) What Is Spared by Fetal Brain-Sparing? Fetal Circulatory Redistribution and Behavioral Problems in the General Population. *American Journal of Epidemiology* 168:1145–1152.
- Rudrapatna VA, Cagan RL, Das TK (2011) Drosophila cancer models Singh A, Irvine KD, eds. *Dev Dyn* 241:107–118.
- Rulifson EJ (2002) Ablation of Insulin-Producing Neurons in Flies: Growth and Diabetic Phenotypes. *Science* 296:1118–1120.
- Saltiel AR, Kahn CR (2001) Insulin signalling and the regulation of glucose and lipid metabolism. *Nature* 414:799–806.
- Saucedo LJ, Gao X, Chiarelli DA, Li L, Pan D, Edgar BA (2003) Rheb promotes cell growth as a component of the insulin/TOR signalling network. *Nat Cell Biol* 5:566–571.
- Scheffzek K, Ahmadian MR (2005) GTPase activating proteins: structural and functional insights 18 years after discovery. *Cell Mol Life Sci* 62:3014–3038.
- Sharma A, Hoeffler CA, Takayasu Y, Miyawaki T, McBride SM, Klann E, Zukin RS (2010) Dysregulation of mTOR Signaling in Fragile X Syndrome. *Journal of Neuroscience* 30:694–702.
- Shingleton AW (2010) The regulation of organ size in Drosophila: physiology, plasticity, patterning and physical force. *Organogenesis* 6:76–87.
- Sigrist SJ, Thiel PR, Reiff DF, Lachance PE, Lasko P, Schuster CM (2000) Postsynaptic translation affects the efficacy and morphology of neuromuscular junctions. *Nature* 405:1062–1065.
- Slack C, Giannakou ME, Foley A, Goss M, Partridge L (2011) dFOXO-independent effects of reduced insulin-like signaling in Drosophila. *Aging Cell* 10:735–748.

- Sousa-Nunes R, Yee LL, Gould AP (2011) Fat cells reactivate quiescent neuroblasts via TOR and glial insulin relays in *Drosophila*. *Nature* 471:508–512.
- Speakman JR (2007) A Nonadaptive Scenario Explaining the Genetic Predisposition to Obesity: The “Predation Release” Hypothesis. *Cell Metab* 6:5–12.
- Stark C (2006) BioGRID: a general repository for interaction datasets. *Nucleic Acids Research* 34:D535–D539.
- Stocker H, Radimerski T, Schindelholtz B, Wittwer F, Belawat P, Daram P, Breuer S, Thomas G, Hafen E (2003) Rheb is an essential regulator of S6K in controlling cell growth in *Drosophila*. *Nat Cell Biol* 5:559–565.
- Sun KLW, Correia JP, Kennedy TE (2011) Netrins: versatile extracellular cues with diverse functions. *Development* 138:2153–2169.
- Tang X, Jang S-W, Okada M, Chan CB, Feng Y, Liu Y, Luo S-W, Hong Y, Rama N, Xiong W-C, Mehlen P, Ye K (2008) Netrin-1 mediates neuronal survival through PIKE-L interaction with the dependence receptor UNC5B. *Nat Cell Biol* 10:698–706.
- Teleman A, Ratzenböck I, Oldham S (2012) *Drosophila*: A Model for Understanding Obesity and Diabetic Complications. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 120:184–185.
- Teleman AA (2009) Molecular mechanisms of metabolic regulation by insulin in *Drosophila*. *Biochem J* 425:13–26.
- Teleman AA, Chen Y-W, Cohen SM (2005) *4E-BP* functions as a metabolic brake used under stress conditions but not during normal growth. *Genes Dev* 19:1844–1848.
- Tsukiyama-Kohara K, Poulin F, Kohara M, DeMaria CT, Cheng A, Wu Z, Gingras A-C, Katsume A, Elchebly M, Spiegelman BM, Harper M-E, Tremblay ML, Sonenberg N (2001) Adipose tissue reduction in mice lacking the translational inhibitor *4E-BP1*. *Nat Med* 7:1128–1132.
- Venkateswarlu K, Brandom KG, Yun H (2007) PI-3-kinase-dependent membrane recruitment of centaurin-2 is essential for its effect on ARF6-mediated actin cytoskeleton reorganisation. *J Cell Sci* 120:792–801.
- Verdu J, Buratovich MA, Wilder EL, Birnbaum MJ (1999) Cell-autonomous regulation of cell and organ growth in *Drosophila* by Akt/PKB. *Nat Cell Biol* 1:500–506.
- Villa-Cuesta E, Sage BT, Tatar M (2010) A Role for *Drosophila* dFoxO and dFoxO 5'UTR Internal Ribosomal Entry Sites during Fasting Villa-Cuesta E, Sage BT, Tatar M, eds. *PLoS ONE* 5:e11521EP– Available at: <http://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0011521.g003>.
- Wagh DA, Rasse TM, Asan E, Hofbauer A, Schwenkert I, Dürrbeck H, Buchner S, Dabauvalle M-C, Schmidt M, Qin G (2006) Bruchpilot, a Protein with Homology to ELKS/CAST, Is Required for Structural Integrity and Function of Synaptic Active Zones in *Drosophila*. *Neuron* 49:833–844.
- Weinkove D, Neufeld TP, Twardzik T, Waterfield MD, Leever SJ (1999) Regulation of imaginal disc cell size, cell number and organ size by *Drosophila* class I(A) phosphoinositide 3-kinase and its adaptor. *Current Biology* 9:1019–1029.
- Werz C, Köhler K, Hafen E, Stocker H (2009) The *Drosophila* SH2B family adaptor Lnk acts in parallel to chico in the insulin signaling pathway. *PLoS Genet* 5:e1000596.
- Wullschleger S, Loewith R, Hall MN (2006) TOR Signaling in Growth and Metabolism. *Cell* 124:471–484.
- Xia C, Ma W, Stafford LJ, Liu C, Gong L, Martin JF, Liu M (2003) GGAPs, a new family of bifunctional GTP-binding and GTPase-activating proteins. *Molecular and Cellular Biology* 23:2476–2488.

- Zhang YQ, Bailey AM, Matthies HJ, Renden RB, Smith MA, Speese SD, Rubin GM, Broadie K (2001) *Drosophila* fragile X-related gene regulates the MAP1B homolog Futsch to control synaptic structure and function. *Cell* 107:591–603.
- Zhu B, Pennack JA, McQuilton P, Forero MG, Mizuguchi K, Sutcliffe B, Gu C-J, Fenton JC, Hidalgo A (2008) *Drosophila* Neurotrophins Reveal a Common Mechanism for Nervous System Formation Bate M, ed. *PLoS Biol* 6:e284.
- Zinke I, Schütz CS, Katzenberger JD, Bauer M, Pankratz MJ (2002) Nutrient control of gene expression in *Drosophila*: microarray analysis of starvation and sugar-dependent response. *EMBO J* 21:6162–6173.
- Zito K, Parnas D, Fetter RD, Isacoff EY, Goodman CS (1999) Watching a synapse grow: noninvasive confocal imaging of synaptic growth in *Drosophila*. *Neuron* 22:719–729.

## 8. Abkürzungsverzeichnis

centg (cenG1A)	centaurin gamma
FLP	Flippase
GAP	GTPase-activating protein
GDP	Guanosindiphosphat
GEF	Guanine nucleotide exchange factor
GTP	Guanosintriphosphat
h	Stunden
IGF	Insulin like Growth Factor
ILP	Insulin Like Peptide
IPCs	Insulin Producing Cells
IR	Inverted Repeats
kb	Kilobasen
kDa	Kilo Dalton
<i>lip3</i>	Lipase 3
LTD	Langzeitdepression
M	Molar
MCS	Multiple Cloning Site
mg	Milligramm
min	Minuten
ml	Milliliter
mRNA	messenger RNA
OD	optische Dichte
OPC	Outer Proliferation Center

---

Abkürzungsverzeichnis

---

PI3K	Phosphatidylinositol 3-kinase
PIKE	Phosphatidylinositol 3-kinase Enhancer
RT	Raumtemperatur
T1D	Diabetes mellitus-Type-1
T2D	Diabetes mellitu- Type-2
Tag	Peptid zur Markierung von Proteinen
TAG	Triacylglyceride
Targeting	Zielfindung
UAS	Upstream Activating Sequence
ün	über Nacht
UpM	Umdrehungen pro Minute
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter







## Danksagung

Herrn Prof. Michael Hoch danke ich herzlich für Bereitstellung des interessanten und herausfordernden Projektes, die vielfältigen Anregungen und die freundliche Förderung. Besonders möchte ich mich für die Freiheit bedanken, die er mir bei der strategischen Ausrichtung des Projektes gewährt hat und für die Unterstützung bei der Realisierung von neuen Ideen.

Danken möchte ich außerdem Prof. Hermann Aberle für die Zeit und die Energie, die er in unsere gemeinsamen Experimente investiert hat. Ich habe durch unsere Kooperation viel gelernt und die wissenschaftlichen Diskussionen sehr genossen. Außerdem möchte ich mich bei ihm bedanken, dass er sich bereit erklärt hat, als fachnahes Mitglied Teil meiner Prüfungskommission zu sein.

Prof. Michael Pankratz möchte ich für die Zusage danken, die Funktion des Zweitgutachters zu übernehmen. Außerdem danke ich ihm für die witzigen und motivierenden Anekdoten aus seiner eigenen Doktorandenzeit.

Bei Prof. Frank Edenhofer möchte ich mich für die spontane Bereitschaft bedanken, als fachfremdes Mitglied Teil meiner Prüfungskommission zu sein.

Dr. Mario Schöne aus der Biochemistry & Cell Biology of Lipids Gruppe danke ich für die Unterstützung bei den Lipidanalysen.

Oliver Sendscheid danke ich für die Unterstützung bei den GTPase Assays.

Außerdem möchte ich mich bei allen Mitgliedern meiner Arbeitsgruppe herzlich für die tolle Arbeitsatmosphäre und ihre Hilfsbereitschaft bedanken. Dabei möchte ich meine Kolleginnen Pilar Carrera und Mélisande Richard im Besonderen erwähnen.

Ein außerordentlicher Dank gilt meinen Weggefährten Christian Wingen und Almut Steinhagen ohne deren wissenschaftliche und moralische Unterstützung diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre.

Meinem Freund Christoph Patsch möchte ich für seine Geduld, Fürsorge und insbesondere für seine wissenschaftliche Unterstützung danken.

Meiner Familie danke ich, dass sie mir diese Ausbildung ermöglicht hat und für ihre Unterstützung während der gesamten Zeit.



## **Erklärung**

Hiermit versichere ich, dass diese Dissertation von mir persönlich, selbständig und ohne jede unerlaubte Hilfe angefertigt wurde. Die Daten, die im Rahmen einer Kooperation gewonnen wurden, sind ausnahmslos gekennzeichnet. Die vorliegende Arbeit wurde an keiner anderen Hochschule als Dissertation eingereicht. Ich habe früher noch keinen Promotionsversuch unternommen.

Bonn, November 2012

Anna Lisa Gündner