

Enoki mushroom (enok) – ein neuer epigenetischer
Regulator von Lipidmetabolismus, Wachstum und
Nahrungsaufnahme in *Drosophila melanogaster*

Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades (Dr. rer. nat.)

der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der

Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

vorgelegt von

NINA MODERAU

aus Petropawlowsk

Bonn 2015

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

1. Gutachter: Prof. Dr. Michael J. Pankratz

LIMES Institut, Programmeinheit Entwicklungsbiologie, Genetik & Molekulare
Physiologie, Molekulare Hirnphysiologie & Verhaltensforschung, Universität
Bonn

2. Gutachter: Priv.-Doz. Dr. Gerhild van Echten-Deckert

LIMES Institut, Programmeinheit Membranbiologie & Lipidbiochemie,
Universität Bonn

Tag der mündlichen Prüfung **13.09.16**

Erscheinungsjahr **2016**

Zusammenfassung

Um das Überleben eines Organismus zu gewährleisten, bedarf es eines exakten Zusammenspiels von verschiedenen Genen, die zeit- und gewebespezifisch reguliert werden müssen, um das externe Nahrungsangebot zu detektieren, die Nährstoffaufnahme, -speicherung und -mobilisierung zu koordinieren und somit den Metabolismus, die Entwicklung und das Wachstum zu steuern.

Das Gen *enoki mushroom* (*enok*) wurde in einem Screen identifiziert, welcher Phänotypen untersuchte, die Nahrungsaufnahme-, Wachstums- und Verhaltensdefekte aufwiesen. Hierbei handelt es sich um eine putative Histon-Acetyltransferase, die epigenetisch diese Prozesse steuert. Enok ist in der Lage das kondensierte Chromatin zu lockern und dadurch die Transkription bestimmter Zielgene zu induzieren. Seine enzymatische Funktion und seine Sequenzhomologie charakterisieren Enok in dieser Arbeit als ein Mitglied der KAT6B-Familie. Durch den Einsatz von molekularbiologischen und biochemischen Methoden, so wie Fluoreszenz-Mikroskopie, der Benutzung des Gal4-UAS Systems und der Mutanten-Analyse, konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass Enok eine wichtige Rolle in der Interorgan-Kommunikation spielt, und dass es sowohl zellautonom als auch zentral den Lipidmetabolismus, das Wachstum und das Fressverhalten reguliert.

Die Herstellung spezifischer *enok-Gal4* Linien ermöglichte es das Expressionsmuster zu analysieren und seine Funktion durch gewebe- und zeitspezifische Missexpression genauer zu beschreiben. Als relevante Gewebe konnten Fettkörper, Oenozyten, sowie Neuroblasten und Cortex Glia Zellen im zentralen Nervensystem identifiziert werden. Diese Gewebe spielen eine wichtige Rolle in der Speicherung von Nährstoffen, im Metabolismus und in der Wachstumskontrolle. Mit Hilfe von Neutrallipid-Färbungen in diesen larvalen Geweben konnte gezeigt werden, dass Enok zellautonom den Lipidmetabolismus steuert, indem es die transkriptionelle Kontrolle über die Prozesse der Lipolyse, der β -Oxidation und der Fettsäuresynthese übernimmt. In jedem dieser Gewebe hat Enok neben der zellautonomen Regulation des Lipidmetabolismus eine zusätzliche systemische Funktion. Im Fettkörper reguliert Enok systemisch durch die transkriptionelle Kontrolle der Lipoproteine den Transport der Triacylglyceride (TAGs). In den Oenozyten steuert Enok fernlenkend die Abdichtung des respiratorischen Systems, indem es einen Einfluss auf die Transkription der Fettsäuresynthesegene hat. Zusätzlich zu der zellautonomen Kontrolle des Lipidstoffwechsels im Gehirn steuert Enok in der Cortex Glia fernlenkend das Wachstum und den Lipidmetabolismus in der Peripherie. Durch die Regulation der *Drosophila* insulin-like peptides (Dilp)-Sekretion kontrolliert Enok den PI3K/AKT-Signalweg und damit das Wachstum, die Neuroblastenproliferation und das Nahrungsaufnahmeverhalten. Zusammengefasst konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass Enok als eine putative Histon-Acetyltransferase die extrinsische und intrinsische Nahrungssignalverarbeitung und die Anpassung der Homöostase sowohl autonom, als auch systemisch im Organismus von *Drosophila melanogaster* reguliert. Diese beschriebene Funktion von Enoki mushroom bringt eine neue Komponente in die Wachstumsregulation, welche möglicherweise nicht nur in der Fliege sondern auch in der Maus und im Menschen eine ähnliche Aufgabe übernimmt, und zur Aufklärung der damit verbundenen Krankheitsbilder beiträgt.

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1 Histon-Acetyltransferasen der KAT6B Familie	2
1.2 Fettkörper als Regulator des systemischen Wachstums und Lipidmetabolismus	6
1.3 Wahrnehmung der Nährstoffe (Nutrient Sensing)	10
1.4 Vom Fettkörper zum Gehirn	11
1.5 Funktion von Glia Zellen in der Neuroblasten-Entwicklung	12
1.6 Zielsetzung	14
2. Material und Methoden	17
2.1 Material	17
2.1.1 Verbrauchsmaterial	17
2.1.2 Chemikalien	17
2.1.3 Lösungen und Medien	18
2.1.4 Enzyme	19
2.1.5 Kits und Standards	20
2.1.6 Antikörper	20
2.1.7 Fliegenlinien	21
2.1.8 Bakterienstämme	22
2.1.9 Vektoren und Plasmide	23
2.1.10 Primer zum Klonieren	24
2.1.11 Primer für quantitative <i>RealTime</i> PCR	24
2.1.12 Geräte	25
2.1.13 Computerprogramme/ServerDienste	26
2.2 Methoden	27
2.2.1 Arbeit mit Fliegen	27
2.2.2 Isolation und Aufreinigung von DNA und RNA	29
2.2.3 Klonierung von DNA-Fragmenten	31
2.2.4 PCR Techniken	32
2.2.5 Biochemische Methoden	33
2.2.6 Zellkultur und Transfektion	36
2.2.7 Fluoreszenz-Proteindetektion	36
2.2.8 Neutrallipid-Detektion	37
2.2.9 <i>In vivo</i> Aufnahmen	38
3. Ergebnisse	40
3.1 Enok Protein Charakterisierung	40

3.1.1 Detektion und posttranslationale Modifikation.....	40
3.1.2 Lokalisation und mögliche Aufgabe des Enok Proteins.....	44
3.1.3 Acetylierung durch Enok	46
3.2 Expressionsanalyse von <i>enok-Gal4</i>	48
3.2.1 Herstellung der <i>enok-Gal4</i> Linie.....	49
3.2.2 Expression der <i>enokL-Gal4</i> und der <i>enokS-Gal4</i>	51
3.2.3 Verifizierung der <i>enok-Gal4</i> Treiberlinie mit dem Anti-Enok Antikörper	56
3.3 Phänotypische und transkriptionelle Analyse der <i>enok-Mutante</i>.....	59
3.4 Phänotypische und transkriptionelle Analyse der <i>enok</i> Überexpression unter der Kontrolle des <i>enok-Gal4</i> Treibers	64
3.4.1 Triglycerid-Gehalt in <i>enok</i> Überexpressionstieren vermindert sich nicht während des Hungerns	70
3.5 Phänotypische Analyse der Überexpression von <i>enok</i> unter der Kontrolle spezifischer Treiberlinien.....	72
3.5.1 Effekt der <i>enok</i> -Überexpression im Fettkörper	74
3.5.2 Die Regulation der Lipoproteine durch Enok	76
3.6 Effekt der <i>enok</i>-Überexpression in den Oozyten	79
3.6.1 Funktion von Enok im respiratorischen System.....	81
3.7 Funktion von Enok im zentralen Nervensystem	83
3.7.1 Überexpression in der Cortex Glia kopiert den <i>enok</i> -Phänotyp	85
3.7.2 Enok in der Cortex Glia reguliert die Dilp2 Sekretion	86
3.7.3 Transkriptionelle Analyse der Kreuzung <i>cortex glia>Enok; eYFP</i>	90
3.8 Enok reguliert Lipidmetabolismus entwicklungsunabhängig und auf zellulärer Ebene.....	92
3.9. Enoks Einfluss auf nahrungsabhängige Signalwege im Gehirn.....	95
3.9.1 Enok reguliert den Lipidmetabolismus und den Lipidtransport im Gehirn	95
3.9.2 Enoks Einfluss auf nahrungsabhängige Signalwege im Gehirn.....	97
4. Diskussion	100
4.1 Spaltung, Acetylierung, und Komplexbildung von Enok	100
4.2 Expressions- und Funktionshomologie von Enok	104
4.3 Enok reguliert Lipidmetabolismus auf transkriptioneller Ebene	107
4.4 Zellautonome und systemische Regulation des Lipidmetabolismus durch Enok	110
4.4.1 Enok reguliert den Lipidtransport	110
4.4.2 Enok ist verantwortlich für die Abdichtung des respiratorischen Systems ...	112
4.4.3 Zentrale Regulation des Lipidmetabolismus durch Cortex Glia	112
4.5 Enok spielt eine Rolle in der Wachstumskontrolle und der Organ zu Organ Kommunikation	114

4.6 <i>enok</i> Überexpression im Gehirn verursacht eine Hyperphosphorylierung von AKT (und damit möglicherweise einen Nahrungsaufnahmestopp).....	117
4.7 Fazit.....	119
5. Literaturverzeichnis.....	123
6. Abkürzungsverzeichnis.....	133
7. Anhang.....	137
Abbildungsverzeichnis.....	173
Danksagungen.....	177

1. Einleitung

„You wanna lose weight, Stop eating, fatty!“

(Woody Harrelson)

Die Frage wie das Wachstum und die Größe eines Organismus reguliert und koordiniert werden, fasziniert seit Generationen nicht nur Wissenschaftler sondern die gesamte Menschheit. Die Mechanismen, die diese Vorgänge regulieren, sind jedoch weitestgehend unklar. Seit einigen Jahren wird die Fliege *Drosophila melanogaster* als Modelorganismus für die Beantwortung dieser Fragestellungen benutzt (Grewal, 2012). Sie zeichnet sich durch besonders einfache Handhabung und Vielseitigkeit aus und ermöglicht es verschiedenste genetische Manipulation anzuwenden. Durch den Einsatz modernster Techniken der Biochemie, der Molekularbiologie und der neuesten Mikroskopieverfahren konnten einige dieser Fragen bereits beantwortet werden.

Besonders für die Fragen, die das Wachstum betreffen, ist *Drosophila* eines der besten Modellorganismen, da sich ihre Entwicklung in drei Stadien unterteilen lässt -Embryo, Larve und Puppe- bis ein adultes Tier entsteht. Der eigentliche Wachstumsprozess und die ca. 200 fache Zunahme der Körpermaße finden während der fünf Tage des Larvenstadiums statt. In dieser Zeit muss der Körper besonders genau das Wachstum regulieren.

Die Wachstumskontrolle eines multizellulären Organismus findet auf mehreren Ebenen statt. Die eine Ebene kontrolliert die Organisation und die Koordination des Wachstums auf zellulärer Ebene. Der Organismus kann nur dann korrekt und der Situation entsprechend wachsen, wenn jede einzelne Zelle ihr Wachstum reguliert und sich den umgebenden Zellen anpasst. Umfangreiche Studien in den letzten zehn Jahren zeigten, dass der Hippo-Signalweg eine wichtige Bedeutung in dieser Art der Regulation der Organgröße und Zellregeneration sowohl in *Drosophila*, als auch in Säugetieren hat (Zhao et al., 2011; Halder und Johnson, 2011).

Eine weitere Ebene der Regulation, die erst seit kurzem mehr Beachtung erfährt, ist die Kontrolle der Organ-zu-Organ Signaltransduktion, welche das Körperwachstum und die Organgröße beeinflusst (Killip und Grewal, 2012). Diese Art der Regulation ist ein stark koordinierter Prozess, der zirkulierende Faktoren wie Hormone und Insulin-ähnliche Wachstumsfaktoren (insulin-like growth factors=IGF) benötigt, um Organwachstum zu fördern (Stanger, 2008). Hier hat sich hauptsächlich die Kommunikation zwischen dem Fettkörper und dem zentralen Nervensystem als besonders wichtig herausgestellt (Ables und Drummond-Barbosa, 2011; Chell und Brand, 2010; Sousa-Nunes et al., 2011). Dies hängt mit einer weiteren Ebene der Wachstumsregulation zusammen, nämlich der Regulation durch äußere Einflüsse wie zum Beispiel durch symbiotische Darmbakterien (Shin et al., 2011; Storelli et al., 2011) oder Nahrungsverfügbarkeit (Britton und Edgar, 1998). Da Tiere oft in einer Umgebung leben, in der sich die Nahrungsbedingung häufig verändern, müssen sie

ständig den Metabolismus an die Nahrungsbedingung anpassen, um Gewebe- und Körperwachstum zu regulieren. Defekte in der Koordination dieser Prozesse beeinträchtigen die Entwicklung und führen zu Wachstumsstörungen, oder im schlimmsten Fall zum Tod.

Die drei beschriebenen Koordinationsebenen der Wachstumsregulation -1) zellautonome Kontrolle, 2) Organ-zu-Organ Kommunikation und 3) die Verarbeitung und Weitergabe der Umwelteinflüsse- müssen alle im Einklang miteinander funktionieren, um das Überleben des Organismus zu sichern. Doch die Frage, wie die Regulation stattfindet ist nur lückenhaft beantwortet. In der folgenden Arbeit wird die putative Histon-Acetyltransferase Enok mushroom (Enok) beschrieben, die in diese Art der Regulation eingebunden zu sein scheint.

1.1 Histon-Acetyltransferasen der KAT6B Familie

Die Regulation der Gentranskription besteht unter anderem aus der dynamischen Strukturveränderung des Chromatins. Das Nukleosom, welches die Basiseinheit des Chromatins darstellt, besteht aus einem Histonoktamer mit je zwei Kopien der Untereinheiten H2A, H2B, H3 und H4, um welche sich die DNA 1,6fach umwickelt. (Kornberg und Lorch, 1999). An der Oberfläche der Nukleosome sind amino-terminale Schwänze der jeweiligen Histone zu finden. Diese sind die Hauptträger der posttranslationalen Modifikationen, wie Acetylierungen, Methylierungen, Phosphorylierungen und Ubiquitylierungen (MacDonald und Howe, 2009). Histon-Acetylierung wird meistens mit der Auflockerung des Chromatins und einer erhöhten Transkriptionsaktivität assoziiert. Dieser dynamische und reversible Prozess wird durch einen Multiproteinkomplex durchgeführt. Das *Drosophila* Protein Enok bildet die katalytische Subeinheit dieses Histon-Acetyltransferase (HAT) Komplexes. Die charakteristische Domänen-Struktur kennzeichnet Enok als ein Mitglied der MYST4 oder KAT6B-Familie (Lysin/K-Acetyltransferase6B). Bei dem früher benutzten Namen MYST handelt es sich um ein Akronym der katalytischen Acetyl-CoA-Transferase-Domäne: MOZ (monocytic leukaemia zinc finger protein), YBF2/SAS3 (something about silencing), SAS2 und IIP60 (tat-interactive protein, 60 kDa). Enok ist 2291 Aminosäuren lang und enthält eine NEMM-Domäne (N-terminale Region in Enok, MOZ oder MORF (monocytic leukemia zinc-finger protein (MOZ)-related factor)) und zwei PHD-Zinkfinger-Motive, die MYST-Domäne gefolgt von der uncharakteristischen Neurofilament-ähnlichen Domäne (Abb. 3.1B), welche nicht in anderen MYST-Proteinen vorkommt (Yang, 2004). Die neue Einteilung der HATs in KATs berücksichtigt nicht nur die Domänenstruktur, sondern auch das Ziel der Acetylierung. Die Stelle der Acetylierung ist im Reich der Eukaryoten durchweg konserviert und die KAT6B-HATs sind hauptsächlich für die Acetylierung des Histons H3 verantwortlich (Sapountzi und Côté, 2011). Zu den weiteren Mitgliedern dieser Proteinfamilie gehören sowohl die humanen Histon-Acetyltransferasen MOZ und MORF, als auch die murine Histon-Acetyltransferase Querkopf (Kraft et al., 2011). Die bereits genauer erforschten HATs MOZ und MORF zeigen, dass ein stabiler Komplex mit mehreren Adapterproteinen entstehen muss. Zu den

2

Interaktionspartnern gehören BRPF [*bromodomain plant homeodomain (PHD) finger*] 1, 2 oder 3 der Tumorsuppressor ING5 (*inhibitor of growth 5*); und EAF6 (homolog of *Esa1-associated factor 6*) (Ali et al., 2012). BRPF scheint die Zusammensetzung des Komplexes an den spezifischen genomischen Regionen herbeizuführen (Ullah et al., 2008; Qin et al., 2011). Die Rolle von EAF6 bleibt unklar. Für ING5 jedoch wurde gezeigt, dass es mit Hilfe des C-terminalen PHD-Fingers das Histon H3 am Lysin 4 dreifach methyliert (H3K4me3). Dadurch stabilisiert es den Komplex an den Promotorregionen der zu aktivierenden und zu transkribierenden Gene (Champagne et al., 2008). Diese drei Proteine bilden einen stabilen Kern um die Histon-Acetyltransferase (Abb. 1.1). Dieser Komplex scheint von *Drosophila melanogaster* bis zum Menschen konserviert zu sein. Durch die Methode der *in vivo* Biotinylierung zur Komplexbildungsanalyse wurde Enok als Histon-Acetyltransferase identifiziert, welche ebenfalls einen Komplex mit den *Drosophila* Homologen von EAF6 und BRPF eingeht. Die Interaktionspartner von Enok sind EAF6 und CG1845/Br140 (Strübbe et al., 2011).

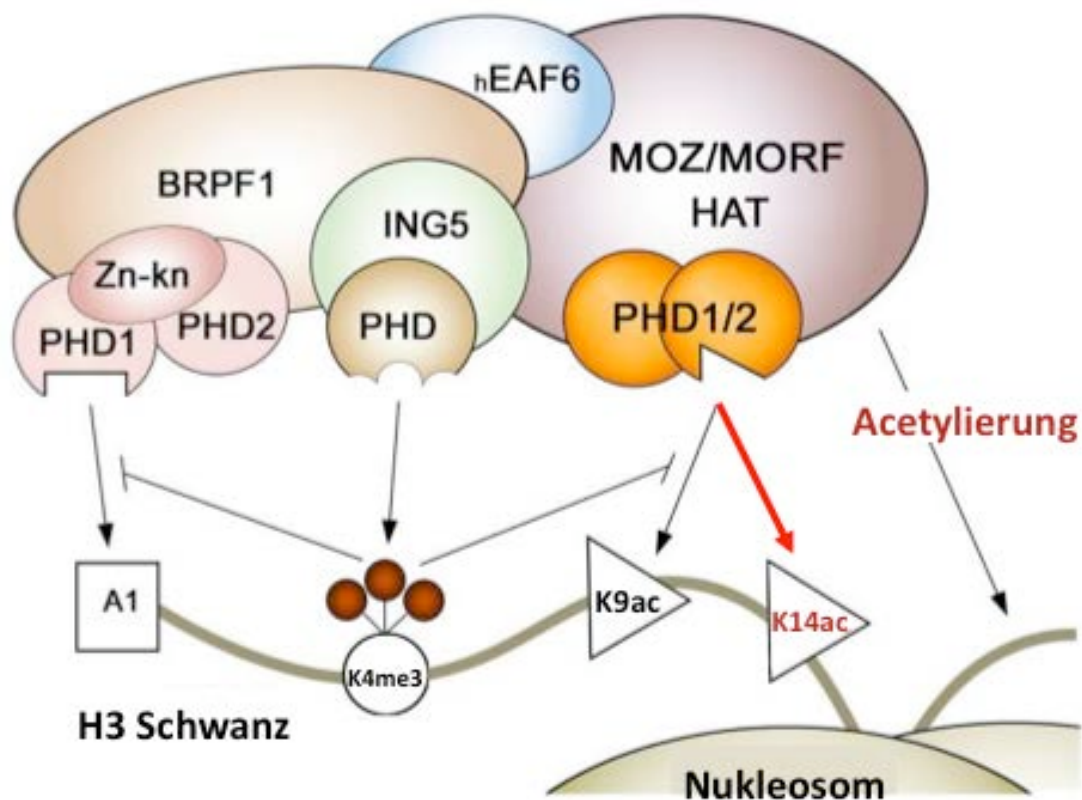


Abbildung 1.1: MOZ/MORF Multiprotein-Komplex.

Der MOZ/MORF Komplex, ist ein Heterotetramer bestehend aus der katalytischen Einheit monocytic leukemic zinc-finger (MOZ) oder monocytic leukemia zinc-finger protein (MOZ)-related factor (MORF), dem Bromodomain-PHD finger protein 1 (BRPF1), dem Inhibitor of growth 5 (ING5) und der Untereinheit Homolog of Esa1-associated factor 6 (EAF6). Dieser Komplex sorgt für die Acetylierung des Histon3. Die einzelnen PHD-Domänen der Untereinheiten koordinieren die Erkennung und modellieren die epigenetischen Modifikationen untereinander. Die Funktion der Histon-Acetyltransferase MORF, dem Enok Homolog, besteht aus der Acetylierung des Lysinrests K14 am Histon3. In rot markiert ist das putative Acetylierungsziel (K14) von Enok. (übernommen und modifiziert von Ali et al., 2012)

Da Enok die eigentliche Auflockerung des Chromatins durch die Übertragung der Acyl-Gruppe vom Acetyl-CoA auf den Lysinrest übernimmt (Abb. 1.2A), ist im Fall einer Mutation von Enok

eine anhaltende Kondensation des Chromatins zu erwarten. Dadurch bleibt die Transkription der Zielgene unterdrückt. Sobald jedoch einer der Faktoren im Übermaß produziert wird, kann der Komplex ebenfalls nicht mehr entstehen (Theorie der Balance; Papp et al., 2003). Die Folge ist ein Funktionsverlust-Phänotyp (loss-of-function), da auch hier die Transkription der Zielgene ausbleibt oder nur in geringen Mengen stattfindet (Abb. 1.2B).

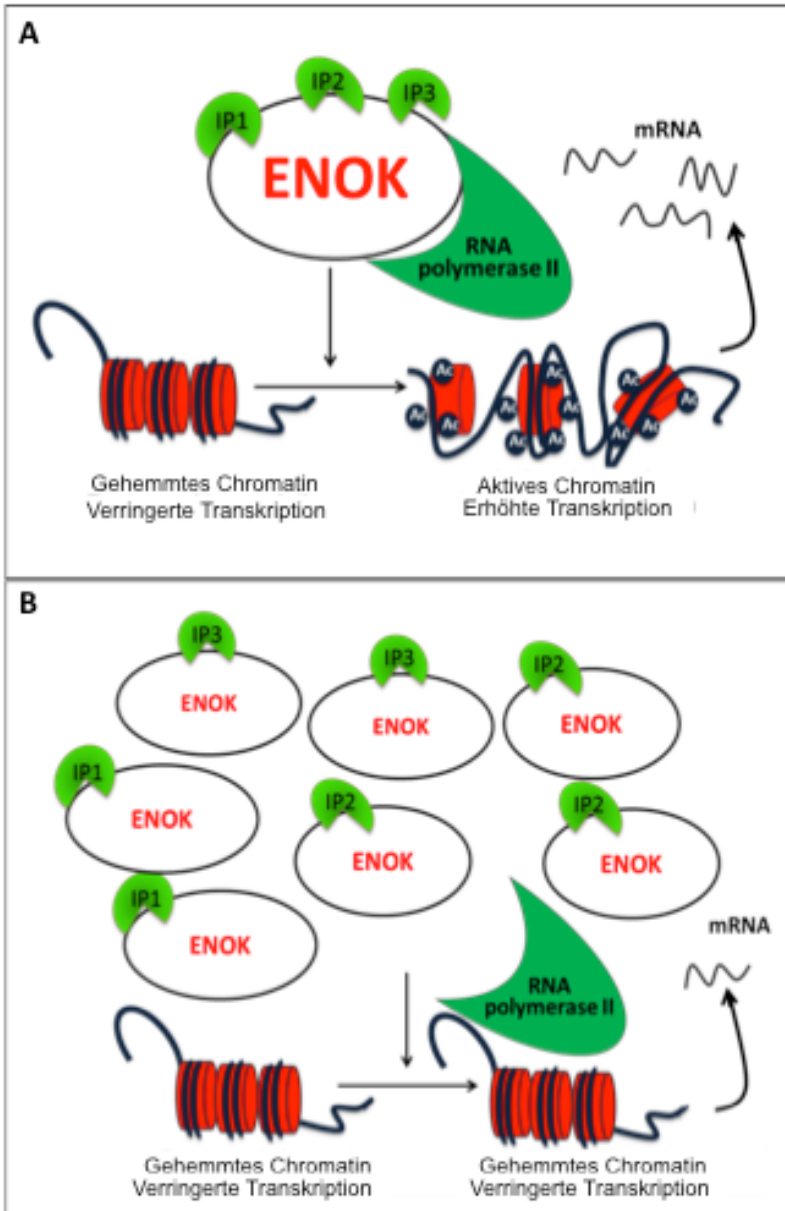


Abbildung 1.2: Genaktivität wird durch die Acetylierung der Histone reguliert.

Histon-Acetylierung wird durch Co-Aktivatoren (Interaktionspartner = IP1,2,3) vermittelt, welche auf die Histon-Acetyltransferase (ENOK) als katalytische Einheit angewiesen sind (A). Dadurch wird das Chromatin aufgelockert und der RNA Polymerase II der Zugang zu den Zielgenen ermöglicht. Die Transkription kann verstärkt induziert werden. Im Fall einer Übersättigung von ENOK, welche durch eine Überexpression entsteht, kann kein Multiprotein-Komplex mehr gebildet werden. Das Chromatin bleibt gehemmt (B). Die Transkription der Zielgene bleibt unterdrückt (Theorie der Balance). (übernommen und modifiziert von Barnes et al., 2005)

Dieser Funktionsverlust spiegelt sich sowohl in den Phänotypen der *enok*-Deletionsmutanten, als auch der *enok*-Überexpression wider, denn die charakteristischen Merkmale der *enok*-Deletion in den *Drosophila* Larven (Zinke, 2003), wie die defekte Zellproliferation (Scott et al., 2001), die Fehlfunktion in der Nahrungsaufnahme, das Wanderverhalten und der Wachstumsarrest wurden auch in Tieren, in welchen *enok* überexprimiert wurde, beobachtet (Moderau, 2009). Dieser sehr charakteristische Phänotyp, welche als *rotkehlchen*- oder *enok*-Phänotyp bezeichnet und aufgrund der Fehlfunktion von Enok durch die fehlende Komplexbildung verursacht wird, scheint evolutiv konserviert zu sein. Mäuse, die homozygot

das hypomorphe gene-trap Allel von KAT6B tragen, zeigten ebenfalls einen als „Gedeihstörung“ bekannten Phänotyp (Thomas et al., 2000; Kraft et al., 2011). Die Auswirkungen der Mutation waren Reduktion der Muskel- und Körperfett-Masse, eine gestörte Nahrungsaufnahme und eine Reduktion der Gehirngröße (Abb. 1.3).

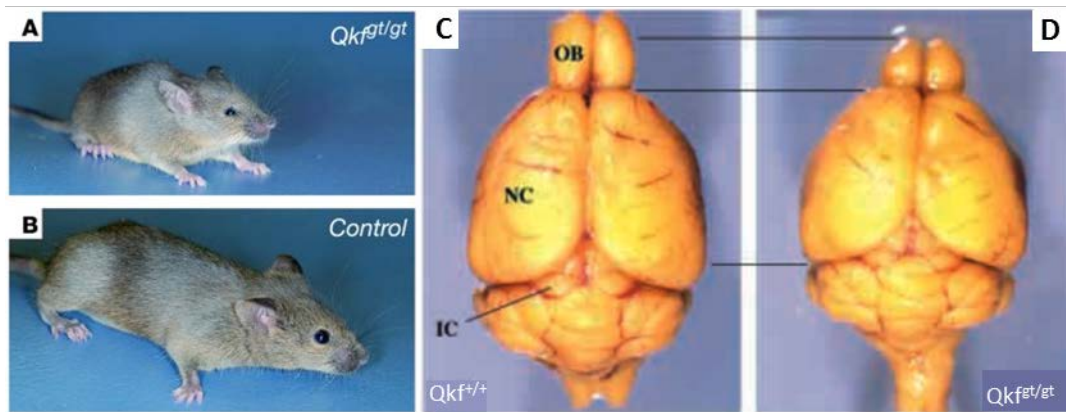


Abbildung 1.3: Phänotyp der homozygoten *querkopf*-Mutante.

Vergleich der äußeren Erscheinung der *querkopf*-Mutante (A) mit der Wildtyp-Kontrolle (Control) (B). Die Tiere sind sieben Wochen alte Wurfgeschwister. (übernommen von Kraft et al., 2011) (C-D) Vergleich der Gehirne von *querkopf*-Mutante $Qkf^{gt/gt}$ und Wildtyp-Kontrolle $Qkf^{+/+}$. Die Riechkolben (OB) und der Neokortex (NC) sind verkleinert. Die unteren Hügelchen (IC) treffen nicht aufeinander. IC inferior colliculi; NC neocortex; OB olfactory bulbs. (übernommen von Thomas et al., 2000).

Ähnlich wie in *Drosophila* (Scott et al., 2001) wird *Querkopf* eine Funktion in den neuronalen Stammzellen (NSZ) zugeschrieben, denn es ist für die Multipotenz der NSZ in der Subventrikulären Zone (SVZ) für die lebenslange Produktion von Neuronen verantwortlich (Rietze et al., 2001; Merson et al., 2006; Sheikh et al., 2012). Zusätzlich zu dieser funktionellen Homologie zwischen der Fruchtfliege und Maus war die pathologische Analyse der Patienten, welche eine mit KAT6B verbundene Mutation in sich trugen, ähnlich. Auch hier scheint KAT6B MORF eine wichtige Rolle in der Regulation der Wachstums- und Entwicklungskontrolle zu haben (Kraft et al., 2011; Campeau et al., 2012; Simpson et al., 2012). Der in Maus durch die *Querkopf* Mutation verursachte Phänotyp ähnelt am meisten dem kürzlich beschriebenen Noonan-like-Syndrom. Die Patienten zeigen aufgrund des hyperaktiven MAPK-Signalweges, welcher durch die Zerstörung von MORF verursacht wird, neben diversen Gesichtsanomalien, postnatale Wachstumsreduktion, globale Entwicklungsstörungen und Verminderung kognitiver Fähigkeiten (Kraft et al., 2011). Weitere Mutationen, die in dem KAT6B Locus identifiziert wurden, verursachten weitere Krankheitsbilder, welche zusätzlich zu den oben genannten Symptomen Nahrungsaufnahmedefekte und Atmungsprobleme aufwiesen (Armstrong und Clarke, 2002; Clayton-Smith et al., 2011; Campeau et al., 2012; Day et al., 2008).

Zusammenfassend kann man sagen, dass sowohl die Domänenstruktur von Enok, als auch die Funktion der Zellproliferationskontrolle, Wachstumsregulation und Nahrungsaufnahme konserviert sind, und die Analyse von Enok möglicherweise bei den Krankheitsaufklärungen helfen kann.

1.2 Fettkörper als Regulator des systemischen Wachstums und Lipidmetabolismus

In Säugetieren spielt das Fettgewebe und die Leber eine wichtige Rolle bei der hormonellen Regulation des Wachstums und des Energiemetabolismus (Ahima und Osei, 2008; Butler und Le Roith, 2001). Zum Beispiel sezerniert das Fettgewebe Hormone, wie Leptin, welches den Appetit kontrolliert, und Adiponektin, welches den Glucose- und Lipid- Metabolismus reguliert (Hietakangas und Cohen, 2009). Das *Drosophila* Äquivalent zu diesem Gewebe ist der Fettkörper, welcher sich entlang der Körperlinie befindet. Die zentrale Aufgabe des Fettkörpers besteht ebenfalls darin das Wachstum des Organismus zu kontrollieren, wie anhand der nicht-autonomen Kontrolle des Wachstums der larvalen Imaginal-Scheiben, die in Kultur gehalten wurden, gezeigt wurde (Davis und Shearn, 1977).

Damit zusammenhängend ist eine zweite wichtige Aufgabe des Fettkörpers zu beachten: die Koordination des Lipid-Metabolismus, bestehend aus der Aufnahme, Aufbewahrung, Synthese, Modifikation und Degradation von Lipiden (Gibbons et al., 2000; Lee et al., 2003; Yu et al., 2003; Gutierrez et al., 2007). Diese Anpassungen sind notwendig um ein adäquates Wachstum zu ermöglichen. Besonders in Zeiten der Mangelernährung ist es der Fettkörper, der es durch seine regulativen Fähigkeiten dem Körper ermöglicht weiter zu wachsen und die Hungerperiode zu überleben, indem er seine Reserven mobilisiert und Energie liefert. Nahrungsknappheit stimuliert in diesem Fall die Mobilisierung der Fettsäuren, indem die Lipolyse der Triglycerid (TAG)-Speicher aktiviert wird. Bei dieser hydrolytischen Spaltung durch Lipasen entstehen unter anderem freie Fettsäuren. Die Fettsäuren müssen zur Energiegewinnung aktiviert, in das Mitochondrium transportiert und dort zu Energie in Form von ATP umgewandelt werden. Dieser Prozess der β -Oxidation ist für die Energielieferung während der Hungerperiode verantwortlich. Zusätzlich entsteht nach den vier enzymatischen Schritten der β -Oxidation als Produkt Acetyl-CoA und eine um zwei C-Atome verkürzte Acyl-CoA Kette (Houten und Wanders, 2010) (Abb. 1.4). Das mitochondrielle Acetyl-CoA ist essenziell für die Produktion von Energie, für das Überleben und Wachstum von eukaryotischen Zellen (Lehninger et al., 1993). Ebenfalls wird Acetyl-CoA für die Acetylierung von Lysin-Resten vieler Proteine benutzt, da diese posttranslationalen Modifikationen oft der Schlüssel zur Stabilität und Funktion sind (Zhao et al., 2010; Lee et al., 2011). Da die Kernhülle für Acetate, Citrat und sogar Acetyl-CoA permeabel ist, wird für die Histon-Acetylierung nur strikt das nukleozytosolische Acetyl-CoA benutzt (Paine et al., 1975; Son et al., 2011; Takahashi et al., 2006; Wellen et al., 2009).

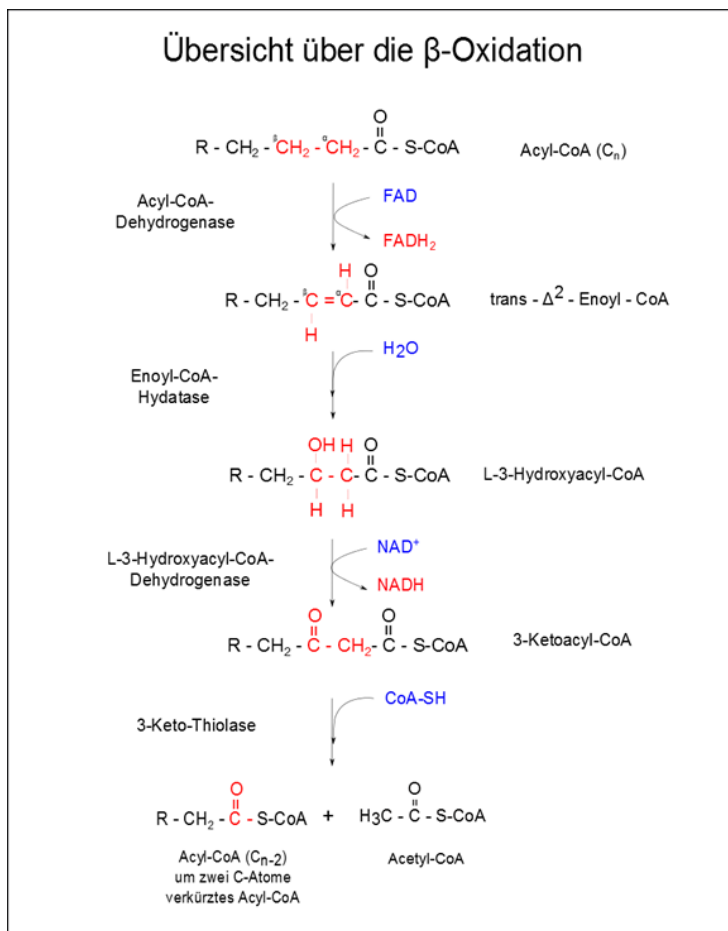


Abbildung 1.4: Übersicht über die β -Oxidation.

Die β -Oxidation besteht aus vier Schritten. Am Ende des Zyklus werden ein Acetyl-CoA und ein um zwei Kohlenstoffatome verkürztes Acyl-CoA gebildet. (übernommen von NawiPro.de)

Dabei wurde bereits beschrieben, dass das Gen ATP-Citrat-Lyase (ATPCL), welches an der Umwandlung des mitochondrialen Citrats zu Acetyl-CoA beteiligt ist, durch seine Funktion den Metabolismus und die Histon-Acetylierung miteinander verbindet (Wellen et al., 2009). In der Hefe wurde bereits die Frage beantwortet, wie das Acetyl-CoA das Wachstum und die Proliferation fördert. Cai und Kollegen (2011) haben gezeigt, dass durch erhöhte Level des intrazellulären Acetyl-CoA, der Histon-Acetyltransferase-Komplex SAGA (Apt-Ada-Gcn5-Acetyltransferase) aktiviert wird und die Acetylierung der Histone an Genen, welche Wachstum vermitteln, drastisch erhöht. Hier wurde eine direkte Verbindung zwischen Metabolismus, Histon-Acetyltransferase und Wachstum gezeigt.

Neben der β -Oxidation in dem Fettkörper selbst, können die durch die Lipolyse freigewordenen Fettsäuren in großen Mengen zu den Oenozysten transportiert werden. Diese postmitotischen, metabolisch aktiven Zellen können, ähnlich wie Hepatozyten in der Leber, Fettsäuren zu Ketokörpern oxidieren. Die Ketogenese ist ein wichtiger Lieferant von Energie während Hungerperioden (Gutierrez et al., 2007). Die Ergebnisse dieser Studie zeigen, die Neutrallipide in den Oenozysten während proteinreicher Ernährung kaum detektierbar sind. Während Hungerperioden werden TAGs mobilisiert, aus dem Fettkörper in die Oenozysten transportiert und dort akkumuliert (Abb. 1.5). Bei einem Verlust der Oenozysten werden das Wachstum und die Nahrungsaufnahme gestoppt (Schlegel und Stainier, 2007). Diese Tiere zeigten zusätzlich das auch in *enok*-Mutanten beschriebene Wanderverhalten (Gutierrez et al., 2007).

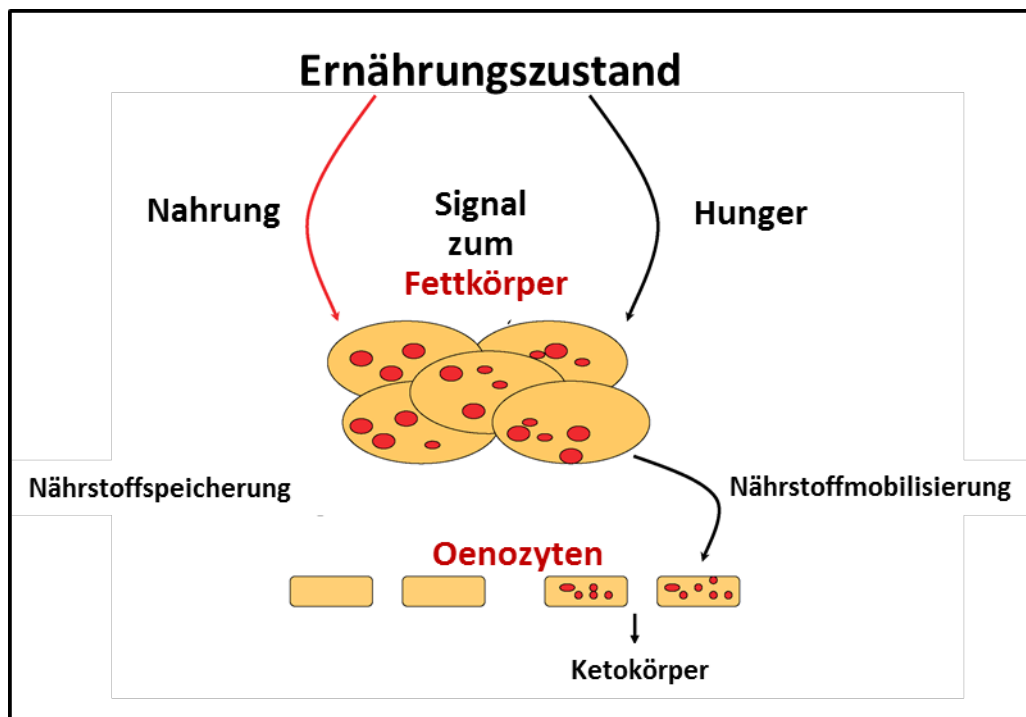


Abbildung 1.5: Mobilisierung der Lipide ist abhängig vom Ernährungszustand.

Bei Nahrung wird ein Signal gesendet, welches Nährstoffspeicherung im Fettkörper veranlasst. Während des Nahrungsentzuges wird die Freilassung der Lipide aus dem Fettkörper gefördert. Diese werden in den Oenozyten gespeichert (rote Kreise) und verstoffwechselt. Dabei entstehen Ketokörper, die in die Hämolymphe entlassen werden und dort als Energielieferant bis zur nächsten Nahrungsaufnahme zur Verfügung stehen. (übernommen von Schlegel und Stainier, 2007).

Eine weitere Funktion der Oenozyten besagt, dass sie für die Herstellung der sehr langkettigen Fettsäuren (very long chain fatty acid=VLCFA) verantwortlich sind und diese daraufhin fernlenkend die Wasserabdichtung des respiratorischen Systems kontrollieren (Parvy et al., 2012).

Der Transport der aufgenommenen und neusynthetisierten Lipide wird von den Lipoproteinen innerhalb des Körpers übernommen (Abb.1.6). Das am häufigsten detektierte Lipoprotein in *Drosophila* und anderen Insekten ist das Lipophorin (LPP). Dieses Protein ist dem Säugetier-Lipoprotein Apolipoprotein (apoLPP) aus der ApoB Familie, welche im gesamten Tierreich konserviert ist am ähnlichsten (Smolenaars et al., 2007). Der dazugehörige Lipoprotein low-density lipoprotein (LDL) Rezeptor ist ebenfalls in *Drosophila* zu finden und besteht dort aus den zwei homologen Lipoprotein Rezeptor 1 und 2 (LpR). Sie vermitteln die LPP Internalisation in das Zielgewebe (Palm et al., 2012). In Abbildung 1.6 sind die *Drosophila* Lipoproteine und ihre Transferwege gezeigt. Der Fettkörper ist der Transkriptionsort aller Lipoproteine, nämlich vom Microsomal Triglyceride Transfer Protein (MTP), Lipid Transfer Protein (LTP) und LPP. Sowohl LTP als auch LPP sind auf die Präsenz von MTP angewiesen, da im Fall eines Defektes von MTP die Zusammensetzung aus den Vorläufern ApoLTP und ApoLPP nicht stattfindet. Dadurch ist der Transfer der Lipide unterbrochen. Beide Transportmoleküle

verbleiben im Fettkörper und die Hämolyph-LTP und -LPP Level sind stark reduziert (Palm et al., 2012). Bei einem funktionierenden Transport müssen LPP und LTP zusammenarbeiten. Dabei fördert LTP die Beladung von LPP mit Lipiden. LPP ist der Hauptlipidträger in der Hämolymphe und mobilisiert die Lipide aus dem Darm und transportiert sie zum Zielgewebe, wie zum Beispiel zum Fettkörper, zu den Imaginalscheiben, zum Gehirn (Palm et al., 2012) und möglicherweise auch zu den Oenozysten, da die Oenozysten eine sehr stark Expression des LpR1 aufweisen (Gutierrez et al., 2007).

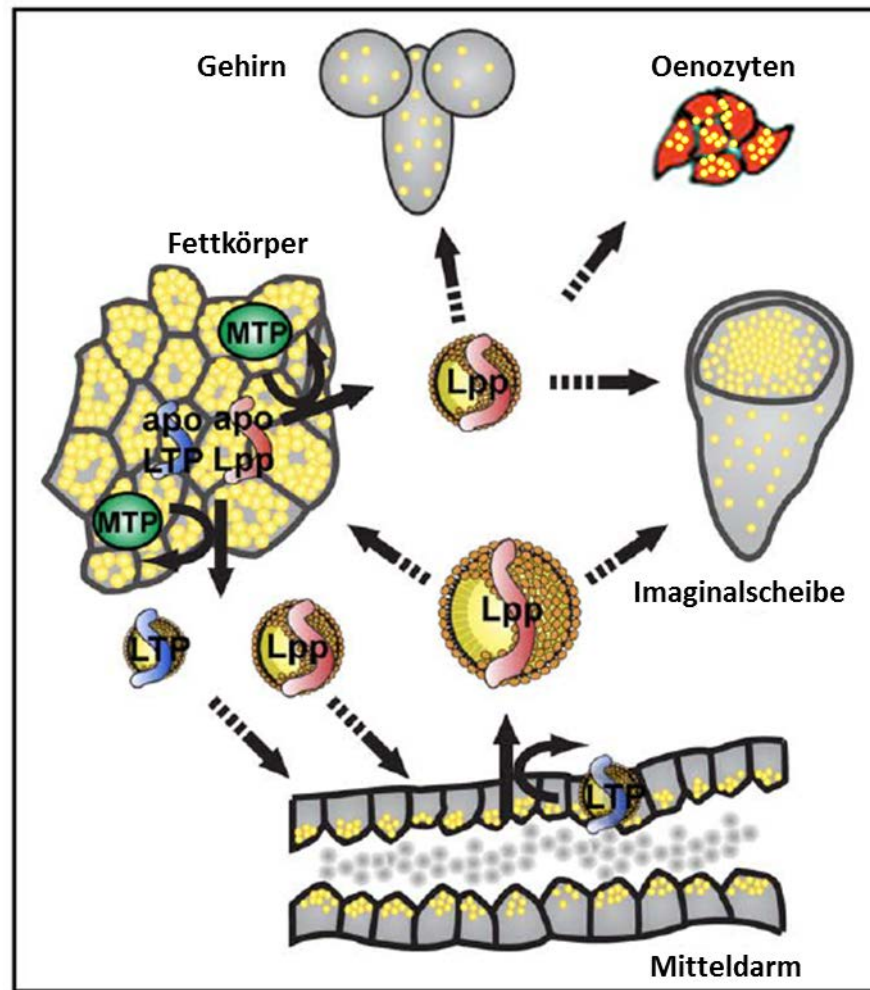


Abbildung 1.6: *Drosophila* Lipoproteine und Lipidtransfer zwischen den Geweben.

Im Fettkörper werden in Abhängigkeit von MTP die Lipoproteine der apoB-Familie LTP und Lpp zusammengesetzt. Anschließend werden Lpp und LTP zum Mitteldarm rekrutiert, wo LTP-vermittelte Beladung von Lpp mit Lipiden stattfindet. Lpp, als Hauptträger der Lipide in der Hämolymphe, transportiert die Lipide vom Fettkörper und Mitteldarm zu anderen Geweben. Lpp, Lipophorin; LTP, Lipid Transfer Protein; MTP, Microsomal Triglyceride Transfer Protein. (übernommen und modifiziert von Palm et al, 2012).

1.3 Wahrnehmung der Nährstoffe (Nutrient Sensing)

Zusätzlich zu der offensichtlichen Aufgabe des Fettkörpers die Lipide zu speichern und in Zeiten des Hungerns abzubauen, spielt er auch eine Rolle in der systemischen Wahrnehmung der Nährstoffhomöostase und der Wachstumsregulation. Die Frage, wie der Fettkörper das Wachstum des peripheren Gewebes reguliert, wurde zum Teil beantwortet: während eines genetischen Screens nach Faktoren, die Wachstum beeinflussen, wurde der Aminosäuretransporter *slimfast* identifiziert. Bei einer Herunterregulation von *slimfast* speziell im Fettkörper wurde ein globaler Wachstumsdefekt erzeugt und abnormal kleine Tiere beobachtet. Dasselbe passiert, wenn *Drosophila* Larven auf einem Mangelmedium aufgezogen werden (Colombani et al., 2003). Die gewebespezifische Reduktion von *slimfast* verursacht einen Wachstumsdefekt im gesamten Körper und zeigt dadurch, dass der Fettkörper das Wachstum bei einer Verminderung der Aminosäuren systemisch verlangsamt. Die Signalverarbeitung im Fettkörper wird durch den Target of Rapamycin (TOR)-Signalweg übernommen, welcher bereits als ein wichtiger Regulator in der Nährstoffsignalverarbeitung in *Drosophila* identifiziert wurde (Oldham et al., 2000; Zhang et al., 2000). Die Funktionsverlustmutation von TOR im Fettkörper kopiert den durch *slimfast* verursachten Phänotyp. Bei einer negativen Beeinträchtigung von TOR und einer gleichzeitigen Induktion des downstream (stromabwärts) Ziels des TOR-Signalweges S6 Kinase (S6K) konnte der Wachstumsdefekt teilweise gerettet werden (Colombani et al., 2003). Durch Slimfast und TOR-Signalweg kann der Fettkörper den Aminosäure-Spiegel überwachen und fernlenkend Wachstum und Entwicklung kontrollieren (Tennessee und Thummel, 2011). Durch den Verlust von TOR im Fettkörper wird im restlichen Gewebe der Phosphoinositol 3 Kinase (PI3K)/AKT – Signalweg reduziert. Dies schafft eine physiologische Verbindung zwischen dem TOR-Signalweg und der Kontrolle der Ausschüttung von Insulin-ähnlichen Peptiden in *Drosophila*, die für das Wachstum verantwortlich sind. Von den acht existierenden *Drosophila* Insulin-like Peptides (Dilps) werden drei (Dilp2, 3 und 5) aus neurosekretorischen Zellen (NSZ) im Gehirn im Fall der Aktivierung des TOR-Signalweges durch Aminosäurezufuhr im Fettkörper in die Hämolymphe ausgeschüttet (Geminard et al., 2009). Die Dilps binden an den Insulinrezeptor und aktivieren den PI3K/AKT-Signalweg in den Zielzellen (Grewal, 2009; Teلمان, 2009) und damit auch systemisch das Wachstum. Welches Signal von Fettkörper zum Gehirn ausgesandt wird, um die Dilp Ausschüttung zu bewirken, ist bis jetzt weitestgehend unbekannt. Es wird allgemein als das fettkörperentstandene systemische Signal (fat body-derived systemic signal=FDS) bezeichnet und könnte ähnlich wie bei Säugetieren ein mehrfaches Signal sein, welches je nach Gelegenheit eine Kombination aus Signallipiden oder Peptidhormonen sein könnte (Ables und Drummond-Barbosa, 2011) (Abb. 1.7).

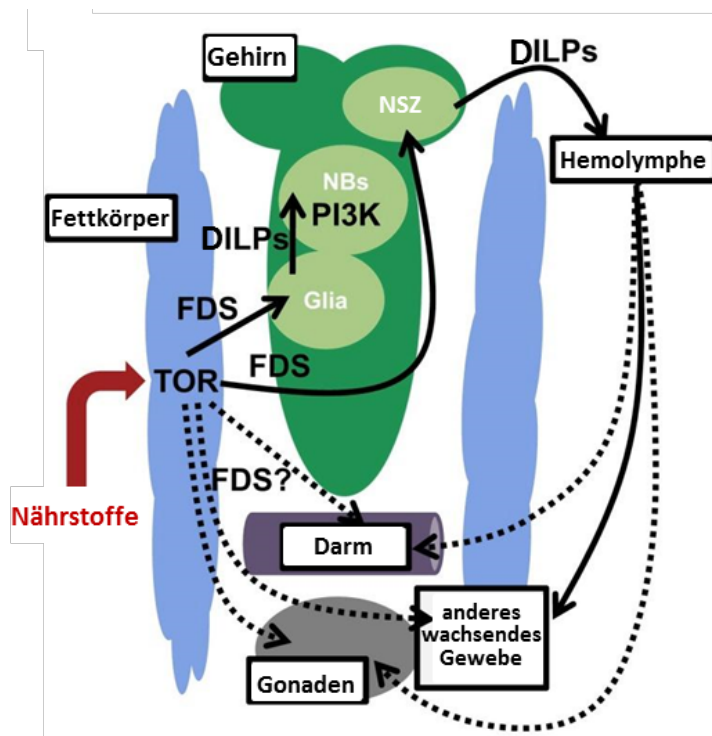


Abbildung 1.7: Interorgan-Kommunikation in der *Drosophila* Larve.

In der Larve wird im Fettkörper über die Aktivierung des TOR-Signalweges der Nährstoffzustand wahrgenommen. Anschließend wird über ein bis jetzt unbekanntes aus dem Fettkörper sezerniertes Signal (FDS) die Dilp-Expression in Glia Zellen aktiviert. Diese Dilps kontrollieren die Reaktivierung der benachbarten Neuroblasten über den Insulin/PI3K/TOR-Signalweg. Dasselbe oder ein anderes FDS aktiviert die Ausschüttung der Dilps aus den neurosekretorischen Zellen. Die freien Dilps in der Hämolymphe kontrollieren den Insulin/PI3K/TOR-Signalweg ihrerseits in der Peripherie. Dilps, *Drosophila* insulin-like peptides; FDS, fat body-derived signal, NBs, Neuroblasten; NSZ neurosekretorische Zellen. (übernommen von Ables und Drummond-Barbosa, 2011).

1.4 Vom Fettkörper zum Gehirn

Der Fettkörper übernimmt die Funktion der Verbindungseinheit zwischen Nährstoffhomöostase, Metabolismus und systemischer Wachstumskontrolle. Die Kommunikation erfolgt durch das Senden eines oder mehrerer Signale. Eines der wichtigsten Organe, welches neben dem Darm und den Fortpflanzungsorganen dieses Signal empfangen, ist das Gehirn. Das Gehirn reguliert daraufhin nicht nur das Wachstum innerhalb des Körpers in der Peripherie durch das Ausschütten oder Zurückhalten von Dilps (Geminard et al., 2009), sondern auch das Fressverhalten und die Proliferation der neuronalen Stammzellen innerhalb des Gehirns selbst (Abb. 1.7).

Der eigentliche Auslöser der Dilp-Sekretion aus den insulinproduzierenden Zellen (insulin producing cells=IPCs) ist immer der Nährstoffstatus. Nach der Prozessierung dieses Signals sendet der Fettkörper die Information an das Gehirn. In adulten Fliegen wurde eines dieser möglichen Signale untersucht und als Leptin-ähnliches Molekül identifiziert. Das *Drosophila* Cytokin Unpaired2 (Upd2) ist ein sezernierter Faktor, welcher im Fettkörper in Abhängigkeit vom Ernährungszustand produziert wird, ähnlich wie das in Wirbeltieren aus dem adipösen Gewebe sezernierte Leptin (Zhang et al., 1994). Upd2 ermöglicht indirekt über die Aktivierung des Janus Kinase / (JAK)/Signal Transducer and Activator of Transcription (STAT) Signalweges in GABAergen Neuronen die Ausschüttung der Dilps aus den IPCs (Rajan und Perrimon, 2012).

Ein weiterer Botenstoff, welchen der Fettkörper sezerniert und welcher einen Einfluss auf die

Ausschüttung von Dilps aus den IPCs in adulten Fliegen hat, ist das Dilp6. In diesem Fall existiert ein Feedback-Loop zwischen den einzelnen Dilps, der zur Lebensverlängerung führt. Dabei werden durch Dilp6 die Transkriptlevel von *dilp2* und *5* reprimiert und dadurch die zirkulierenden Level des Dilp2 in der Hämolymphe reduziert (Bai et al., 2012).

Eine zusätzliche Funktion des Fettkörpers liegt in der Kontrolle der Proliferation der neuronalen Stammzellen. Experimente, in denen gleichzeitig Fettkörper und Gehirn co-kultiviert wurden, zeigten, dass die Reaktivierung der Teilung von Neuroblasten (*Drosophila* neuronalen Stammzellen) im Gehirn von dem Ernährungszustand abhing (Chell und Brand, 2010 und Sousa-Nunes et al., 2011). Beide Studien demonstrierten, dass durch ein unbekanntes Signal aus dem Fettkörper die Produktion von Dilp6 und möglicherweise Dilp2 in Glia Zellen kontrolliert wird und sie daraufhin das Wachstum und die Proliferation der benachbarten Neuroblasten steuern.

1.5 Funktion von Glia Zellen in der Neuroblasten-Entwicklung

Im sich entwickelnden zentralen Nervensystem (ZNS) von *Drosophila* durchleben Stammzellen, die Neuroblasten genannt werden, eine embryonale und larvale Phase der Proliferation. Diese Phasen werden durch einen Ruhezustand in den ersten 24 Stunden nach dem Schlüpfen voneinander getrennt. Der Ruhezustand der Neuroblasten kann durch die Zufuhr von Aminosäuren aufgehoben werden (Britton und Edgar, 1998). Diese multipotenten Zellen entstehen aus ektodermalen Epithelzellen. Sie durchlaufen mehrere asymmetrische Selbsterneuerungsteilungen (Knoblich, 2008; Chia et al., 2008; Doe, 2008), bei welchen ein Neuroblast und ein Zwischenvorläufer entsteht, der Ganglion Mutterzelle (ganglion mother cell=GMZ) genannt wird. Weiterhin teilt sich die GMZ nur noch ein weiteres Mal und produziert zwei postmitotische Zellen, die entweder Neuronen oder Glia Zellen sein können (Sousa-Nunes et al., 2010). Die Reaktivierung der Neuroblastenteilung erfolgt nach einem Nährstoffstimulus. Dieses Signal wird mittels Dilp6-Ausschüttung durch die Glia Zellen reguliert. Die Neuroblasten sind auf Aktivierung des Insulinrezeptor (InR)/PI3K-Signalwegs angewiesen, um der Stilllegung zu entkommen (Abb. 1.8).

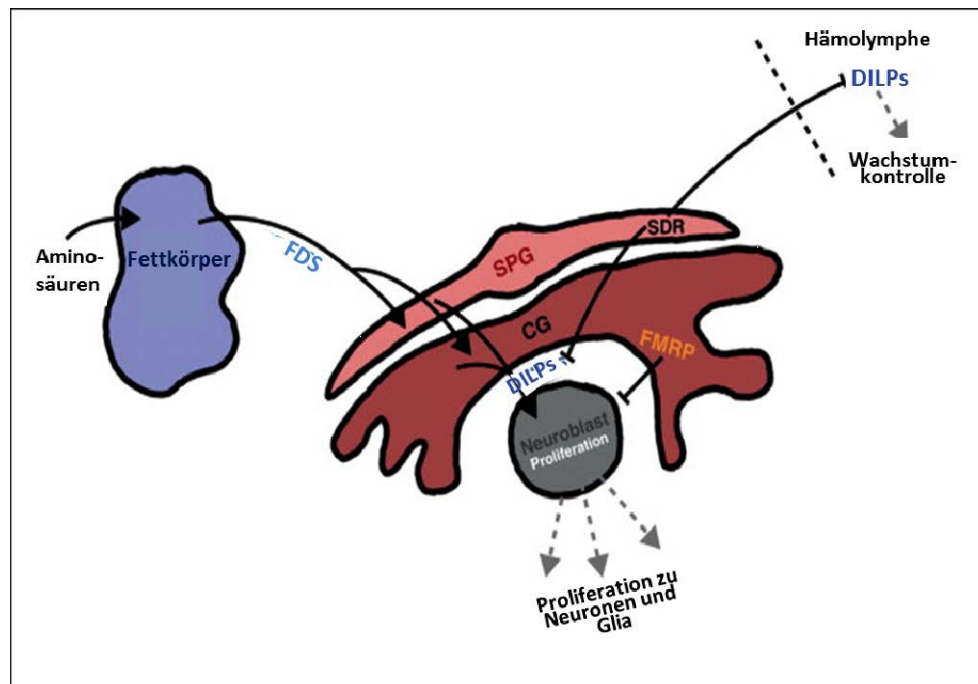


Abbildung 1.8: Glia-abhängige Kontrolle der Neuroblastenreaktivierung und des Wachstums.

Anschließend an die aminosäure-abhängige Aktivierung des Fettkörpers, entlässt dieser ein FDS zu den Glia Zellen, welche daraufhin Dilp6 freilassen und die Neuroblasten reaktivieren. Diese teilen sich dann zu Neuronen oder Glia Zellen. Die Subperineurale Glia (SPG) sezerniert den Faktor secreted decoy of insulin receptor (SDR). Durch SDR kann SPG ebenfalls die Neuroblastenproliferation oder das Körperwachstum kontrollieren, indem es die Dilps im Gehirn und der Hämolymphe blockiert. Das Fragile X Mental Retardation 1 Protein (FMRP) Signal kann nicht-autonom von den Glia Zellen her die Neuroblastenproliferation hemmen. CG, Cortex Glia. (übernommen von Coutinho-Budd und Freeman, 2013).

Durch diese wichtige Aufgabe der Glia Zellen in der Proliferation der Neuroblasten und in der Gehirnentwicklung, wird die Glia Zelle zu mehr als nur zur reinen Beihilfe der Neurone (Coutinho-Budd und Freeman, 2013).

Die Glia selbst besteht aus mehreren morphologischen und funktionellen Subtypen (Abb. 1.9). Zu diesen gehören die Perineural Glia und die Subperineural Glia, die die Blut-Hirn-Schranke bilden (Stork et al., 2008). Die Cortex Glia ummantelt die Somata der Neurone und versorgt diese unter anderem mit Nährstoffen, bestimmt den Zeitpunkt der Proliferation der Neuroblasten und übernimmt viele weitere Aufgaben. Zwei weitere Typen der Glia Zellen sind im Neuropil zu finden. Die Umhüllende Glia (ensheathing glia) trennt die Somata der Neurone von dem Neuropilfeld. Der zweite Zelltyp ist die Astrozyten Glia, welche das Neuropil, ähnlich wie bei den Säugetieren die Schwannschen Zellen, ummantelt (Hartenstein, 2011). Den neusten Erkenntnissen zur Folge übernimmt die Astrozyten Glia, während der Verpuppung die Aufgabe der Phagozytose, indem sie sich durch ein zell-autonomes und steroid-abhängiges Programm zu Phagozyten umwandelt und die Neuronenbruchstücke beseitigt (Tasdemir-Yilmaz und Freeman, 2014).

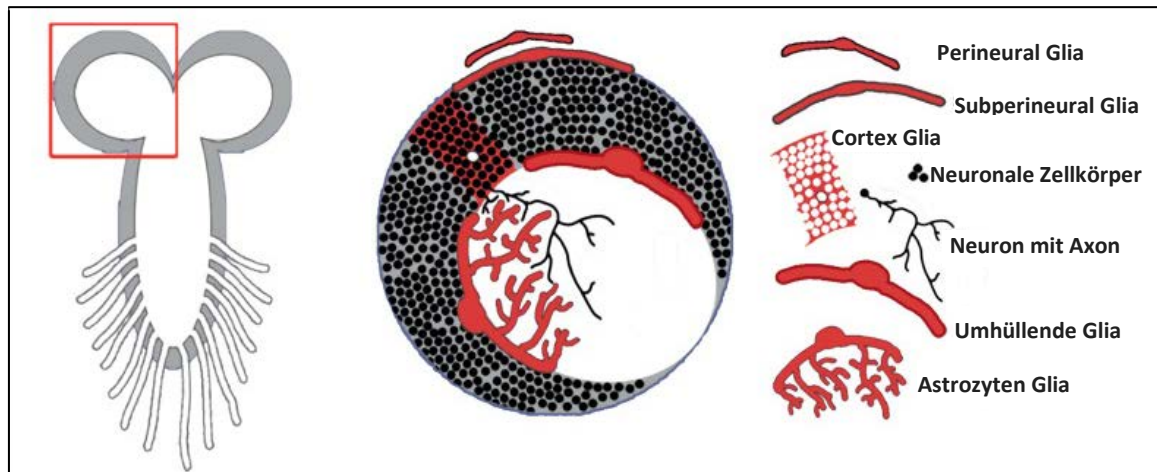


Abbildung 1.9: Variation und Komplexität der *Drosophila* Glia.

In der Übersichtszeichnung des zentralen larvalen Nervensystems ist mit dem roten Kasten die Position der Detailzeichnung dargestellt. In der Detailzeichnung sind die verschiedenen Arten der Glia, ihre Morphologie und Lokalisation in der Gehirnhemisphäre zu sehen. (übernommen von Coutinho-Budd und Freeman, 2013).

Bei der Neuroblastenreaktivierung spielt hauptsächlich die Cortex Glia die wichtigste Rolle, da sie die Neuroblasten ummantelt und das sezernierte Dilp6 direkt mit der kürzesten Distanz wirken kann, um den PI3K/AKT-Signalweg zu aktivieren. Durch ein weiteres Signal stammend aus der Cortex Glia wird ebenfalls die Aktivität von phosphoAKT (pAKT) reguliert, welches ein downstream Ziel von PI3K ist. Das Fragile X Mental Retardation 1 Protein (FMRP) wird für die negative Regulation der Neuroblastenteilung benötigt. Es inhibiert durch die Beeinflussung der pAKT Level den Insulinsignalweg in den Neuroblasten glia-abhängig und verhindert das vorzeitige Austreten der Neuroblasten aus der Stilllegung (Callan et al., 2012). Die Subperineural Glia kann ebenfalls das Wachstum systemisch beeinträchtigen, indem diese Zellen der Blut-Hirn-Schranke den Faktor secreted decoy of InR (SDR) direkt in die Hämolymphe ausschütten. SDR, welches den Insulinrezeptor imitiert, inhibiert Dilps in der Peripherie und damit den Insulinsignalweg der Zielzellen und damit deren Wachstum (Okamoto et al., 2013).

1.6 Zielsetzung

Die Zielsetzung dieser Arbeit war die Aufklärung der Funktion von Enoki mushroom (Enok) und einige Fragen bezüglich des Wachstums zu beantworten, sowie seine Funktion im Stoffwechsel zu zeigen. Nach den vorherigen Analysen (Zinke, 2003; Moderau, 2009) wurde vermutet, dass Enok eine wichtige Rolle in der Signalverarbeitung im Gehirn spielen muss, da es zusätzlich zum Wachstum und Metabolismus auch das Verhalten steuert. In dieser Arbeit sollte die autonome Aufgabe von Enok innerhalb einer Zelle analysiert und seine Funktion in der Homöostase innerhalb eines ganzen Organismus aufgeklärt werden. Auch wenn die

letzten Studien darauf hinweisen, dass die Signaltransduktion zwischen den Organen wichtig ist, müssen die Organe, die die Funktion ausüben, selbst entsprechend auf die ankommenden Signale adäquat reagieren und diese verarbeiten können. Wenn ein Protein die Verarbeitung dieses Signals bereits auf transkriptioneller Ebene unterbricht, kann die Weiterleitung nicht erfolgen. Dabei würde dann Enok als ein epigenetischer Faktor das Wachstum in der ersten Instanz der transkriptionellen Regulation kontrollieren. Diese globale Funktion von Enok und deren Auswirkungen galt es in dieser Arbeit zu zeigen.

2. Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Verbrauchsmaterial

Material	Bezugsquelle
Allgemeiner Laborbedarf	Faust, Meckenheim, Hartenstein
Formaldehyd 37 %	Merck, Darmstadt
Nitrocellulose Membrane	Amersham, Buckinghamshire
Novex 4-12 % Bis-Tris Gel	Life Technologies, Carlsbad
Objektträger und Deckgläser	Roth, Karlsruhe
PCR Reaktionsgefäße	Sarstedt, Nümbrecht
Plastikwaren	Roth, Karlsruhe; Greiner, Solingen; Corning, New York
Precylles-Auflösungsgefäße	Paqlab, Erlangen
Reaktionsgefäße 1.5 / 2 ml	Eppendorf, Hamburg
<i>RealTime</i> PCR-Platten	BioRad, Hercules (USA)
Rinderserum-Albumin (BSA)	NEB, Frankfurt
Serologische Pipetten; 5-, 10- und 25ml	Greiner, Bonn
Silica Gel Orange	Roth, Karlsruhe
Zellkultur Platten	Corning, New York
Zellsiebe	BD, Falcon
Ziegen Serum	Life Technologies, Carlsbad

2.1.2 Chemikalien

Soweit nicht anders angegeben wurde, waren alle Verbrauchskemikalien, die in dieser Arbeit benutzt wurden, von der Qualität *pro analysis* und wurden von folgenden Firmen bezogen: Merck Euro Lab, Lohmar; Roth, Karlsruhe und Sigma-Aldrich, Steinheim.

Für diese Arbeit besonders relevante chemische Farbstoffe:

Material	Bezugsquelle
Carmin	Sigma, Saint Louis, Missouri, USA
Coomassie/Brilliant Blue	Roth, Karlsruhe
NILE RED	Sigma, Saint Louis, Missouri, USA
Oil Red O	Roth, Karlsruhe

2.1.3 Lösungen und Medien

Alle Puffer, Lösungen und Medien wurden, falls nicht anders angegeben, mit doppelt deionisiertem und autoklaviertem Wasser (ddH₂O) hergestellt. Der pH ist, wenn nicht anders angegeben, mit NaOH oder HCl eingestellt worden. Bei Lösungen, die als konzentrierte Stammlösung angesetzt wurden, ist der Konzentrationsfaktor angegeben. Bei Lösungen, die nicht bei Raumtemperatur aufbewahrt wurden, ist die Lagertemperatur angegeben. Die Prozentangaben stehen für Masse durch Volumen.

Name	Zusammensetzung
Agarose	1-2% Agarose in TAE
Ampicillin-Lösung	50µg/ml (-20 °C)
Apfelsaftagar	2,1% Agar, 25% Apfelsaft, 2,5% Saccharose, 10mM Nipagin, 1% Ethanol
Blockierlösung	5% Magermilchpulver in 1x TBST
Carminrot	1 % Carmin in PBS
Coomassie-Brilliant-Blau-Färbelösung	0,2 % Coomassie-Brilliant-Blau R250, 50 % Methanol, 7,5 % Essigsäure
DNA-Ladepuffer (5x)	0,1% Bromphenolblau, 0,1% Xylen Cyanol FF, 30% Glycerin 0,5M
EDTA	EDTA, pH 8,0
Fixierungslösung (larvale Gewebe)	1-4% Formaldehyd (methanolfrei) in PBS (4 °C)
Fliegenfutter (1,5 l)	1,33 l H ₂ O, 16,5 g Bierhefe, 81,5 g Maismehl, 8 g Fadenagar, 100 ml Zuckerrübensirup, 200 ml 10% Nipagin (in 100 % Ethanol gelöst)
Injektionspuffer	5mMKCl, 0,1mM Phosphatpuffer pH6,8
LB-Agar	1,5 % Agar in LB-Medium
LB-Medium (Luria Bertani Medium)	171 mM NaCl, 1 % Pepton 140, 0,5 % Hefeextrakt
Lithiumchlorid	4M LiCl (-20 °C)

MESAB	40mg 3-aminobenzoessäure-ethylester, 100mg Na ₂ HPO ₄ , 10 ml H ₂ O
Mops Puffer (20x pH7,0)	400mM Mops, 100mM NaAc, 10mM EDTA, in DEPC A.bidest (lichtgeschützt und autoklaviert)
Mowiol-Einbettmedium	12ml Glycerin, 9,6g Mowiol 40-88, 24ml H ₂ O, 48ml 0,2M TrisHCl, pH 8,5
NILE RED Stock	0,1% NILE RED in Isopropanol
Oil Red O Stock	0,1% Oil Red O in Isopropanol
PBS 20x	2,6 M NaCl, 140 mM Na ₂ HPO ₄ , 60 mM NaH ₂ PO ₄
PBT 0,1	0,1 % Triton X-100 in PBS (4°C)
PBT 0,5	0,5 % Triton X-100 in PBS (4°C)
Ringer Lösung	182mM KCl, 46mM NaCl, 3mM CaCl ₂ , 10mM Tris
RIPA Puffer	150 mM NaCl, 1 % IPEGAL CA-630, 0.5 % Natrium-Deoxycholat, 0.1 % SDS, 50 mM Tris-HCl (pH 8.0)
Rote Hefesuspension	1ml Carminrot in 40 g Frischhefe
S2 Vollmedium	S2 Medium, 10% FCS, 1 % Penicillin/Streptomycin
SDS-PAGE Ladepuffer 5x	100 mM Tris, 3% SDS, 10% Glycerol, 0.1% Bromphenolblau, 2 % β-Mercaptoethanol (pH 6.8)
SDS-PAGE Laufpuffer10x	250 mM Tris/HCl, 1.92 M Glycine, 1 % SDS
TAE-Puffer	40 mM Tris-Acetate (pH 8.0), 1 mM EDTA
TBST	0,01 M Tris/HCl (pH 7.5), 0,15 M NaCl, 0.05 % Tween 20
TE-Puffer	10 mM Tris, pH 8,0, 1 mM EDTA
TELT-Puffer	50 mM Tris, pH 8,0, 62,5 mM EDTA, 2,5 M LiCl, 0,4 % Triton X-100
Transfer-Puffer (4 °C)	25 mM Tris, 150 mM Glycine, 10 % Methanol

2.1.4 Enzyme

Name	Bezugsquelle
GoTaq Polymerase	Promega ,Mannheim
Lysozym	Sigma, Saint Louis, Missouri, USA
Restriktionendonucleasen	NEB, Frankfurt
T4-DNA-Ligase	NEB, Frankfurt
Cellfectin	Life Technologies, Carlsbad
KOD Polymerase	Novagen

2.1.5 Kits und Standards

Bezeichnung	Hersteller/Bezugsquelle
BCA Protein Assay	Pierce, Rockford
ECL Western Blotting Substrate	Pierce, Rockford
GeneRuler,DNA Ladder Mix ready-to-use	Thermo Fisher Scientific, Waltham
PureLink™ HiPure Plasmid Filter Purification Kit	Life Technologies, Carlsbad
NucleoSpin Extract II	Macherey-Nagel, Düren
NucleoSpin RNA XS	Macherey-Nagel
NucleoSpin® RNA II	Macherey-Nagel, Düren
Precision Plus Protein All Blue Standard	Biorad, Hercules
QuantiTect, Reverse Transcription Kit	Qiagen, Hilden
SensiMix SYBR No-ROX Kit	Bioline, Luckenwalde
SYBR® Safe DNA gel stain (10mg/ml)	Life Technologies, Carlsbad
TOPO TA Cloning Kit	Life Technologies, Carlsbad

2.1.6 Antikörper

2.1.6.1 primäre Antikörper

Antikörper	Konzentration	Wirt	Bezugsquelle
α-acH3K9	1:300	Mouse (m)	Santa Cruz, Dallas/Geschenk Hoch Lab
α-acLys	1:300	Rabbit (rb)	Cell Signaling, Danvers
α-Asense	1:300	Rabbit (rb)	Geschenk Hoch Lab
α-Dilp2	1:500	Guinea pig (gp)	Laborintern
α-Elav	1:1000	Mouse (m)	DSHB, Iowa City
α-Enok	1:50	Rat (r)	Laborintern
α-FLAG	1:300	Mouse (m)	Sigma, int Louis, Missouri, USA
α-GFP	1:1000	Chicken (ch)	Abcam, Cambridge
α-HA	1:200	Rat (r)	Roche, Indianapolis/Geschenk Hoch Lab
α-HA	1:300	Mouse (m)	Geschenk M, Bülow
α-Lamin	1:500	Mouse (m)	DSHB, Iowa City
α-Miranda (Mira)	1:500	Rabbit (rb)	Geschenk Hoch Lab

α -pAKT	1:350	Rabbit (rb)	Cell Signaling Technology, Danvers
α -pH3S10	1:500	Rabbit (rb)	Santa Cruz, Dallas/Geschenk Hoch Lab
α -Prospero	1:50	Mouse (m)	DSHB, Iowa City/ Geschenk Hoch Lab
α -Repo	1:500	Mouse (m)	DSHB, Iowa City
α -Synapsin	1:1000	Mouse (m)	DSHB, Iowa City

2.1.6.1 sekundäre Antikörper

Antikörper	Konzentration	Wirt	Bezugsquelle
α -ch-Alexa488	1:500	Goat	Life Technologies, Carlsbad
α -ch-Cy2	1:250	Goat	JacksonLab, USA
α -gp-Alexa633	1:500	Goat	Life Technologies, Carlsbad
α -gp-Cy2	1:250	Goat	JacksonLab, USA
α -gp-Cy3	1:250	Goat	JacksonLab, USA
α -m-Alexa 555	1:500	Goat	Life Technologies, Carlsbad
α -m-Alexa 648	1:500	Goat	Life Technologies, Carlsbad
α -r-Alexa568	1:500	Goat	Life Technologies, Carlsbad
α -r-Alexa633	1:500	Goat	Life Technologies, Carlsbad
α -rb-Alexa488	1:500	Goat	Life Technologies, Carlsbad
α -rb-Alexa568	1:500	Goat	Life Technologies, Carlsbad
α -rb-Alexa633	1:500	Goat	Life Technologies, Carlsbad
α -rb-HRP	1:500	Goat	Cell Signaling Technology, Danvers

2.1.7 Fliegenlinien

Linienbezeichnung	Genotyp	Liniennummer/ Bezugsquelle
2xTag Enok	w; pUAST-attB HA-Enok-Flag; +/-	eigene Linie
31-1-Gal4	w [*] ; P{GawB}(3)31-131-1/TM6C, Sb Tb	5820/ Bloomington
CG-Gal4	w ¹¹¹⁸ ; P{Cg-GAL4.A}2	7011/ Bloomington
cortex glia-Gal4	w[*] P{w[+mW.hs]=GawB}NP0577/ FM7c	112228/ DGRC

dilp6-Gal4	y* P{GawB}Ilp6 ^{NP1079} w* / FM7c	103877/DGRC
elav-Gal4	w*; P{GAL4-elav.L}3	8760/ Bloomington
enokL-Gal4	w ¹¹¹⁸ ; +/+; enokL-Gal4	eigene Linie
enokS-Gal4	w ¹¹¹⁸ ; +/+; enokS-Gal4	eigene Linie
enok ^{ΔΔ}	P{ry+t7.2=PZ}gek09373 cn1 / CyO; CyOtwi-Gal4-UAS-eGFP	eigene Linie
Gal80ts;eYFP	P{tubP-GAL80ts}10; P{w[+mC]=UAS- 2xEYFP}AH3	eigene Linie
gek-Gal4	y* w* ; P{GawB}gek ^{NP5192} / <u>CyO</u> , <u>P{UAS- lacZ.UW14}UW14</u>	104890/ DGRC
hs-Flip	yw hs-flp;; Act>CD2>Gal4UAS-GFP	M.Bülow
oenozyten-Gal4	w; ;VT036615.GAL4@attP2	204332/ VDRC
repo-Gal4	w ¹¹¹⁸ ; P{GAL4}repo/TM3, Sb	7415/ Bloomington
UAS-Cam2.1	P{UAS-Cameleon.2.1}	R.Bader
UAS-Enok	w; UAS-pRed3-4B; +/+	eigene Linie
UAS-Enok;eYFP	w; UAS-pRed3-4B; P{w[+mC]=UAS- 2xEYFP}AH3	eigene Linie
UAS-Enok;Gal80ts	w; UAS-pRed3-4B; P{tubP-GAL80ts}7	eigene Linie
attP40	y1 v1 P{nos-phiC31int.NLS}X; P{CaryP}attP40	25709/ Bloomington
UAS-Enok;mitoGFP	w; UAS-pRed3-4B; P{UAS-mito-HA- GFP.AP}3, e ¹	eigene Linie
UAS-eYFP	y,w; ;P{w[+mC]=UAS-2xEYFP}AH3	6660/ Bloomington
UAS-GFP.nls	w ¹¹¹⁸ ; P{UAS-GFP.nls}14	4775/ Bloomington
UAS.mitoGFP	w ¹¹¹⁸ ; P{UAS-mito-HA-GFP.AP}3, e ¹	8443/ Bloomington
W ¹¹¹⁸	w1118 (X)	3605/ Bloomington

2.1.8 Bakterienstämme

Genotyp oder Herstellerangabe	Genotyp oder Herstellerangabe
Escheria coli BL21	F- ompT hsdS (rB,mB) gal
E.coli DH5α	supE44 ΔlacU169 (F80lacZΔM15) hsdR17 recA1 endA1 gyrA96 thi-1 relA1

<i>E. coli</i> TOP10	Genotyp siehe TOPO TA Cloning Kit
----------------------	-----------------------------------

2.1.9 Vektoren und Plasmide

Name	Klonierungsmethode oder Bezugsquelle
EnokL-Gal4	NotI-BglII Fragm. aus enokP-I-topoB-L1 in pCaSPeR-AUG-Gal4-X
enokP-I-topoB-L1	PCR-Produkt aus BACR27M17,Primer enokP- L Not-F3/enokP-Bgl-R3 in pCR II topo
enokP-s-topoB-S1	PCR-Produkt aus BACR27M17,Primer enokP-Not-S1-F/enokP-Bgl-R3 in pCR II topo
EnokS-Gal4	NotI-BglIII Fragm. aus enokP-s-topoB-S1 in pCaSPeR-AUG-Gal4-X
pAct-Gal4	Geschenk von A.Völzmann
pBST-minusEcoRV	XmaI/ EcoRV Verdau in der MCS von pBluescript
pCaSPeR-AUG-Gal4-X	L. Voshall
pEnok 2011-1-A	SpeI Fragment aus pUAST-Red3 in pBST-minusEcoRV, Franziska Schmitz
pEnok 2011-HA	NotI EcoRV Fragment aus pSC-A-amp/kan-Enok Ntag in pEnok 2011-1-A, Franziska Schmitz
pGEX104	GST-Expressions-Vektoren, Ingo Zinke
pRed3-C-Term-Flag	PCR Fragment aus pRed3 mit Primer, enok-Ctag-For/ enok-Ctag-Flag-Rev, Franziska Schmitz
pRed3-N-Term-HA	SpeI Fragment aus pEnok 2011-HA in pUAST-Red3, Franziska Schmitz
pSC-A-amp/kan-Enok Ntag	PCR Produkt aus pEnok 2011-1-A mit Primer enok-Ntag-For/ enok-Ntag-HA-lo-Rev, Franziska Schmitz
pSC-A-amp/kan-Enok- Ctag	KpnI RsrII Fragment aus pSC-A-amp/kan-Enok-Ctag, Franziska Schmitz
pUAST-attB	Bischof
pUAST-attB HA-Enok-Flag	pRad3-C-Term-Flag-N-Term-HA [NotI] / KpnI Fragment in pUAST attB.
pUAST-attB-C-Term-Flag	NotI KpnI Fragment aus pRed3-C-Tem-Flag
pUAST-NeGFP	Hergestellt André Völzmann
pUAST-Red3	7,3 NotI-Fragment aus pRed2 in pP{UAST}, Ingo Zinke

2.1.10 Primer zum Klonieren

Primernamen	Sequenz 5`-3`
enok-Ctag-Flag-Rev	GGTACCCTACTTGTGCATCGTCATCCTTGTAACTCT GCGAATAGAACCGTTGAG
enok-Ctag-For	AGCGTGTGCCGTCAATAACT
enok-Ntag-For	CGCGCGTAATACGACTCACT
enok-Ntag-HA-lo-Rev	GATATCATGCGCCGATTCCCTAGCGTAGTCTGGGACGT CGTATGGGTACATCATGGCTTAGTTTATCAATTCCG
enokP-Bgl-R3	AGATCTTCCCTCATCATGGCTTACTGA
enokP-Not-L-F	CGCCGGCGCCTTTTCTTGCAGCTTCCTG
enokP-Not-S1-F	GCGGCCGCCAGAGTGGCCCTATAGAC

2.1.11 Primer für quantitative RealTime PCR

Bezeichnung	Gen	Primersequenz 5'→3'
4ebp-Sy-F2	4ebp	CATGCAGCAACTGCCAAATC
4ebp-Sy-R2	4ebp	CCGAGAGAACAACAAGGTGG
AcCoAs-sy-F	AcCoAs	ATCGTGGTGTTCGATTTG
AcCoAs-sy-R	AcCoAs	TCCTTGTCTCCATCTCCTC
act-Sy-F1	Act5C	GTGCACCGCAAGTGCTTCTAA
act-Sy-R1	Act5C	TGCTGCACTCCAAACTTCCAC
ALK-sy-F	Alk	CTATGGCGGTTCGTTGTG
ALK-sy-R	Alk	CGTATCGTGGGTGGGAG
ATPCL-sy-F	ATPCL	GGCAGTGTTCGATGTT
ATPCL-sy-R	ATPCL	ATAAAGGTGGAGCCTGG
aos F	aos	CAACAGCAGCATCGCA
aos R	aos	ACAGACGGGCAAATCCT
Brummer F	bmm	ACGCACAGCAGCGACATGTAT
Brummer R	bmm	CTTTTCGCTTTGCTACGAGCC
CG-6113 F	Lip4	I.ZINKE
CG-6113 R	Lip4	I.ZINKE
CG12262-sy-F1	CG12262	CTTGTGCGCCGCCTATTGT
CG12262-sy-R1	CG12262	CCCCTCATCACCTTCTTC
CG17374-sy-F1	CG17374	GGC ACT GGC CAT TTT GAG
CG17374-sy-R1	CG17374	CAC GCA GTT TTA GCT CCT TGT
CG18609-sy-F	CG18609	CGA TAC TTG CGC ATA CCT CA
CG18609-sy-R	CG18609	CAG TGT GAT AGG CCA TGG TG
CG3524-sy-F2	CG3524	TCC GAA TTA GTG GCA TAC GA
CG3524-sy-R2	CG3524	CTT CCT GCT CGG CAT TTC
CG6277-sy-F2	CG6277	AGCATGAACAAGGACATCCG
CG6277-sy-R2	CG6277	AGCGACAGCCAAAACAGAAG
CG6660-sy-F	CG6660	GGA TCT GCT CGA CAC GGT A
CG6660-Sy-R	CG6660	ATG CCG CCA TGG TGA TAC
CG927-sy-R1	CG927	ACGCTCGTAGACACCTGGAG
CG9527-sy-F1	CG927	CATGAGCGATGGAAACGTC
CPTI-sy-F1	CPTI	GAGCCATGATGCAGAGAACA
CPTI-sy-R1	CPTI	GGTAGCTGGAAGTGTGCTC
dilp6-sy-F	dilp6	S.BUCH

dilp6-sy-R	<i>dilp6</i>	S.BUCH
Egm-sy-F1	<i>egm</i>	CAG CTT GGT GGG ACT ATC G
Egm-sy-R1	<i>egm</i>	GGG TGA GCT CCA GGT CTT G
enok-SYnew-F1	<i>enok</i>	CAAAAGTGTAACGCGGAGCTG
enok-SYnew-R1	<i>enok</i>	TATCATGCGCCGATTCCCT
FMRP-sy-F2	<i>fmrp</i>	TCGCGTACATCGGTTTTGAG
FMRP-sy-R2	<i>fmrp</i>	TGGCGGATTTCGAGTTTTTGG
ImpL2-sy-F2	<i>ImpL2</i>	CGATCGTCGCATATCATCGA
ImpL2-sy-R2	<i>ImpL2</i>	TGCTGGCATAGATGGTCTTGG
lip3-Sy-F1	<i>Lip3</i>	TGAGTACGGCAGCTACTTCCCT
lip3-Sy-R1	<i>Lip3</i>	TCAACTTGCGGACATCGCT
lpp-sy-F1	<i>lpp</i>	TGA AAT TGG ACC AGT GTT GG
lpp-sy-R1	<i>lpp</i>	GGA TTC CAA TCA AAG CGA TAT T
LpR2-sy-F	<i>LpR2</i>	TCGAGAATCCCGTCTACCAC
LpR2-sy-R	<i>LpR2</i>	TCGGATGCCAGATTTGAAGA
ltp-sy-F1	<i>apoltp</i>	TCC GAA GAA TCC TCG ATA GC
ltp-sy-R1	<i>apoltp</i>	GCG GAT CTT TGA GTG GAT TG
mtp-sy-F1	<i>mtp</i>	ATA AGA AGT GCC TGC GAA CC
mtp-sy-R1	<i>mtp</i>	TTA GGG CCG TTT TTC CAT C
pnt-sy-F1	<i>pnt</i>	TTCTTTAGTTCAGGCTACAACAC
pnt-sy-R1	<i>pnt</i>	CTACCGCTGCCATTGAC
pyr-F	<i>pyr</i>	I.HAHN
pyr-R	<i>pyr</i>	I.HAHN
rp49-Real-F1	<i>rp49</i>	GCTAAGCTGTGCGACAAATG
rp49-Real-R1	<i>rp49</i>	GTTTCGATCCGTAACCGATGT
rho F	<i>rho</i>	TTGTCATCTTTGTCTCCTGC
rho R	<i>rho</i>	GCAATGTACGACACCTGG
Scylla-sy-F1	<i>scylla</i>	AAATAATCCGCGTGTCTGGAG
Scylla-sy-R1	<i>scylla</i>	CAATGCGACGCGAATTCTT
sug-sy-F1	<i>sug</i>	CCAGCTATTGGCTAGGCCGATA
sug-sy-R1	<i>sug</i>	AGTTCAGATTCGATGGATGCG
Thiolase-sy-F1	<i>Thiolase</i>	TGA ATG TCG CCA GGA AAG T
Thiolase-sy-R1	<i>Thiolase</i>	GGA CTC CAT CCA CGA GCA
whd-sy-F1	<i>whd</i>	GAA AGT GGA GAC TGC AAT TGG T
whd-sy-R1	<i>whd</i>	GA TGG CAA ACG AGA ATG C
yip2-sy-F1	<i>yip2</i>	CAT CAC TGG TCA TCT GGT TCA
yip2-sy-R1	<i>yip2</i>	GAC AGC CTC GAG GAG AAG G

2.1.12 Geräte

Gerät	Hersteller
Autoklaven	H+P Varioklav Dampfsterilisator EP-2 H+P Varioklav Dampfsterilisator Typ25 T
Bakterienbrutschrank	Memmert Model 400
Binokular	Stemi2000, ZeissSZ40, Olympus
Drehrad	Snijders test-tube-rotator
Elektrophorese Equipment	Bio-Rad
Elektropipette	Easypet, Eppendorf
Gel-Dokumentation	Biozym Alpha Digi Doc Gel Imager, Intas VersaDoc™ Imaging System - Neurosciences

Gel-Kammer (Elektrophorese)	PEQLab Biotechnologie
Heizblock	HLC BioTech
Homogenisator	Precellys Peqlab
Injektionsapparat	Transjektor 5246, Eppendorf
Laser-Scanning Mikroskop	LSM 780, Zeiss
Mikrowelle	Panasonic
PCR-Maschine	iQ5 Cyclor BioRad
Photometer	NanoDrop Spectrophotometer, Peqlab Eppendorf BioPhotometer Plus
Pipetten	Pipetman Gilson
RealTime PCR-Maschine	CFX96 RealTime System, BioRad
Spannungsgerät	PowerPac Basic, BioRad
Thermomixer	Thermomixer comfort, Eppendorf
Vakuumtrockner	Savant Speed-Vac SPD 111 V
Vortexer	Vortex Genie2, Scientific Industries
Waagen	BL 1500 S, Sartorius B211 D, Sartorius PCB, Kern
Wasserbad	SW22, Julabo
Westen Blot Equipment	Mini Trans-Blot® Cell, Biorad
Zentrifugen	Megafuge 1.0R, Heraeus Centrifuge 5415R, Eppendorf Centrifuge 5810R, Eppendorf

2.1.13 Computerprogramme/Serverdienste

Bezeichnung	Version	Hersteller
Adobe Professional Paket	9.1.1	Adobe Systems, München
AIM Carl Zeiss	4.0.0.157	Carl Zeiss MicroImaging GmbH, Göttingen
BioRad CFXManager	3.1	BioRad, Hercules (USA)
ImageJ64	1.42	http://rsb.info.nih.gov/ij/download.html
MS Office Paket 2008 für Mac	12.1.9	Microsoft Corporation, Unterschleißheim
Photoshop CS4	11.0	Adobe Systems, München
SerialCloner 1-3	3-1	http://serialbasics.free.fr/Serial_Cloner.html
Universal Probe Library		Universal ProbeLibrary Assay Design Center/ Roche Applied Science
GraphPad/Prism	6	GraphPad Software, Inc
PLMLA Vorhersage		http://bioinfo.ncu.edu.cn/inquiries_PLMLA.aspx
ZEN 2010 LE	1.1	Carl Zeiss MicroImaging GmbH, Göttingen

2.2 Methoden

2.2.1 Arbeit mit Fliegen

2.2.1.1 Fliegenhaltung

Die Fliegenhaltung erfolgte bei 18°C bzw. 25°C auf Standard-Fliegenfutter in PS-Röhrchen. Für Verhaltensversuche wurden die Fliegen in einem Inkubationsschrank mit 12-stündigem Tag-/Nachtrhythmus untergebracht. Mindestens alle vier Wochen wurden die verschiedenen Linien auf neues Futter umgesetzt.

2.2.1.2 Fliegenfutter

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

2.2.1.3 Herstellung von Apfelsaftagarplatten

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

2.2.1.4 Herstellung transgener Fliegen durch Mikroinjektion

Für diese Arbeit wurden transgene Fliegen-Linien mit dem Konstrukt pUAST-HA-Enok-Flag hergestellt. Dafür wurde die DNA mit Natrium-Acetat und Isopropanol gefällt, mit 70% Ethanol gewaschen und in 15µl Injektionspuffer resuspendiert. Das Konstrukt wurde in die attP40-Embryonen injiziert. Die Durchführung der Embryoneninjektion erfolgt nach der Methode von Voie und Cohen (1998). Die erfolgreichen Transformanten wurden in den w⁺ Hintergrund gebracht und homozygot gemacht oder, falls erforderlich über ein Balancer Chromosom gekreuzt.

2.2.1.5 Fliegenkreuzung

Für Einzelkreuzungen wurden dreimal so viele unbefruchtete Weibchen mit einzelnen Männchen verpaart. Weibchen, die in Kreuzungen verwendet werden sollten, wurden immer spätestens acht Stunden (bei 25 °C) nach dem Schlüpfen von den Männchen getrennt. Diese Kreuzungen wurden auf Apfelsaftagarplatten mit frischer Hefe als Futterquelle gehalten. Bei Überexpressionskreuzungen wurde eine Treiberlinie mit einer Effektorlinie gekreuzt. Eine Treiberlinie besitzt ein Konstrukt aus einem Promotor und einem stromabwärts gelegenen Gen für den Transkriptionsfaktor Gal4, der dem Hefe-Genom entstammt. Gal4 wurde somit unter der Kontrolle des vorgeschalteten Promotors exprimiert. Eine Effektorlinie enthielt ein Konstrukt aus einem *Enhancer*-Element, dem *upstream activating sequence* (UAS), und einem nachgeschalteten Zielgen.

Bei einer Kreuzung der beiden homozygoten Linien besaß die F1-Generation beide genetischen Elemente, so dass das Gen von Interesse unter der Kontrolle des Treiber-Promotors exprimiert wurde, da der Transkriptionsfaktor Gal4 spezifisch an die UAS-Sequenz bindet und so die Transkription aktiviert.

2.2.1.6 Fütterungsexperimente

Falls nicht anders erwähnt, wurden die Fütterungsexperimente mit allen Genotypen nach dem gleichen, hier beschriebenen Ablauf durchgeführt. Die Fütterungsexperimente dienten vielen weiteren Experimenten als Vorlage: RNA-Isolation, Oil Red O Färbungen, Verhaltensanalysen, Dilp2 Sekretions-Analyse.

Für diese Experimente mit verschiedenen Nahrungsbedingungen wurden Ei-Sammlungen von max. vier Stunden ausgeführt. Die Sammlungen wurden auf Apfelsaftagarplatten mit ausreichend Frischhefe durchgeführt. Nach der Eiablage blieben die Larven bei 25°C für 50h auf diesem Futter. Anschließend wurden sie mit Wasser in Zellkultursiebchen von Hefe freigewaschen und mit einem Pinsel entsprechend der Futterbedingung übertragen. Für die proteinreiche Behandlung wurden Larven auf Faltenfilter (Ff) mit 1 x PBS und Frischhefe gesetzt. Die Nahrungsentzug-Bedingung bestand aus einem Ansatz mit Faltenfilter (Ff) mit 1 x PBS. Nach 14h auf der jeweiligen Bedingung wurden die Larven gewaschen und für den jeweiligen Versuch weiterverarbeitet. Es gilt zu beachten, dass die im Ergebnisteil beschriebenen Gal80ts Experimente von diesem Protokoll abweichen.

2.2.1.7 Fressverhalten

Larven, die auf Nahrungsaufnahmedefekte untersucht werden sollten, wurden während der Futterexperimente mit einem Farbstoff (Carmin) vermischte Hefe angeboten. Die Larven wurden auf Faltenfilter mit der gefärbten Hefe bei 25 °C gehalten. Ob die Nahrungsaufnahme

erfolgte, konnte an der Färbung im Darm gesehen werden. Der Darm der Larven färbte sich rot, wenn die Larven die Hefe gefressen hatten.

2.2.1.8 Analyse des Wanderverhaltens

Wie oben beschrieben wurden Eiablagen durchgeführt. Um das Wanderverhalten in der *enok* Mutante zu untersuchen, wurden jeweils 20 Larven auf eine Apfelsaftagarplatte um die gefärbte Hefe im Abstand von 0,5mm gelegt. Nach 30h nach der Eiablage wurden unter dem Binokular mit einer CCD-Kamera Aufnahmen der Platten gemacht und die Laven innerhalb und außerhalb der Hefe gezählt.

2.2.1.9 Flp-out Technik

Fliegen, die das UAS-Enok Effektorgen besitzen, wurden mit Fliegen gekreuzt, die das Flp-out- Konstrukt beherbergen [*y w hs-flp; ActCD2>Gal4UAS-GFP*]. Nach der Sammlung der Eier für 4 Stunden wurden diese Nachkommen sofort auf 25°C übertragen und dadurch einem milden Hitzeschock ausgesetzt, bis der jeweilige Versuch durchgeführt wurde: Immunfluoreszenz-Färbungen oder Oil Red O Färbungen.

2.2.1.10 Wasserabdichtungstest

Larven des gewünschten Genotyps und Alters wurden aus dem Futter genommen und gewaschen. Eine 0,1%ige Brilliant Blue Lösung wurde im H₂O angesetzt und in eine 24-Well-Zellkultur Platten gegeben. Anschließend werden die Larven für max. 10 Minuten in der Lösung schwimmen gelassen. Danach konnten sie mit klarem Wasser abgespült, mit Glycerol überschichtet und wenn möglich *in vivo* fotografiert werden. Falls dies nicht möglich war, sie mit Hitze getötet, wobei darauf geachtet werden musste die Laven nicht zu kochen, da sonst durch die Denaturierung der Proteine die blaue Farbe nicht mehr sichtbar ist.

2.2.2 Isolation und Aufreinigung von DNA und RNA

2.2.2.1 Isolation von Plamid-DNA

Für die analytische Präparation von DNA wurden Bakterienkulturen transformiert, in einem Volumen von 2 ml LB-Medium mit dem entsprechenden Antibiotikum angesetzt und über Nacht (o/n) auf 37°C im Schüttler inkubiert. Von dieser Über-Nacht-Kultur wurden 1,6 ml in ein Mikrozentrifugen-Röhrchen überführt und 30 sek bei 10000xg pelletiert. Das Bakterien-Pellet wurde mit 200 µl TELT-Puffer und 20 µl Lysozymlösung (10 mg/ml in TE) versetzt und durch vortexen resuspendiert. Dann wurde die Lösung 3 min bei 96°C und anschließend 5 min auf Eis inkubiert. Die Reste aus Proteinen, Zellwand und genomischer DNA wurden durch Zentrifugation (8 min, 10000xg) pelletiert. Der Überstand wurde anschließend mit 100 µl Isopropanol versetzt, gevortext und dadurch die Plasmid-DNA ausgefällt. Nach 5 min

Zentrifugation (10000xg) konnte das DNA-Pellet mit 70% Ethanol gewaschen, erneut abzentrifugiert und getrocknet werden. Die Plasmid-DNA wurde dann in 50 µl ddH₂O resuspendiert.

Für Aufreinigungen von größeren Mengen und hoher Sauberkeit wird das PureLink™ HiPure Plasmid Filter Purification Kit von Invitrogen benutzt. Das Aufreinigungskit wurde der Anleitung entsprechen verwendet.

2.2.2.2 Gelelektrophorese und DNA-Aufreinigung

Für die DNA-Aufreinigung wurde ein 1%iges Agarose Gel hergestellt, indem Agarose in 1x TAE Puffer gelöst und aufgekocht wurde bis sie sich komplett aufgelöst hat. Nachdem die Flüssigkeit auf 60°C abgekühlt war, wurde Syber-Safe hinzugegeben in einer Konzentration von 1:10000. Das Gel wurde nach dem Erstarren in die Gelkammer übertragen. Diese wurde mit 1x TAE aufgefüllt. Die DNA-Probe wurde mit 5x Ladepuffer versehen und in die Geltaschen pipettiert.

Zur anschließenden Aufreinigung der DNA-Fragmente aus dem Gel wurde das Macherey-Nagel Nucleospin extract II kit verwendet. Die Extraktion erfolgte nach Herstellerangaben. Nach der Aufreinigung des DNA Fragments wurde dieses auf -20°C aufbewahrt.

2.2.2.3 Photometrische Konzentrationsbestimmung von DNA und RNA

Die Konzentration der DNA bzw. RNA wurde mittels des Nanodrop Systems ermittelt. Zuerst wurde 1µl ddH₂O als die Blank-Probe gemessen, anschließend wurde ebenfalls 1µl der Probe aufgetragen und gemessen.

2.2.2.4 Aufreinigung der RNA

Für die Isolierung der RNA wurde das Nucleospin RNA II Kit der Firma Macherey-Nagel verwendet.

Die Isolierung der RNA aus Larven wurde mit ca. 25 L2-Larven und ca. 50 L1-Larven durchgeführt. Die Larven wurden abgesammelt und von den Futterresten befreit. Ab hier ist das Protokoll für alle Entwicklungsstufen identisch. Das Gewebe wurde in 350µl RA-1 Puffer und 3,5µl Mercaptoethanol homogenisiert und über eine Säule (mit violetterem Ring) mit Hilfe einer Zentrifugation bei 11.000 Upm für 30 Sekunden bei RT gefiltert. Der Durchfluss wurde mit 600µl 70%-Ethanol gefällt und auf die blauen Anionenaustauschsäulchen aufgetragen. Über eine 30 sekundige Zentrifugation bei 13.000 Upm wurden RNA und DNA an die Säule gebunden. Diese wurde anschließend mit 600µl MBD-Puffer gewaschen. Danach wurde die Säule mit 95µl rnx-Puffer mit 1:10 verdünnter DNaseI für 15 Minuten inkubiert, um die DNA zu degradieren. Auf die Säule wurden anschließend 200µl RA-2 Puffer gegeben und zentrifugiert (13.000 Upm für eine Minute bei RT). Es folgten Waschrinne mit 600µl und 250µl RA-3 Puffer, wobei zuerst 30 Sekunden und dann zwei Minuten lang zentrifugiert wurde. Der

Durchfluss wurde verworfen. Die an die Säule gebundene RNA wurde durch eine ein-minütige Zentrifugation bei 11.000 Upm in 15µl oder 30µl RNase-freiem Wasser eluiert. Nach einer Konzentrationsbestimmung konnte die RNA bei -80°C gelagert werden.

Für RNA Aufreinigung aus larvalen Geweben wurde das NucleoSpin RNA XS verwendet. Die Isolation der RNA wurde im Fall von L2 Larven aus genau 25 Gehirnen durchgeführt.

2.2.2.5 Reverse Transkription von RNA zu cDNA

Der Vorgang der Reversen Transkriptase wurde mit dem Qiagen QuantiTect reverse transcription kit durchgeführt. Der große Vorteil dieses Systems ist die im Kit vorhandene rDNaseI, die DNA-Reste verdaut, die möglicherweise bei der Isolation mit aufgereinigt wurden. Die reverse Transkription wurde nach Herstellerprotokoll immer mit einem ganzen Ansatz von 1000ng der Total-RNA durchgeführt. Anschließend wurden die 20µl Reaktion nach der cDNA-Synthese mit 80µl H₂O aufgefüllt.

2.2.3 Klonierung von DNA-Fragmenten

2.2.3.1 Restriktionsverdau von DNA

Die zuvor aufgereinigte DNA wurde durch Restriktionsenzyme an den gewünschten Stellen geschnitten. Für den Restriktionsverdau wurden Restriktionsendonukleasen und Puffer von NEB benutzt. In einem Volumen von 20µl wurden 1-2µg DNA verdaut. Weitere Bestandteile waren 1µl des passenden 10fachen Puffers und 3-5 Enzymeinheiten des Enzyms pro 1µg DNA. Nach dem Verdau von 2h wurde die DNA mit 10fach Ladepuffer versehen, mittels Gelelektrophorese aufgeteilt und mit dem Macherey-Nagel Nucleospin extract II kit aufgereinigt. Für Doppelverdau wurden zwei Enzyme mit dem passenden Puffer nach Herstelleranweisungen verdaut.

2.2.3.2 Ligation und Transformation

Für ein optimales Ergebnis der Ligation sollte die Menge der DNA-Fragmente bestimmt werden. Vor der Ligation wurde die Konzentration der Vektor-DNA und der Insert-DNA auf einem Agarosegel verglichen. Für die Ligation wurde ein drei-bis sechsfacher molarer Überschuss des zu inserierenden DNA-Fragments zum entsprechend vorbereiteten Vektor gegeben. In einem Volumen von 10µl wurde mit 1µl 1x Ligasepuffer und 1µl T4 DNA-Ligase die Ligation für 10 min auf RT durchgeführt. Der Ligationsansatz wurde zu Bakterien dazugegeben und wurde 20 min auf Eis inkubiert, 30 sek. einem 42°C Hitzeschock unterzogen und erneut auf Eis gestellt. Um je nach Bedarf eine Resistenz gegen Antibiotika zu entwickeln, wurden die transformierten Bakterien in 2 bis 4-fachem Volumen LB-Medium 30 bis 60 min bei 37°C leicht schüttelnd inkubiert, bevor sie auf LB-Agar (inklusive 100 mg/ml Ampicillin ausgestrichen wurden.

Die Klonierung von PCR-Produkten erfolgte mit dem *TOPO TA Cloning® Kit* nach Herstellerangaben.

2.2.4 PCR Techniken

2.2.4.1 Klonierungs-PCR

Sowohl für die Herstellung der *enok-Gal4* Linien als auch für die Herstellung des getaggenen *pUAST-attB-HA-Enok-Flag* Konstrukts wurde die KOD Polymerase von Novagen benutzt. Die PCR wurde nach Herstellerangaben durchgeführt.

Bestandteile	Volumen / 25 µl Reaktion
H ₂ O	14.5 µl
10x KOD Puffer	2,5 µl
20 mM dNTPs	2,5 µl
Forward primer	0,5 µl
Reverse primer	0,5 µl
25mM MgSO ₄	1,5µl
Template DNA	X
KOD Polymerase (U/µl)	0.5 µl

Programm:

Zyklus	Temperatur	Dauer	Zyklenzahl
Initialisierung	98 °C	120s	1
Denaturierung	98 °C	20 s	25-35
Annealing	60-74 °C	30 s	
Extension	72 °C	60 s	
Final extension	72 °C 4 °C	3 min hold	1

Nach der PCR musste das gewonnene Fragment auf einem Agarose Gel aufgereinigt werden.

2.2.4.2 Quantitative PCR

Primer wurden mit der Universal Probe Library von Roche Applied Science designet. Die Bedingungen für Primer wurden wie folgt gewählt:

Bedingung	Intervall	Optimum
Primer Länge	18-25bp	20bp
Produkt Größe	60-150bp	120bp
Schmelztemperatur	58-62°C	58°C
%GC Gehalt	40-60	50

Primer wurden von Eurofins synthetisiert, entsalzt und gelöst mit einer Konzentration von 100pmol/µl geliefert. Primertests wurden durchgeführt, um die Qualität zu testen. Hierfür wurde eine Verdünnungsreihe mit template cDNA zwischen 1:1 bis 1:625 eingesetzt. Primer wurden nur dann weiterverwendet wenn die Effizienz bei über 80% lag. Die Bildung von Primer-Dimeren wurde durch die Schmelzkurven-Analyse ausgeschlossen. Der benutzte Mix war SYBR-Green aus dem SensiMix SYBR No-ROX Kit von Biorline. Eine Auswertung der *RealTime* PCR erfolgte über eine relative Quantifizierung. Dazu wurde die absolute Genexpression von Referenzgenen, wie z.B. *rp49* oder *actin* mitgemessen und für die Auswertung die absoluten Genexpressionswerte der zu untersuchenden Gene auf die absoluten Werte der Referenzgene bezogen. Der Wert wurde während der exponentiellen Phase der Analyse aufgenommen. Die Auswertung wurde mittels der BioRad Software gemacht. Alle $\Delta\Delta C_t$ -Werte und die relativen Expressionslevel wurden von der BioRad Software berechnet. Die im Anhang zu findenden Balkendiagramme der jeweiligen Analysen, der relativen Expression sind die Originaldiagramme ausgegeben von der Software. Die statistischen Auswertungen wurden mit Graph Pad Prism Software gemacht. Die benutzten statistischen Test waren entweder Student's T-Test oder One Way Anova mit Bonferroni's Multiple Comparison Test als Multitest Korrektur.

Ein einfacher Ansatz einer *RealTime*-PCR wurde wie folgt pipettiert:

Komponente	Menge
cDNA	0,75µl
5µM Primer-Mix (genspezifisch)	0,75µl
2x SYBR® Green	7,5µl
Wasser I	6µl

Folgendes PCR-Programm wurde im CFX96 *RealTime* System verwendet:

Zyklus	Wiederholungen	Zeit	Temperatur
1.	1	3min	95 °C
2.	40	10 sek	95 °C
3.		20 sek	58 °C
4.		30 sek	72 °C
5. die Schritte 2-4 werden 40 mal wiederholt			
6.	1	1 min	59 °C
7.	1	1 min	55 °C
8.	81	30 sek	55 °C + 0,5°C/Zyklus

2.2.5 Biochemische Methoden

2.2.5.1 Expression von GST-Enok für Säulenhersellung

Der *pGEX104-Vektor* wurde in BL21 Bakterien transformiert und über Nacht bei 37°C in 100ml Ampicillin-LB Medium wachsen gelassen. Am nächsten Morgen wurde die Kultur mit 800-1000ml LB-Amp Medium aufgefüllt. Nach 2h bei 37°C wurde zu den Kulturen 0,5 bis 1mM IPTG dazugegeben und für zwei weitere Stunden inkubiert. Anschließend wurden die Zellen bei 500g für 15min pelletiert und in 1/20 des Kulturvolumens mit PBS, welches Protease Inhibitoren enthielt, resuspendiert. Durch die anschließende Zugabe von Lysozym fällt das Protein aus und musste deshalb mit einem Sonicator bei 70%power,100% duty cycle für 1min 30 sek. gelöst werden. DTT wurde zu dem Lysat hinzugefügt und durch Zentrifugation bei 10000g für 15min gesäubert. GST-Protein wurde über Nacht an mit PBS vorgewaschenen Glutathion-Beads bei ständigem Schütteln bei 4°C gebunden. Anschließend wurden die Beads bei 500g für 3min zentrifugiert und der Überstand abgenommen. Beads wurden vier bis fünfmal in 50ml 1% PBT und vier zusätzliche Male mit 1x PBS gewaschen. Als nächstes wurden die Beads auf eine Säule von Pierce übertragen und noch zweimal mit Säulenvolumen gewaschen. Anschließend wurde das GST-Protein von der Säule mit 50 mM Tris, pH 8 und 15 mM reduziertem freien Glutathion in 500-1000µl Fraktionen eluiert. Das Protein befindet sich in der Fraktion 6-8. 10µl von jeder Fraktion würden für 5min mit 1x SDS Puffer aufgekocht und auf ein 12% SDS-Polyacrylamidgel aufgetragen. Protein wurde mit Coomassie gefärbt.

2.2.5.2 Herstellung der CNBr-Enok Affinitäts-Säule

Nach der Eluierung wurde das GST-Enok-Protein mit der 3kD Amicon Säule aufkonzentriert, indem es bei 4000g 25-40 Minuten lang zentrifugiert wurde. Das Konzentrat wurde anschließend in 2 – 3 ml 0,1 M NaHCO₃, pH 8,3 + 0.5 M NaCl gelöst und auf die Cyanobromid-Säule (0,5g CNBr Puder pro Säule wurde in 40 - 70 ml 1 mM HCl aktiviert) geladen. Nach der 1-2stündigen Inkubation auf dem Drehrad bei RT wurde die Säule mit 5 Säulenvolumen Coupling Buffer (0,1 M NaHCO₃, pH 8,3 + 0.5 M NaCl) gewaschen. Die übrig gebliebenen reaktiven Gruppen der CNBr-Säule wurden mit 0,1M Tris-HCL Puffer blockiert, während die Säule zwei weitere Stunden rotierte. Anschließend wurde die Säule dreimal alternierendgewaschen. Mit 0,1M Acetat-Puffer (pH=4) mit 0,5M NaCl gefolgt von eine Waschschrift mit 0,1 M Tris-HCl (pH=8) mit 0,5M NaCl. Die GST-Enok Affinitäts-Säule wurde in PBS+0,01% NaAzid auf 4°C aufbewahrt.

2.2.5.3 Affinitätsaufreinigung des α-Enok Antikörpers.

Für die Affinitätsaufreinigung wurde der α -Enok Antikörper auf die CNBr-GSt-Enok Säule geladen und für zwei Stunden bei RT auf dem Drehrad inkubiert. Anschließend wurde die Säule 5-7 mal mit 1x PBS gewaschen und der Antikörper in 500 μ l Fraktionen von 0,1M Glycin-HCl (pH=2,7) eluiert. Sofort nach der Eluierung wurden die Fraktionen mit 0,2 Volumen 1M Tris-HCl (pH=8,8) neutralisiert. Der Antikörper wurde in PBS mit Hilfe der Slide-A-Lyzer Dialysis cassettes (20000 MWCO; Thermo Scientific) dialysiert, aliquotiert und bei -20°C mit und ohne 50% Glycerol aufbewahrt.

2.2.5.4 Proteinextraktion

Die larvalen Gewebe wurden mit 200-500 μ l kaltem RIPA-Puffer mit Complete Protease Inhibitor (Roche) mit Hilfe des Precellys Homogenisators lysiert. Das Homogenat wurde bei 13200rpm für 15 min bei 4°C abzentrifugiert und der Überstand in ein frisches 1,5 ml Eppi übertragen. So kann es bei -80°C aufbewahrt werden.

Als Vorbereitung für die SDS-PAGE wurde das Lysat mit Ladepuffer versehen und die Proben wurden 5min gekocht und bei RT abkühlen gelassen.

2.2.5.5 BCA-Test zur Proteinkonzentrationsbestimmung

Um die Konzentration der Proben zu Messen wurde das BCA Protein Assay kit benutzt. Die Standardkurve und die Konzentrationsmessung wurden nach Herstellerangaben durchgeführt. Nach einer 30 minütigen Inkubation bei 37°C wurde die Proteinkonzentration bei einer Wellenlänge von 562nm mit dem Nanodrop gemessen.

2.2.5.6 Auftrennung von Proteinen mittels der SDS-PAGE

Proteine können mit Hilfe von Polyacrylamidgelen aufgereinigt werden. Um Auftrennung von verschiedengroßen Proteinen zu erreichen kann die Konzentration von Acrylamid variiert werden. Für die Analyse der Acetyloms wurde das Gradientengel Novex 4-12 % Bis-Tris Gel benutzt. Die Anwendung wurde nach Herstellerangaben durchgeführt.

2.2.5.7 Western Blot und Immundetektion

Die aufgetrennten Proteine wurden nach der SDS-Page mittels Western Blot auf eine PVDF Membran übertragen. Zuvor muss die Membran durch Methanol aktiviert und in Transferpuffer äquilibriert werden. Danach wurde der Blot zusammengebaut, indem die Membran und das Gel zwischen Whatman-Papier und Schwämme gelegt, der Blot in der Kammer positioniert und gegen die Anode gerichtet wurde. Die Kammer wurde mit einem Eisblock und Transferpuffer gefüllt und der Blot wurde bei 100V für 90min laufen gelassen.

Nach dem Transfer wurde die Membran mit der Blockierlösung aus 5% Milchpulver in TBST für 60 min inkubiert. Primärer Antikörper, der in der Blockierlösung gelöst wurde, wurde über Nacht auf 4°C auf die Membran gegeben. Nach dreimaligem Waschen für je 10 min mit TBST wurde die Membran mit dem sekundären Antikörper für eine Stunde inkubiert. Anschließend wurde die Membran noch dreimal mit TBST gewaschen. Die Chemilumineszenz die von dem HRP-gekoppelten sek. Antikörper ausgeht, nachdem das ECL-Substrat auf die Membran gegeben wurde, wurde mit dem VersaDoc von Biorad detektiert.

2.2.6 Zellkultur und Transfektion

Schneiderzellen (S2) wurden in PAN Schneider´s Medium mit 10% FCS und 1% Pen/Strep bei 25°C wachsen gelassen. Für die Transfektion von dem getaggtten Enok Konstrukt wurde das Transfektionsmedium Cellfection (Invitrogen, Life Sciences) verwendet. Die Transfektion wurde nach Herstellerangaben durchgeführt. Das pUAST-Konstrukt wurde mit pAct-Gal4 zusammen in einem Verhältnis von 1:5 co-transfiziert.

2.2.7 Fluoreszenz-Proteindetektion

2.2.7.1 Antikörperfärbungen von Zellen

Nach der Transfektion und einer Detektion des GFP-Signals wurden die Zellen in 1x PBS gewaschen und für 10-15 min in 4% PFA/FA 1x PBS fixiert. Anschließend wurde das Fixat 2 x 5 Minuten mit 1x PBS runtergewaschen. Die Zellen wurden danach mit 0,3% PBS für 10-20min permeabilisiert. Nach erneutem Waschen für 2 x 5 min in 1xPBS wurden die Zellen für 30min in PBS+1%BSA blockiert. Der prim. Antikörper wurde in PBS +1%BSA verdünnt und für 1h bei RT auf die Zellen gegeben. Anschließend wurde mit 2 x 5 min 1x PBS und 3 x10 min mit der Blockierlösung gewaschen. Der sek. Antikörper wurde in Blockierlösung verdünnt und die Zellen wurden 1h inkubiert. Nach erneutem Waschen für 3 x 10 min in PBS wurden die Zellen eingedeckelt.

2.2.7.2 Antikörperfärbung von larvalen und adulten Gehirnen

Die *Drosophila*-Gehirne wurden in 1x PBS präpariert und anschließend in 0,5 PBT +4% FA für 40-60min fixiert. Nach einigen Waschschritten in 0,5 PBT (für 15/15/30/30 min) erfolgte die schrittweise Überführung (je 5 min 30% / 70% / 100%) in Methanol sowie MeOH-Inkubation über Nacht bei -20°C. Anschließend wurde schrittweise (je 5 min 70% / 30%) in 0,5 PBT zurück überführt und ausgiebig (15/15/30/30/60 min) in 0,5 PBT gewaschen. Nach einem 30-60 min Blockierungsschritt in 0,5 PBT+5% Ziegenserum (ZS) erfolgte über Nacht bei 4°C Inkubation mit den gewünschten Antikörpern (entsprechend verdünnt in 0,5 PBT+5% ZS,

siehe 2.1.6.1 prim. Antikörper). Nach anschließendem Waschen in 0,1 PBT für 15/15/30/30/60 min und weiteren 30 min Blockieren in 0,1 PBT+5% ZS erfolgte bei RT im Dunkeln für 60 min die Inkubation mit Fluorochrom-gekoppelten Sekundär-Antikörpern gegen die verwendeten Primär-Antikörper. Nach abschließendem Waschen in 0,1 PBT für 5/5/15/15/30/30/60 min erfolgte Eindeckeln in Mowiol. Fluoreszenz-Färbungen wurden generell nach Eindeckeln und mehrtägiger Inkubation in Mowiol mit dem Zeiss LSM 780 ausgewertet.

Für hochauflösenden Mikroskopie wurde dasselbe Färbeprotokoll angewandt und für die Aufnahme ein STED-Mikroskop (STED = Stimulated Emission Depletion) benutzt. Die Aufnahmen wurden in Zusammenarbeit mit Areitsgruppe Lang von Dr. Jan-Gero Schlötel gemacht.

2.2.7.3 Detektion der Dilp2 Sekretion

Nachdem die Larven für 14h auf verschiedenen Nahrungsbedingungen gehalten wurden, wurden sie gewaschen und präpariert. Die entnommenen Gehirne wurde nach dem Standardprotokoll in Kapitel 2.2.7.2 gefärbt. Die Detektion aller Proben muss am selben Tag bei selben Bedingungen durchgeführt werden, um die Intensitätsunterschiede quantitativ auswerten zu können. Die Einstellungen am LSM780 wurde so gewählt, dass Sättigung des Histogramms nicht erreicht wurde. Dadurch würde bei gefütterten Bedingungen fast kein Signal in den IPCs zu sehen sein. Die Signalstärke wurde mit jeweils einem n von max. 12 insulinproduzierenden Zellgruppen quantifiziert. Die aufgenommenen Z-Stapel wurden zu einer Maximumprojektion (Max Intensity) aufsummiert. Die Auswertungen dieser Projektion wurden anschließend mit dem ROI-Tool und der Pixel-Intensitäts-Berechnung von ImageJ durchgeführt. Die Zellgruppen wurde wie im Anhang gezeigt umrandet und ausgewertet. Die statistische Analyse wurde mit Prism6 oder Prism5 gemacht.

2.2.8 Neutrallipid-Detektion

Für die Neutrallipidfärbung wurden zwei Methoden gewählt die hiohistochemische Methode Oil Red O Färbung oder die fluoreszente Methode der NILE RED Färbung.

Das Protokoll von Gutierrez et al, 2007 wurde so optimal angepasst, dass es mit kleinen Unterschieden für beide Färbemethoden benutzt wurde.

Nach der Präparation der Larve wurde das gewünschte Gewebe für max. 20-30min fixiert. Anschließend musste das Fixat mit 3 5 min Waschsritten entfernt werden. Währenddessen muss aus den beiden Lösungen eine Arbeitslösung hergestellt werden. Für NILE RED wurde aus einer 0,1%igen Stocklösung eine 1:100 Verdünnung hergestellt. Für Oil Red O musste eine Lösung aus 4 Teilen 1x PBS und aus 6 Teilen Oil Red O Stocklösung hergestellt werden. Diese Arbeitslösung musste 20-30 min stehen, bis die Oil Red O Partikel ausfielen und diese

Lösung anschließend filtriert werden konnte. Der Filter musste einen Durchmesser von 0,2µm haben. Vor und nach der Applikation von Oil Red O auf das Gewebe, wurde dieses mit 60% Isopanol in 1x PBS äquilibriert, damit so wenig wie möglich störende Partikel übrig blieben. Nachdem beide Lösungen bereit waren, wurden sie für 20min auf das Gewebe gegeben. Anschließend wurde die jeweilige Lösung mit 3 x 5min 1x PBS abgewaschen. Das Gewebe wurde in 100% Glycerol eingedeckelt und sofort mikroskopisch ausgewertet. Diese phänotypischen Analysen wurde wie in der Tabelle zusammengefasst durchgeführt. Die Anzahl der durchgeführten biologischen Wiederholungen kann Anhand der gemachten Aufnahmedaten nachvollzogen werden, da die Proben sich nicht konservieren lassen und sofort am selben Tag mittels Mikroskopie ausgewertet werden müssen.

Genotyp	Bedingung	Biologische Wiederholungen	Technische Wiederholungen
Kontrolle	Hefe	6	35
	PBS	6	35
<i>enok>Enok;eYFP</i>	Hefe	7	56
	PBS	7	56
<i>CG>Enok;eYFP</i>	Hefe	3	40
	PBS	3	24
<i>Oenozyten>Enok;eYFP</i>	Hefe	4	40
	PBS	4	40
<i>Cortex glia>Enok;eYFP</i>	Hefe	4	24
	PBS	4	24

2.2.9 *In vivo* Aufnahmen

Für die Expressionsmusteranalysen wurde die *in vivo* Detektion gewählt. Hier muss das Gewebe nicht präpariert werden, sondern das intakte Tier wurde durch diese Methode analysiert. Um die Larven bewegungsunfähig zu machen, wurden sie auf Objektträgern in einem Tropfen MESAB platziert und mit einem Deckglas eingedeckelt, ohne die Tiere zu quetschen.

3. Ergebnisse

In der vorangegangenen Diplomarbeit, zum Thema *Enoki mushroom (enok)* und der Charakterisierung dieses Gens wurde gezeigt, dass die Dysregulation von *enok* im Gewebe, welches in olfaktorische Verarbeitung involviert ist, zur schweren Beeinträchtigung des Nahrungsaufnahmeverhaltens und des Wachstums führt. Dieser Phänotyp und das resultierende Verhalten stimmen mit der Beschreibung des homologen Gens in Maus und Mensch überein (Campeau et al., 2012). Die folgende Arbeit befasst sich mit weiteren Aspekten, die bis dahin ungeklärt gewesen waren.

Sowohl die Mutante, als auch die gewebe- und zeit-spezifische Überexpression des Gens *enok* wurden auf die Auswirkung der transkriptionellen Regulation untersucht. Die Analyse der Proteineigenschaften und dessen Funktion wurden mittels der Überexpression durchgeführt.

3.1 Enok Protein Charakterisierung

Um ein Protein beschreiben zu können, braucht man einige Werkzeuge, die vorher generiert werden müssen. Zu diesen gehören vor allem Information über mögliche Homologe in anderen Spezies, Antikörper, verschiedene DNA-Konstrukte mit Tags oder Mutationen und vieles Andere. Im folgenden Kapitel wurden unter Anwendung dieser biochemischen und molekularen Werkzeuge einige Charakteristika von Enok analysiert und beschrieben.

3.1.1 Detektion und posttranslationale Modifikation

Um die Aufgabe des Proteins Enok besser zu verstehen, wurde ein Konstrukt in Zusammenarbeit mit Franziska Schmitz generiert, welches die vollständige cDNA-Sequenz von *enok* enthielt und zusätzlich dazu zwei Tags beinhaltete (*pUAST-attB HA-Enok-Flag* oder *UAS-2xTag-Enok*). Dieses Konstrukt wurde wie in Abbildung 3.1A gezeigt, kloniert. Die ausgesuchten Tags waren Hemagglutinin (HA) am N-Terminus und FLAG am C-Terminus. Diese Tags wurden gewählt, da diese aus sehr kurzen Aminosäuresequenzen bestehen und es sehr gute und bereits verifizierte Antikörper gegen diese Epitope gab. Durch das Anfügen zweier Tags, an beiden Termini wurde die Möglichkeit gegeben die Lokalisation und eine mögliche Spaltung des Proteins besser verfolgen zu können. Wie in der Bachelorarbeit von Franziska Schmitz (Schmitz, 2011) bereits vermutet und *in silico* analysiert wurde, besteht die Möglichkeit, dass das Enok Protein posttranslational gespalten wird. Da mit dem polyklonalen Antikörper (Abb. 3.1B) diese Spaltung bis dahin nicht nachgewiesen werden konnte, wurde das getagte Konstrukt kloniert.

Der polyklonale Antikörper anti-Enok wurde bereits in der Diplomarbeit (Moderau, 2009) beschrieben. In der Abbildung 3.1B wurde schematisch dargestellt, gegen welchen Bereich des Proteins der Antikörper generiert worden ist. Der Bereich des Antigens umfasste die

Aminosäuresequenz zwischen dem C-Terminus der PH-Domäne und dem N-Terminus der Myst-Domäne. Für die in der Diplomarbeit beschriebenen Experimente wurde der anti-Enok Antikörper nicht in aufgereinigter Form, sondern als Serum verwendet. Da der Antikörper in diesem Fall nicht ausreichend konzentriert war, konnte mit ihm keine aussagekräftige Analyse, weder im Fall der endogenen Expression noch bei einer schwachen Überexpression durchgeführt werden. Um das Enok Protein trotz dieser Schwierigkeiten analysieren zu können, wurden zwei Herangehensweisen gewählt. Erstens wurde der Antikörper über eine selbstgemachte kovalentbindende *Cyanogen bromide*-Sepharosesäule (CNBr-Säule) aufgereinigt und aufkonzentriert, und zweitens das getagte Enok Konstrukt kloniert.

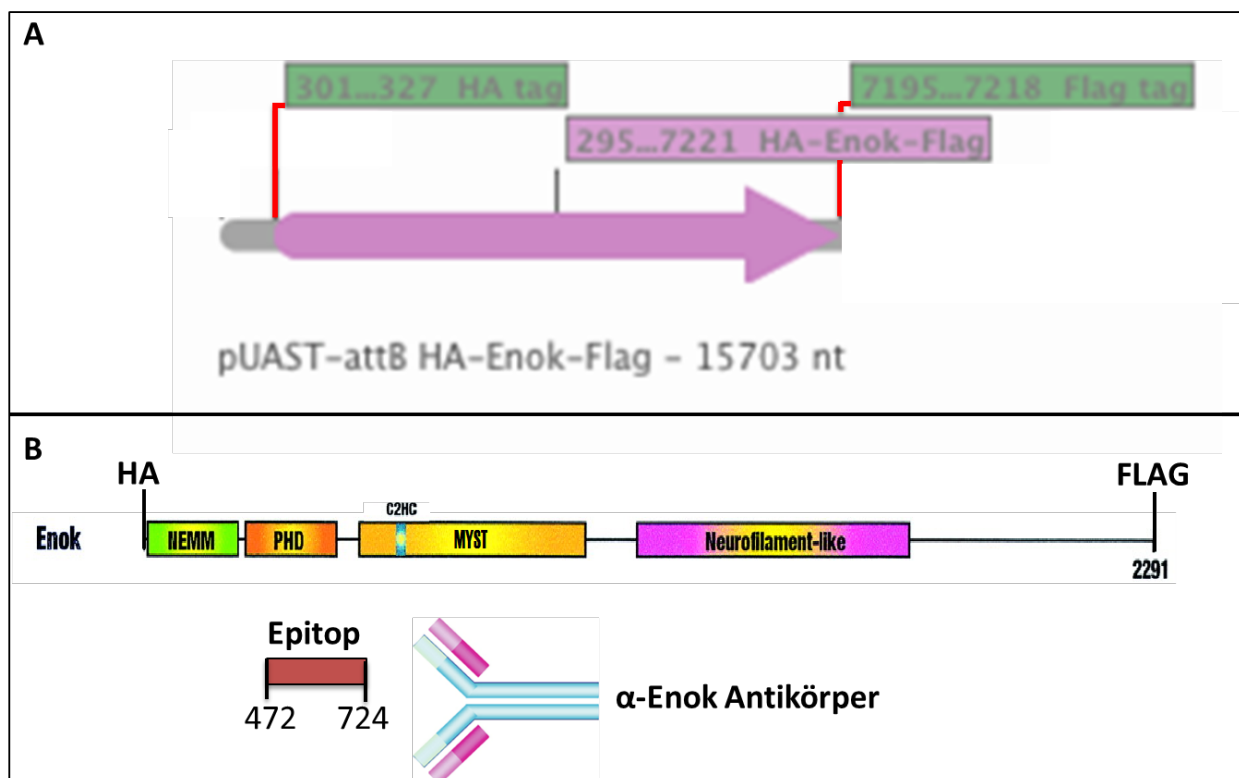


Abbildung 3.1: Getagtes Konstrukt der Enok-cDNA und das getagte Enok Protein.

(A) Konstrukt pUAST-attB-HA-Enok-Flag. Enok cDNA (magenta) ist flankiert von Tags (grün). N-terminal ist ein HA-Tag und C-terminal ist ein Flag-Tag zu sehen. Das fertige Konstrukt heißt pUAST-attB-HA-Enok-Flag (B) Darstellung der Enok-Proteindomänen. Details zu den Domänen sind im Text zu finden. MYST: MOZ (monocytic leukaemia zinc finger protein), YBF2/SAS3 (something about silencing), SAS2 und TIP60 (tat-interactive protein, 60 kDa); NEMM: N-terminaler Teil von Enok, MOZ or MORF; PHD: PHD Zinkfinger; Neurofilament-like: Neurofilament-ähnliche Domäne. Zusätzlich sind die HA- und FLAG-Tags eingezeichnet. Das Epitop für die Herstellung des α -Enok Antikörpers beträgt 252 Aminosäuren. Die Position ist in der Darstellung eingezeichnet. (modifiziert nach Yang, 2004).

Sowohl der aufgereinigte Antikörper, als auch das klonierte Konstrukt, wurden mittels Überexpression in Zellkultur verifiziert. Schneiderzellen wurden in diesem Fall mit drei Konstrukten transfiziert und mit Hilfe der Immunfluoreszenz analysiert. Die Konstrukte waren *UAS-Ne.GFP*, *UAS-2xTag-Enok*, *pAct-Gal4*. Die Fluoreszenzfärbungen der Zellen sind in der Abbildung 3.2A,B und Abbildung 7.1A,B dargestellt. Durch die parallele Transfektion mit *UAS-Ne.GFP* und die Kontrollfärbung mit dem GFP Antikörper konnten die positiv transfizierten Zellen identifiziert werden. Zusätzlich wurden die Zellen mit dem α -Enok Antikörper und

jeweils mit dem α -HA- oder dem α -FLAG-Antikörper gefärbt. Die Färbung der Antikörper beschränkte sich nur auf den Kern der Zelle (Abb. 3.2 A,B und Abb. 7,1 A,B), was mittels der Co-Färbung mit dem Chromatinmarker mit 4',6-Diamidino-2-Phenylindol (DAPI) verifiziert wurde.

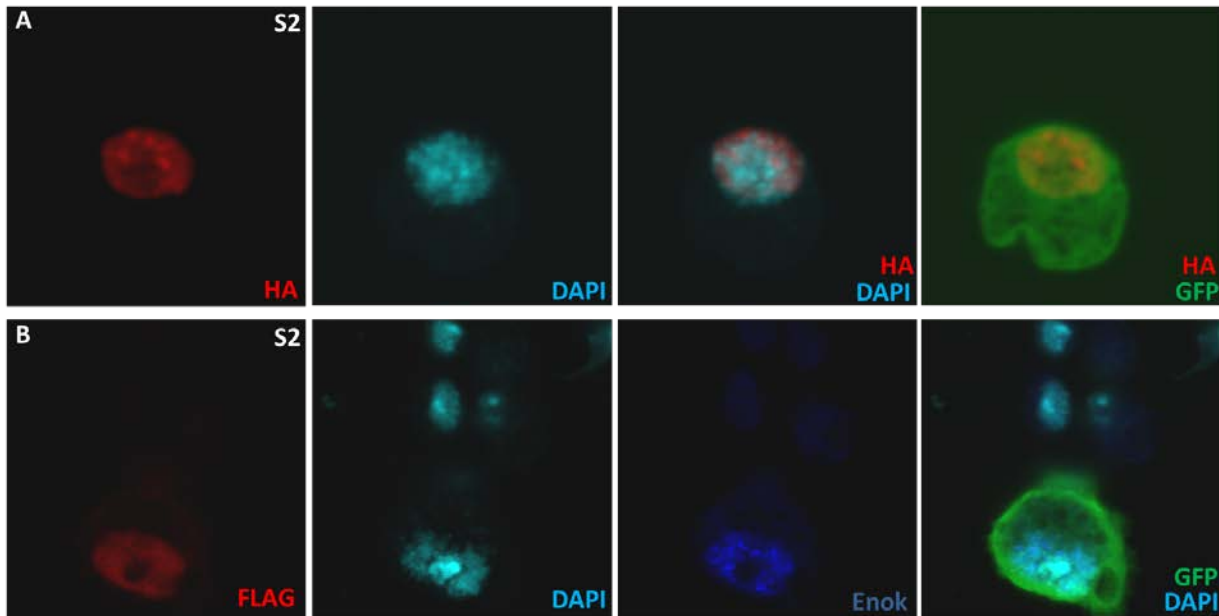


Abbildung 3.2: Analyse des pUAST-attB-HA-Enok-FLAG Konstruktes in S2 Zellen.

UAS-Ne.GFP (grün) wurde als Kontrolle für die Transfektionseffizienz genutzt. DAPI (cyan) ist ein Kernlokalisationsmarker. (A) Die spezifische Färbung gegen den HA-Tag (rot) zeigt eine Kernlokalisierung. (B) Die spezifische Färbung gegen den FLAG-Tag (rot) sowie gegen Enok (blau) zeigt eine Kernlokalisierung. Primäre Antikörper: (A) rat α -HA; chicken α -GFP (B) mouse α -FLAG; rat α -Enok; chicken α -GFP

Durch das detektierte Signal des α -HA- oder des α -FLAG- Antikörpers im Kern konnte zusätzlich bestätigt werden, dass das Anfügen der Tags funktioniert und der Lokalisation des Proteins nicht geschadet hat. Die Spezifität des α -Enok Antikörpers wurde über die Kolokalisation mit dem α -FLAG-Antikörper verifiziert (Abb. 3.2B, Abb. 7.1B).

Nach der Herstellung transgener Fliegenlinien, die das zweifach getagte Konstrukt enthielten, wurde die Expression des Enok Proteins auch im lebenden Tier im Gewebe innerhalb der natürlichen Umgebung untersucht. Bei einer Überexpression von Enok im larvalen Gewebe wurde die Funktionalität des Konstrukts mit dem α -Enok Antikörper nachgewiesen. Jedoch gab es in diesem Fall eine Abweichung zu den Ergebnissen der Zellkultur-Experimente. Die Expression desselben Überexpressionskonstrukts *UAS-2xTag-Enok* in 3 unabhängigen transgenen Linien (6,14,22 in Abbildung 3.2 und 7.2) im endogenen Gewebe zeigte bei der Doppelfärbung des α -Enok Antikörpers mit entweder dem α -HA oder mit dem α -FLAG Antikörper ein andersgeartetes Muster. Im Falle des α -FLAG Antikörpers gab es eine komplette Überlagerung mit dem α -Enok Antikörper (Abb. 3.3A,A',A'' und 7.2 A,A',A''). Im Fall des α -HA Antikörpers gab es eindeutige Unterschiede. Das Signal des α -HA Antikörpers zeigte keine vollständige Kolokalisation mit dem α -Enok Antikörper, sondern konnte zusätzlich in den umliegenden Zellen detektiert werden (Abb. 3.3B,B',B'' und Abb. 7.2B,B',B''). Die

Zellen, welche das Signal zeigten, gehörten jeweils zu klonalen Linien, die aus einer Mutterzelle entstanden sind. Das Signal des spezifischen α -Enok Antikörpers konnte in den Mutterzellen nachgewiesen werden, aus welchen zahlreiche Tochterzellen hervorgehen. Diese Tochterzellen enthielten im Gegensatz zu ihren Mutterzellen nur noch das Signal des α -HA Antikörpers. Dieses Ergebnis impliziert wie wichtig es ist, eingebrachte Konstrukte im endogenen Gewebe zu exprimieren, um die vollständige Funktion des Proteins fassen zu können. In diesem Fall konnte nachgewiesen werden, dass möglicherweise eine Spaltung des Proteins Enok als post-transkriptionale Modifikation stattfindet, abhängig davon in welcher Nische sich das Protein befindet und welche Aufgabe es dort übernimmt.

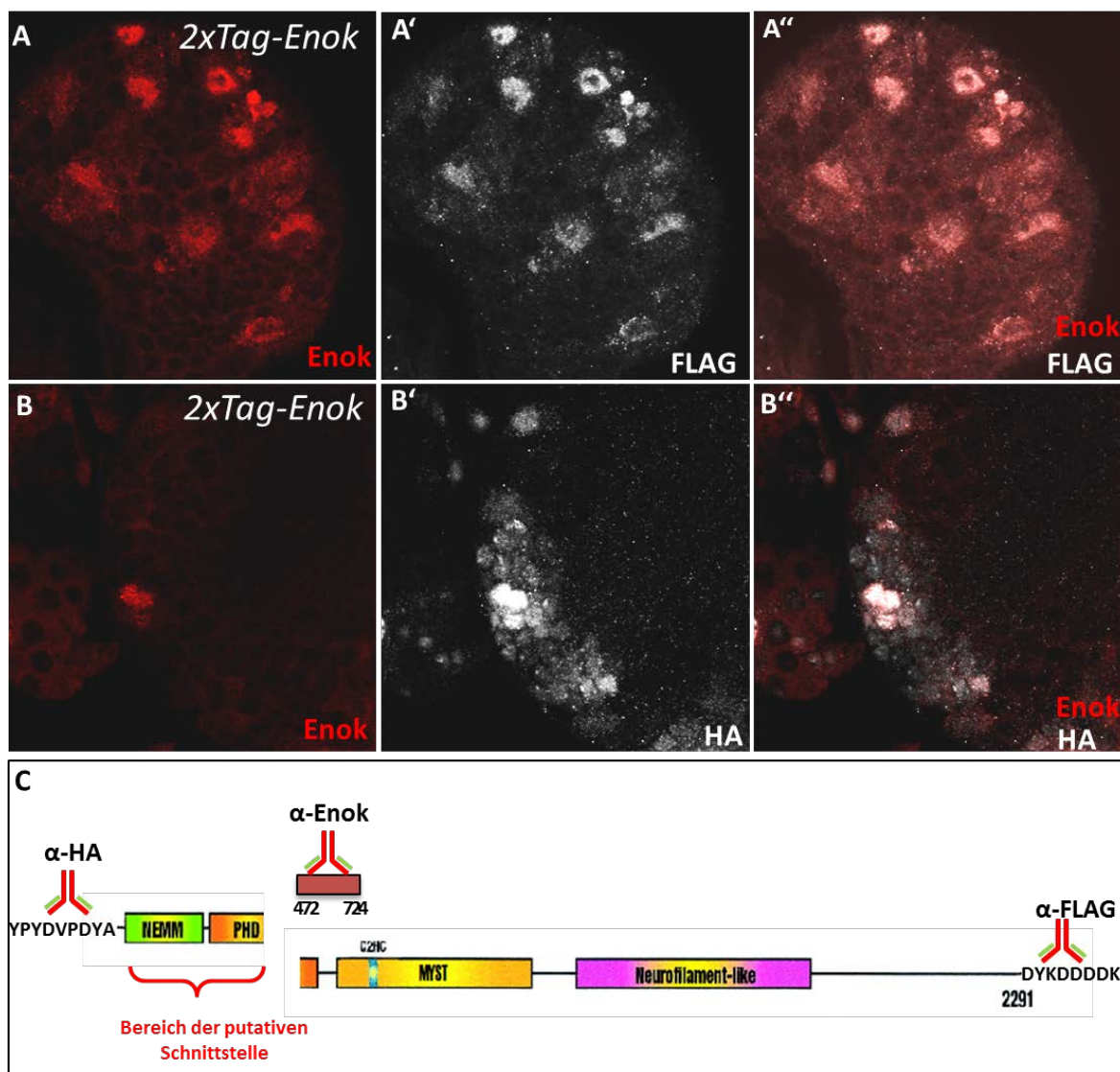


Abbildung 3.3: Expression des getaggtten Enok-Konstrukts in Gewebe.

(A-A'') α -Enok Antikörper (rot) zeigt das überexprimierte Enok Signal. Überlagerung mit α -FLAG Antikörper (weiß) ist 100%tig. (B-B'') α -Enok Antikörper zeigt das Enok Signal. Überlagerung mit HA-Signal (weiß) ist nur in der Mutterzelle zu sehen. Die Tochterzellen zeigen nur das HA-Signal. (C) Mögliche Position der putativen Schnittstelle und die potenziellen Schnittprodukte. Darstellung der Enok-Proteindomänen und die Detektionsstellen der jeweiligen Antikörper. Primäre Antikörper: (A-A'') rat α -Enok; mouse α -FLAG; (B-B'') rat α -Enok; rabbit α -HA.

In Abbildung 3.3C ist der mögliche Spaltungsbereich dargestellt. Da der α -Enok AK ein

polyklonaler Antikörper ist, beschränkt sich seine Erkennungsstelle auf ca. 480 Aminosäuren mitten im Protein. Der anti-HA Antikörper detektierte demnach einen Abschnitt von maximal 479 Aminosäuren. Dieses Spaltprodukt würde aus der NEMM-Domäne (N-term Region of ENOK, MOZ oder MORF) bestehen, welche die Histon-Linker H1 und H5 Domäne (H15), eine der zwei plant homeo Domänen (PHD) und das nukleare Lokalisationssignal enthält. Nach dieser posttranskriptionalen Modifikation würde dieses Spaltprodukt, welches an die Tochterzellen weitergegeben wird, möglicherweise eine andere Funktion übernehmen. Als dieses entstandene Produkt mit Hilfe des BLAST-Programms (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>; Altschul et al., 1997; Altschul et al., 2005) analysiert wurde, bestand die größte Identität (27%) zum Protein Requiem (d4). Die Funktion Requiem besteht in der Kontrolle von Apoptose und Pluripotenz im neuronalen System (Yang und Ullah, 2007; Wang et al., 2006). Möglicherweise könnte das Spaltprodukt von Enok eine ähnliche Aufgabe übernehmen, und damit das Teilungspotenzial der Tochterzellen kontrollieren und wenn es nötig ist, terminieren.

3.1.2 Lokalisation und mögliche Aufgabe des Enok Proteins

Wie für eine putative Histon-Acetyltransferase aus der Familie KAT6B vorhergesagt, die mehrere Nuclear localisation sequenses (NLS-Motive) besitzt, konnte mit dem α -Enok Antikörper (AK) und mit einer Gegenfärbung mit dem α -Lamin AK nachgewiesen werden, dass das Protein im Kern zu finden war (Abb. 3.4, Abb. 7,3).

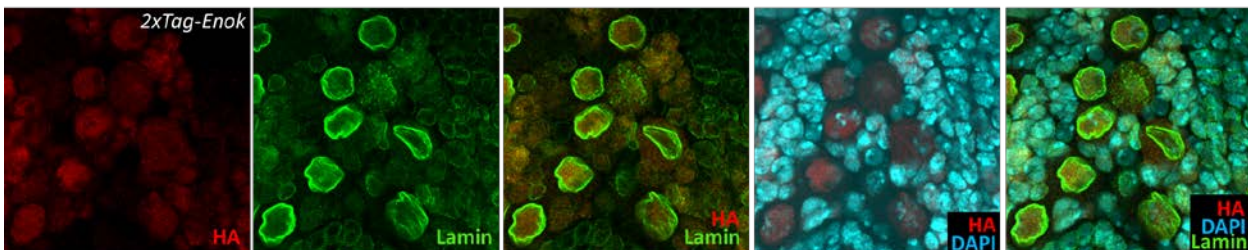


Abbildung 3.4: Detektion der Lokalisation des getaggen Enok-Proteins im Gewebe.

α -HA Antikörper (rot) zeigt die Expression des Konstrukts pUAST-attB-HA-Enok-FLAG./2xTag-Enok. α -Lamin Antikörper (grün) detektiert die Kernhülle und trennt das Zytoplasma von dem Kerninneren. 2xTag-Enok wird im Kerninneren exprimiert. Das Signal ist nur zu sehen, wo das Chromatin aufgelockert ist und sich nicht mit DAPI (cyan) überlagert. Primäre Antikörper: rabbit α -HA; mouse α -Lamin

Der α -Lamin AK detektierte die Kernmembran einer Zelle, was zusätzliche Informationen zu der DAPI Färbung lieferte. Das Enok Protein befand sich ausschließlich innerhalb dieser Membran. Wie in dieser Abbildung ebenfalls zu sehen ist, ist Enok nur dort zu finden, wo das Chromatin im aufgelockerten und nicht im kondensierten Zustand vorlag. Dies kann man an der schwächeren DAPI-Färbung erkennen, denn der Farbstoff interkaliert nur mit kondensierter DNA. Dies würde auch der Funktion einer HAT der KAT6B Familie entsprechen, die dafür sorgt, dass das Chromatin aufgelockert wird und die DNA dadurch für die

Transkriptionsmaschinerie zugänglich ist.

Wie schon in der Dissertation von Ingo Zinke erwähnt (2003), hat Enok die größte Homologie zu dem murinen Protein Querkopf und zu dem humanen Protein MORF. Beide Proteine gehören zu der Kategorie der Lysin-Acetyltransferasen (KATs) der Familie 6B. Wie in der schematischen Darstellung (Abb. 1.1) gezeigt wird, acetylieren die Mitglieder dieser Familie nur das Lysin 14 am Histon 3. Um die Funktionshomologie zu seinen putativen Familienmitgliedern nachweisen zu können, sollte als Erstes das Acetylierungsziel untersucht werden, durch welches die HAT-Funktion der Chromatinauflockerung erfolgen kann. Da der Antikörper nicht zur Verfügung stand, der spezifisch diese Modifikation am H3K14 erkennt, musste die transkriptionelle Aktivität an Histon 3 indirekt nachgewiesen werden. Die Aktivität der Transkription kann auf zwei Arten stattfinden. Im ersten Fall wird das Lysin 9 acetyliert (acH3K9) und im zweiten Fall findet die Phosphorylierung des Serin 10 (pH3S10) und die Acetylierung des Lysin 14 (acH3K14) gleichzeitig statt. In der Doppelfärbung von acH3K9 und Enok war nur selten eine Überlappung der beiden Proteine vorzufinden. Im seltenen Fall einer Kolokalisation war das Chromatin in der Zelle kondensiert und nicht aktiv gewesen war (Abb. 3.5A,A' und Abb. 7.3A,A').

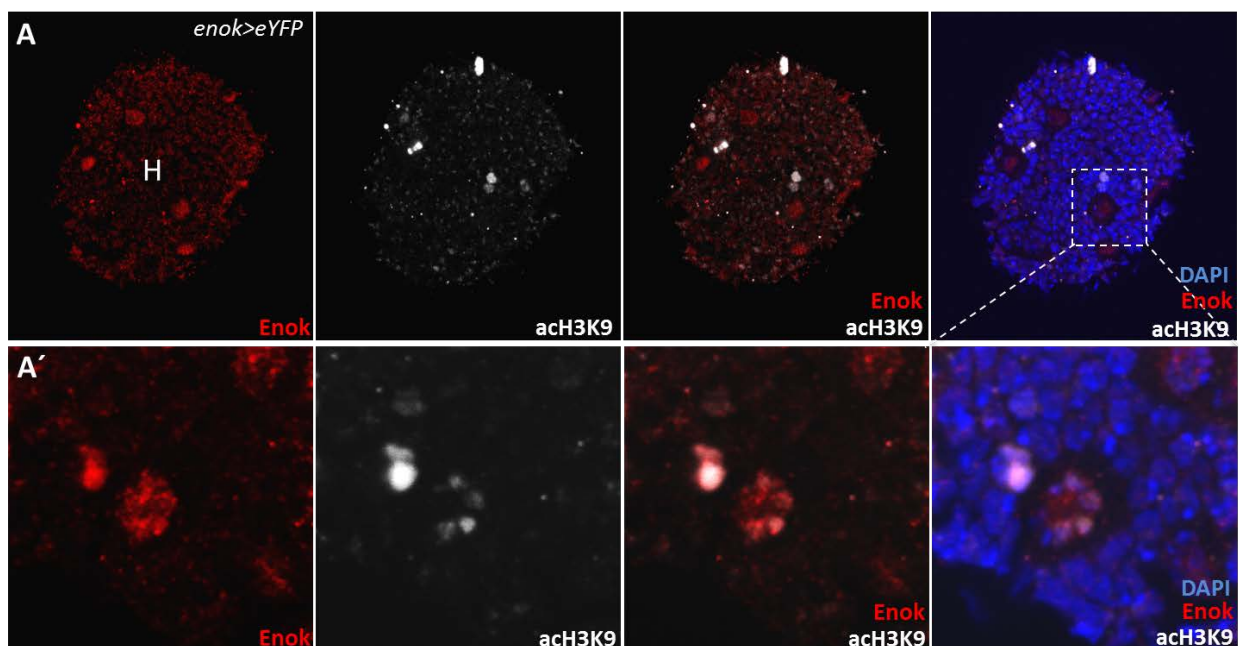


Abbildung 3.5: Kolokalisation von Enok mit einem Histon Marker.

Genetischer Hintergrund *enok>eYFP*. (A) Kolokalisation von Enok (rot) mit acetyliertem Histon3 Lysin9 (acH3K9) (weiß). Geringe Kolokalisation ist in den Neuroblasten zu sehen. (A') Detailabbildung einer positiven Zelle für Enok und acH3K9. Chromatin ist mit DAPI (blau) gefärbt und ist kondensiert, keine transkriptionelle Aktivität. Primäre Antikörper: (A-A') rat α -Enok; mouse α -acH3K9.

In einer Doppelfärbung mit dem α -pH3S10 und dem α -Enok Antikörper, die deutlich häufiger vorkam, war eine Kolokalisation und eine Auflockerung des Chromatins zu beobachten (Abb. 3.6A,A'). Mit hochauflösender Mikroskopietechnologie (STED) konnte die Kolokalisation von Enok und pH3S10 bestätigt werden (Abbildung 7.5.). Hierbei wird die konfokale Auflösung von ~40nm auf ~20nm verbessert. Der Multiprotein-Komplex der HAT benötigt die pH3S10

Modifikation als Erkennungsstelle, um die Acetylierung am H3K14 durchführen zu können. Diese Kolokalisation deutet auf transkriptionell aktives Chromatin hin, die ihrerseits auf die putative Acetylierung durch Enok hindeutet. Deshalb ist es wahrscheinliche, dass Enok ebenfalls als Mitglied der KAT6B Familie dieselbe Funktion übernimmt wie Querkopf und MORF.

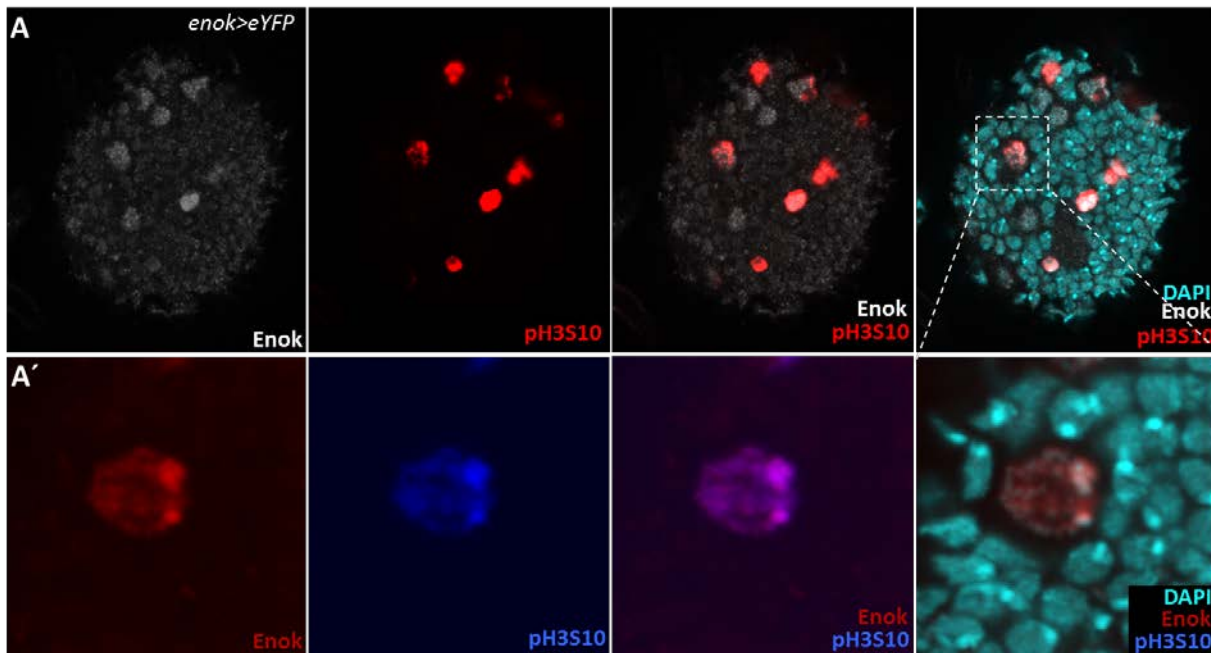


Abbildung 3.6: Kolokalisation von Enok mit transkriptionellem und mitotischem Marker.

Genetischer Hintergrund *enok>eYFP*. (A) Enok (weiß) ist kolokalisiert mit phosphoHiston3Serin10 (pH3S10) (rot). Die Doppelfärbung ist in vielen Neuroblasten zu sehen. Chromatin ist nicht kondensiert. (A´) Detailabbildung einer Zelle mit der Doppelfärbung von Enok (rot) und pH3S10 (blau). Chromatin ist transkriptionell aktiv (cyan), wenn Enok im Nukleus detektiert werden kann. In mitotisch nicht aktiven Zellen, ist keine Kondensation zu sehen. Hinweis auf eine HAT Aktivität am Histon3 Lysin14. Primär Antikörper: (A-A´) rat α -Enok; rabbit α -pH3S10

3.1.3 Acetylierung durch Enok

Da für die HAT-Funktionalität ein Multiprotein-Komplex benötigt wird, um die Acetylierung durchführen zu können, ist es entscheidend, dass die Subeinheiten untereinander in ihrer Menge streng reguliert werden. Die Theorie der Balance besagt, dass bei einer starken Überexpression einer der Einheiten ein Verlust-Phänotyp entsteht, wie bei einer Deletionsmutation. Da der *enok*-Überexpressionsphänotyp genau das andeutet, sollte auf zelluläre Ebene untersucht werden, ob die Theorie bei Enok ebenfalls zutrifft und das Acetylom der Zelle beeinflusst wurde. Dies wurde mit zwei unabhängigen Experimenten untersucht. In Abbildung 3.7 und Abbildung 7.6 wurden die Experimente zusammengefasst, in denen die Acetylierungslevel *in situ* mittels einer Antikörperfärbung (Abb. 3.7A und 7.6A) und mittels eines Western Blots (Abb. 3.7C und Abb.7.6D) mit Hilfe eines α -acLys AK analysiert wurden. Der benutzte AK zeigte die globalen Acetylierungslevel aller Proteine, die

im Gewebe acetyliert wurden. Für beide Experimente wurde das Enok Protein auf unterschiedliche Weisen überexprimiert. Im Fall der Antikörperfärbung wurde im Gewebe das Flip-Out System benutzt, um klonale Überexpression des Enok Proteins zu erreichen. Dadurch wurden Zellen im selben Gewebe nebeneinander generiert, die verschiedene Konzentrationen von Enok enthielten. In diesem Experiment sah man, dass die Zellen, welche ein hohes Level von Enok aufwiesen, gleichzeitig schwächere Level von acetylierten Lysinen (acLys) im Kern zeigten (Abb. 3.7A). Umgekehrt waren Proteine in Zellen mit endogenem Enok Level viel stärker acetyliert. Dieses Experiment zeigte, dass bei einer Überexpression von Enok, die deutlich gezeigt und von der normal Situation unterschieden werden konnte, tatsächlich die Level der Acetylierung deutlich reprimiert wurden. Das bestärkt die vorgegebene Hypothese, dass die Überexpression einer Subeinheiten zu einem Funktionsverlust des gesamten Komplexes führt.

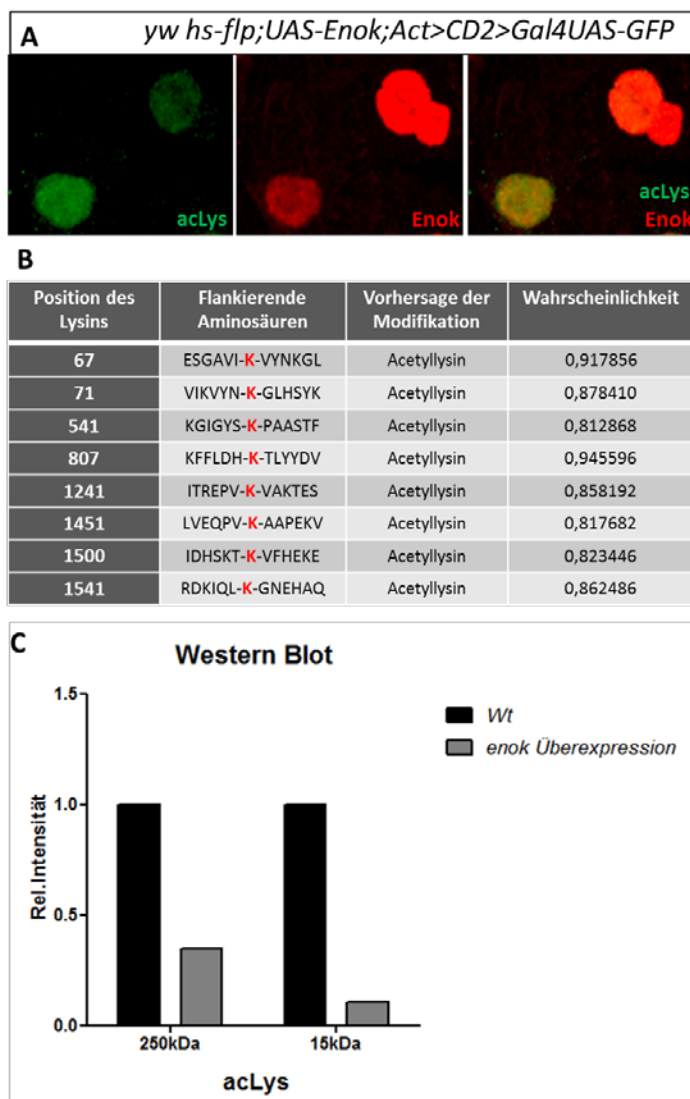


Abbildung 3.7:
Acetylierungsaktivität von Enok.

(A) Klonale Analysen der Überexpression von Enok im Gewebe mit der Linie *yw hs-flp;UAS-Enok;Act>CD2>Gal4UAS-GFP*. Die globale Acetylierung wird mit dem α -acLysin Antikörper (grün) detektiert. Enok (rot) wird in den Zellen rechts oben überexprimiert. Die Zelle links unten zeigt das endogene Signal. Die Überlagerung der beiden Antikörper zeigt, dass bei einer Überexpression von Enok das Signal des acLys Antikörpers reduziert ist, im Vergleich zur endogenen Situation. (B) Die putativen Selbstacetylierungsstellen des Enok Proteins. *In silico* Analyse wurde mit dem PLMLA-Vorhersageprogramm durchgeführt. Es sagt die Lysinmethylierungs- und Lysinacetylierungsstellen vorher (Shi et al., 2012). Aufgeführt sind nur die ersten acht putativen Stellen, die die höchste Wahrscheinlichkeit zwischen 0,918-0,862 aufwiesen. (C) Die vorläufige Western Blot Analyse der Acetylierung des gesamten Proteoms wurde mit dem α -acLys Antikörper durchgeführt. Die Acetylierungslevel der Überexpression wurde mit der Wildtypsituation verglichen. Die Acetylierungslevel der Banden in der Höhe von 250kDa und ca.15kDa wurden in der Überexpression von Enok sehr stark reduziert. Die Stärke der Banden wurde mittels des ImageJ Geltool quantifiziert. Primäre Antikörper: (A,C) rabbit α -acLys; (A) rat α -Enok.

Ebenfalls wurde untersucht, ob und wie die Acetylierungslevel im ganzen Organismus betroffen sind oder ob bestimmte Proteine unterschiedliche Acetylierungslevel aufweisen. Enok wurde in diesem Fall im zentralen Nervensystem überexprimiert und eine α -acLys Färbung durchgeführt (Abb. 7.6A). An der GFP-Expression kann man erkennen, in welchen

Bereichen Enok überexprimiert wird. In den Bereichen, die durch eine weiße Linie eingerahmt und welche positiv für GFP sind, wurde eine geringeren Intensität der α -acLys Färbung beobachtet. Diese erste Experimentreihe mit verschiedenen Ansätzen zeigte vielversprechende Ergebnisse, die weiter verfolgt werden sollten. Ebenfalls wurde biochemisch versucht diese Veränderung in den Acetylierungsleveln nachzuweisen. Es wurden Lysate von Wt-Larven und von *enok*-Überexpressionslarven hergestellt, in ihrer Proteinkonzentration angeglichen und nach SDS-PAGE und Western Blots mit Hilfe des α -acLys AKs detektiert. Hier ebenfalls in diesem vorläufigen Experiment waren einige Banden, die in der Wt-Probe detektiert wurden, im Fall der Überexpression entweder abgeschwächt oder fast nicht mehr zu erkennen. Zwei Banden waren dabei besonders auffällig. Eine Bande im Bereich zwischen 10-15 kDa und eine bei über 250 kDa (Abb. 3.7C; Anhang Abb. 7.6D). Möglicherweise gehörte die kleinere Bande bei 10-15 kDa, die bei der Überexpression kaum zu sehen war, zum Histon 3 Lysin 14, welches als das spezifische Ziel von Enok nicht mehr acetyliert wurde. Diese Bande würde mit der Größe eines Histons übereinstimmen, jedoch müsste eine weitere Analyse mit einem spezifischen AK gegen H3K14 durchgeführt werden. Dennoch ist dies das erste Zeichen für eine beeinträchtigte Histonacetylierung durch ein erhöhtes Enok Proteinlevel. Die zweite Bande, welche über der Höhe von 250kDa lag, könnte möglicherweise Enok selbst sein. Wie mit dem PLMLA-Vorhersageprogramm, welches mögliche Lysinmethylierungs- und Lysinacetylierungs-Stellen vorhersagt, analysiert (Shi et al., 2012), weist Enok selbst mehrere Acetylierungsstellen auf (Abb. 3.7B). Die Möglichkeit der Selbstacetylierung ist bei den Enok-Homologen wie Querkopf und MORF ebenfalls gegeben (Yang et al., 2012; Klein et al., 2014). Die PLMLA-Vorhersage der beiden Proteine zeigte einige Übereinstimmung in dem putativen Acetylierungssequenzen zwischen Enok, Querkopf und MORF (Anhang Abb. 7.6B,C (grün markiert)), die konserviert sind. Diese *in silico* Vorhersagen und der Einfluss von Enok auf das Acetylom *in vivo* zeigen sehr vielversprechende Hinweise auf die posttranslationale Modifikation von Enok und seine Funktion. Wenn diese Funktion durch die Übersättigung und die fehlende Komplexbildung gestört wäre, könnte Enok sich selbst nicht mehr acetylieren und würde dadurch seine Funktion verlieren. Es bedarf allerdings weiterer Experimente, um eine fundierte Aussage machen zu können. Zusätzlich müssen weitere Experimente durchgeführt werden, um die Acetyl-Transferaseaktivität direkt nachzuweisen.

3.2 Expressionsanalyse von *enok-Gal4*

In der Diplomarbeit (Moderau, 2009) wurde die Überexpression des Enok Protein unter Benutzung verschiedenster gewebespezifischer Treiberlinien ausführlich analysiert und beschrieben. Die von Ingo Zinke (Dissertation 2003) und Xin und Kollegen (2013) durchgeführten Studien zeigten bereits die Überexpressionsexperimente, welche die Funktioanalität von Enok untersuchten. Das Ziel der oben genannten Diplomarbeit (Moderau,

2009) war es den *rotkehlchen*-Phänotyp kopiert, welcher bei dem Verlust des Proteins auftaucht. Als Überexpressionskonstrukt, welches für alle weiteren Überexpressionsanalysen benutzt wurde, war das Reporterkonstrukt *pRed3-4B* -im Folgenden als *UAS-Enok* bezeichnet- benutzt, welches von Ingo Zinke hergestellt wurde. Die verwendeten Treiberlinien wurden nach der Spezifität ihres Expressionsmusters und der Aktivierungszeit ausgewählt, um die Funktion des Enok Protein in einem bestimmten Gewebe festlegen zu können. Durch diese Analyse des Phänotyps und des Verhaltens wurden viele Erkenntnisse gewonnen, jedoch konnte der Effekt nicht auf ein einzelnes Gewebe zurückgeführt werden. Dies ließ vermuten, dass Enok sehr früh in der Entwicklung eine wichtige Rolle spielt und ubiquitär exprimiert wird. Um das endogene Muster von Enok untersuchen zu können und mehr Klarheit zu erlangen, wurden zwei unabhängige Konstrukte hergestellt, aus welchen zwei Enok-Treiberlinien generiert wurden. Diese wurden anschließend mit dem α -Enok Antikörper verifiziert.

3.2.1 Herstellung der *enok-Gal4* Linie

Zur Herstellung der *enok-Gal4* Linie wurde der genomische Bereich zwischen *enok* und dem benachbarten Gen *genghis khan* (*gek*) ausgewählt, zusätzlich wurden die möglichen Transkriptionsvarianten gründlich analysiert. In Abbildung 3.8 wurden schematisch der genomische Bereich, die Transkripte, und der putative Kontrollbereich der transkriptionellen Aktivität zwischen *enok* und *gek* zusammengefasst dargestellt.

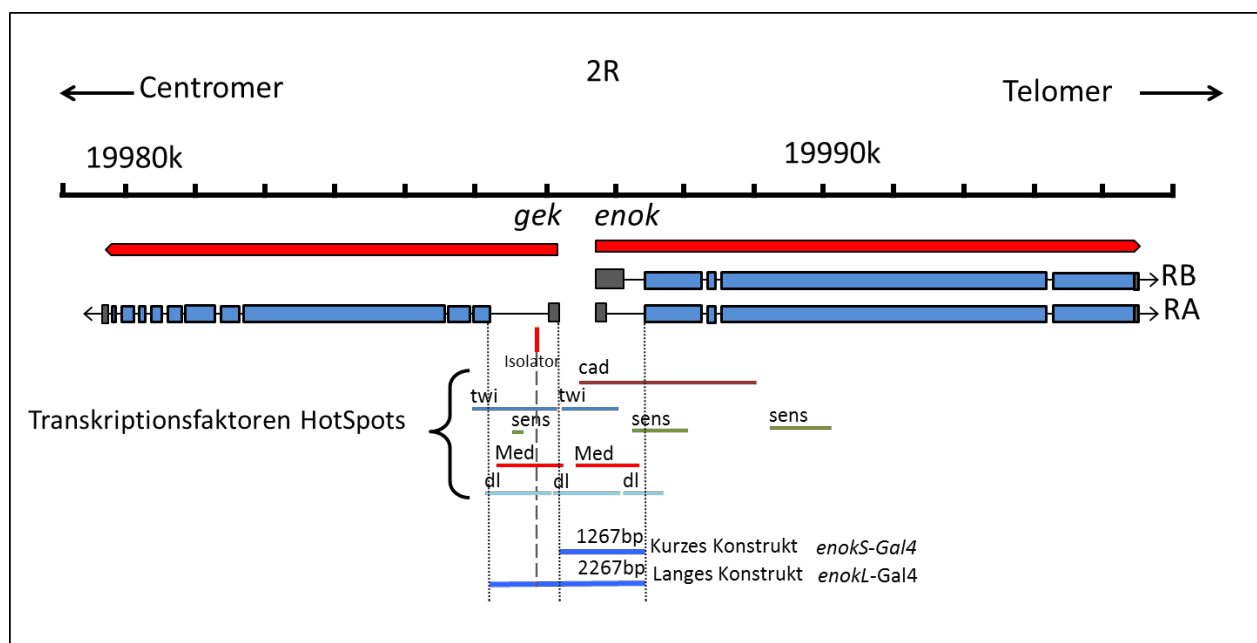


Abbildung 3.8: Der *enok*-Lokus.

enok ist auf dem rechten Arm des zweiten Chromosoms lokalisiert. Stromaufwärts ist das Nachbargen *gek* zu finden. Die Pfeilspitze des roten Balkens zeigt die Orientierung und den jeweiligen Genbereich an. In blau sind die *enok*- bzw. *gek*-Exons zu sehen. *enok* besitzt zwei Transkripte RB und RA. Die HotSpots der verschiedenen Transkriptionsfaktoren im *enok*-Promotorbereich sind mit verschiedenfarbigen Balken markiert. In hellblau dargestellt und durch gepunktete Linien eingegrenzt, sind die gewählten Promotorbereiche. Aus dem kurzen Konstrukt mit 1267 Basenpaaren (bp) entstand die *enokS-Gal4* Linie und aus dem langen Konstrukt mit 2267bp die *enokL-Gal4* Linie. Durch die senkrecht gestrichelten Linien ist die Position des Isolators angedeutet. *cad*, caudal; *dl*, dorsal; *Med*, Medea; *sens*, sensless; *twi*, twist.

Die neuesten Studien, welche bei *flybase.org* veröffentlicht wurden, hatten gezeigt, dass *enok* zusätzlich zum bereits bekannten und von Ingo Zinke beschriebenen Transkript RA (Zinke, 2003), ein zweites Transkript RB besitzt. Das neue Transkript RB hat im Vergleich zu RA einen um 269bp längeren 5´ - *Untranslated Region* (UTR)-Bereich. Durch erste Vorexperimente wurde festgestellt, dass diese Transkripte möglicherweise gewebespezifisch exprimiert wurden (Daten nicht gezeigt). Diese Spezifität kommt mutmaßlich durch die Transkriptionsfaktoren, die sich im Promotorbereich befinden, zu Stande. Um einen Promotorbereich für Enok auszuwählen, welcher sowohl die zeitliche als auch die räumliche Expression von Enok widerspiegelt, wurden zwei Konstrukte geplant. In Abbildung 3.8 ist ebenfalls das Transkript von *gek* zu sehen, welches eine Rolle bei der Planung spielte. Denn der Bereich zwischen dem ersten Exon von *gek* und dem ersten Exon von *enok* wurde für die Promotorstudie ausgesucht. In diesem Bereich befinden sich mehrere regulatorische Einheiten wie Bindestellen für bestimmte Transkriptionsfaktoren und ein Isolator der Klasse I. Aufgrund der Präsenz eines Isolators war es notwendig zwei Promotorkonstrukte zu planen und zusätzlich die Expression der *gek-Gal4* zu testen, da ein Isolator verschiedene genetische Kontrollelemente wie Enhancer und Promotor voneinander abgrenzen und damit isolieren kann (Gaszner und Felsenfeld, 2006).

Die vorhandenen Hot Spots der Transkriptionsbindestellen konnten in zwei Gruppen aufgeteilt werden. In der ersten Gruppe waren Bindestellen für Promotoren enthalten, welche sich komplett innerhalb der Bereiche zwischen dem 5´-UTR von *gek* und dem ersten Exon von *enok* befanden. Die daran bindenden Transkriptionsfaktoren waren Twist (*twi*) und Medea (*Med*). Die Aktivität dieser beiden Transkriptionsfaktoren beschränkt sich auf sehr bestimmte Gewebe, welche Auskunft über mögliche Expressionsorte von *enok* geben. Twist ist in der Larve im zentralen Nervensystem (ZNS), im Hinterdarm, in malphigischen Gefäßen und in den Tracheen aktiv (*flybase.org*). Expression von Medea findet man im larvalen ZNS, in Tracheen und im Karkass. Aufgrund dieser Fakten wurde ein „kurzes Konstrukt“ (*enokS-Gal4*) mit 1267bp geplant (Abb 3.8). Das „lange Konstrukt“ (*enokL-Gal4*) mit 2267bp überspannte den Bereich zwischen dem ersten Exon von *gek* und dem zweiten Exon von *enok*. Der Isolator befindet sich in diesem Bereich und würde theoretisch eine Abgrenzung der Promotoren und Enhancer, welche sich stromaufwärts und stromabwärts davon befinden, bieten. Durch diese Verlängerung des Konstrukts würden zusätzliche Bindestellen für Transkriptionsfaktoren eingeschlossen. Diese gehören zu zusätzlichen *twi* und *Med* Hot Spots und zwei weiteren Transkriptionsfaktoren *senseless* (*sens*) und *dorsal* (*dl*) haben dort ihre Bindestellen. *Dorsal* ist ein ubiquitärer Transkriptionsfaktor und ist in vielen Geweben zu finden. Dagegen ist *sens* nur in den Speicheldrüsen exprimiert. Die Rettungskonstrukte, welche von Ingo Zinke hergestellt wurden (Zinke, 2003), unterstützten die ausgewählten Bereiche der beiden *Gal4* Konstrukte.

Aufgrund dieser Analysen wurden beide Konstrukte geplant und in einen *Gal4*-Vektor *pCasperAUG-Gal4-X* kloniert. Transgene Fliegen wurden generiert und mit Hilfe des

Reporterkonstruktes *UAS-GFP.nls* analysiert. Durch die kernlokalisierte Expression des GFPs war es möglich das Reportersignal von einer Autofluoreszenz zu unterscheiden. Anschließend wurden beide Linien mit der Effektorlinie (Responder) *UAS-Enok* gekreuzt und die Nachkommen wurden phänotypisch analysiert und mit dem *rotkehlchen*-Phänotyp verglichen.

3.2.2 Expression der *enokL-Gal4* und der *enokS-Gal4*

Mit Hilfe der Promotor-Linien konnte die Expression genauer und auf Zellebene analysiert werden. Anschließend wurde die Echtheit des Signals mittels des anti-Enok Antikörpers verifiziert. Die Expressionsmuster der beiden Treiber-Linien waren sehr ähnlich. Beide Konstrukte zeigten eine ubiquitäre Expression im Embryo (Abb. 3.9 A,A',B,B' und Abb. 7.7 A,A',B). Die Gegenfärbungen entweder mit dem Neuroblastmarker α -Asense oder mit dem Pangliamarker α -Repo zeigten beide Überlappungen der Signale (Abb. 3.9 A',B' und Abb. 7.7A',B). Daraus kann man schließen, dass Enok unter anderem auch im ZNS exprimiert wird. Diese zelluläre Analyse erlaubte die embryonale Färbung, die bei Ingo Zinke im embryonalen und larvalen ZNS mittels einer *in situ* Hybridisierung gezeigt wurde (Zinke, 2003), besser und genauer aufzulösen. Ebenfalls konnte die von Scott und Kollegen (2001) beschriebene Funktion von Enok in der Proliferation der Pilzkörperzellen mit der Expression der *Gal4*-Linien in den neuronalen Stammzellen (Asense-positive Zellen) erklärt werden.

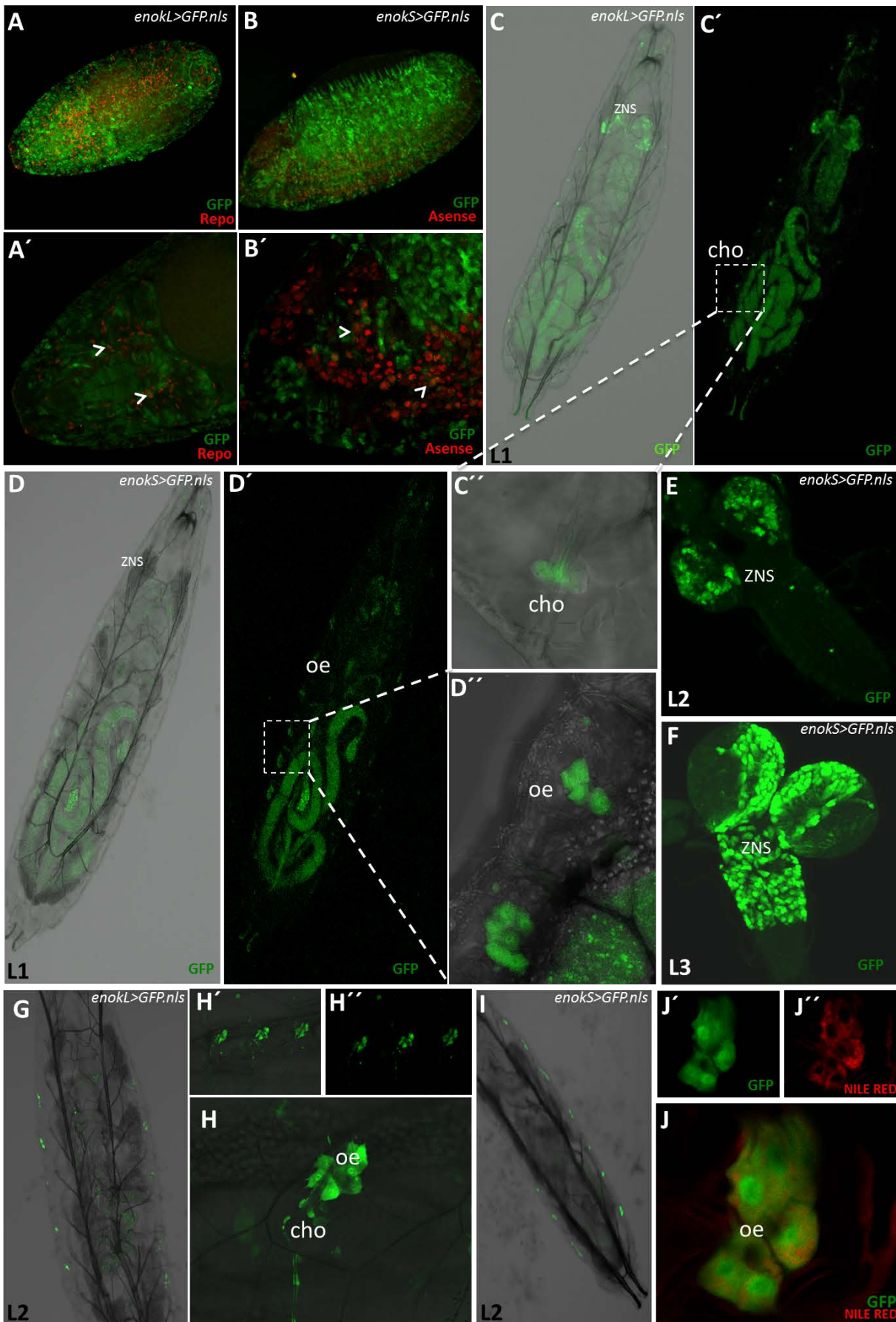


Abbildung 3.9: *enok*-Promotoranalysen in Embryonen und Larven.

In der Promotorstudie wurde die Expression mit Hilfe des GFP-Responders *UAS-GFP.nls* analysiert, welcher entweder unter der Kontrolle des *enokL*-Promotors (A,A',C-C',G,H-H') oder des *enokS*-Promotors (B,B',D-F,I-J') stand. Beide Konstrukte zeigen eine ubiquitäre Expression (grün) im Embryo (A,A',B,B'). Panglia-Marker Repo (rot) zeigt eine Überlagerung im zentralen Nervensystem mit GFP-Färbung des *enokS*-Promotors (A': Pfeilspitzen). Neuroblastmarker Asense (rot) zeigte eine Überlagerung mit dem GFP-Signal unter der Kontrolle des *enokL*-Promotors (B': Pfeilspitzen). (C-C') Expressionsmuster der *enokL-Gal4* der L1 (erstes Larvalstadium) Larven *in vivo*. GFP-Signal ist im Fettkörper, im Darm, im zentralen Nervensystem (ZNS) und im Chordotonalorgan (cho) zu sehen. (D-D') Expressionsmuster der *enokS-Gal4* der L1 Larven *in vivo*. GFP-Signal ist im Fettkörper, im Darm, im ZNS und in den Oenozyten (oe) zu sehen. Ab L2 (zweites Larvalstadium) findet eine Reduktion des Expressionsmuster statt (*in vivo*). (E,F,I-J') Expression von GFP durch *enokS-Gal4* im ZNS in L2 (E) und L3 (F) und in den Oenozyten (I-J'). Oenozyten wurden mit einer NILE RED Färbung (rot) verifiziert. (G-H') Expression der *enokL-Gal4* im Chordotonalorgan und in den Oenozyten. Primäre Antikörper: (A-B') rat α -Enok; (A,A') mouse α -Repo; (B-B') rabbit α -Asense.

Nach dem Schlüpfen des Embryos und während des ersten Larvalstadiums konnte beobachtet werden, dass das Expressionsmuster sich ändert. Es beschränkte sich in L1 auf distinkte Gewebe wie ZNS, Fettkörper und Darm (Abb. 3.9 C,C',D,D' und Abb.7.7 C,C',D,D'). In diesem Stadium ist ebenfalls ein Unterschied zwischen den beiden *enok-Gal4* Linien zu sehen. Das GFP Signal konnte im Fall von *enokL-Gal4* im Chordotonalorgan, welches zum peripheren Nervensystem gehört, detektiert werden (Abb. 3.9 C' und Abb. 7.7 C'). Im Fall der *enokS-Gal4* befindet sich das Signal sich in den Oenozyten (Abb. 3.9 D' und Abb. 7.7 D'). Da beide Organe sich in starker räumlicher Nähe zu einander befinden, und aus den selben Vorläuferzellen entstehen (Gould et al, 2001), scheinen in dem Fall die Länge des jeweiligen Promotorbereiches und die darin enthaltenen Transkriptionsfaktorbindestellen die Expression sehr genau zu kontrollieren und zu beschränken. Ebenfalls möglich ist, dass der Unterschied des Expressionsmusters durch den Isolator hervorgerufen wurde.

Mit dem Erreichen des zweiten Larvenstadiums reduzierte sich das Expressionsmuster beider Konstrukte auf zwei Gewebe. Das GFP-Signal war konstant nur noch im zentralen Nervensystem (Abb. 3.9 E,F und Abb. 7.7 E,F) und in der Peripherie entweder in den Oenozyten und dem Chordotonalorgan (Abb. 3.9 G,H-H' und Abb. 7.7 G, H,H') oder nur in den Oenozyten (Abb. 3.9 I,J-J' und Abb. 7.7 I,J-J') zu finden. Diese spezifische und deutliche Expression der *enok-Gal4* Linien blieb bis in das adulte Stadium erhalten. In diesem Stadium zeigten sowohl *enokL-Gal4* als auch *enokS-Gal4* Kreuzungen mit einem GFP-Responder (*UAS-Cam2.1*) dasselbe Expressionsmuster. Die Expression in der adulten Fliege wurde in den adulten Oenozyten detektiert, welche sich ventral und lateral entlang der sieben Abdominalsegmente und dorsal entlang der fünf Abdominalsegmente befinden (Abb. 3.10A-A' and Abb. 7.8A-A'). Ebenfalls wurde Expression im dritten Segment der Antenne detektiert (Abb. 3.10B-B' und Abb. 7.8B-B'). Dies deutet auf eine sensorische Funktion von Enok hin. Wie schon in der Larve beschrieben (Moderau, 2009), scheint es auch im erwachsenen Tier eine ähnliche Aufgabe zu übernehmen. Dass die Expression der *enok-Gal4* Linien korrekt ist, wurde durch die Publikation von Anholt und Williams (2010) bestätigt, in der das Proteom der *Drosophila* Antenne untersucht wurde. Die GFP-exprimierenden Zellen

im dritten Antennensegment gehören zu dem Zelltyp der olfaktorischen Rezeptorneurone (ORN), da deren Projektionen vom Segment zum Antennallobus verfolgt werden konnten (Abb. 3.10C-D´ und Abb. 7.8C-D´). Die Projektionen verliefen ipsilateral und endeten in den Glomeruli, die den jeweiligen olfaktorischen Rezeptoren entsprachen. Wie die Färbung des adulten zentralen Nervensystems zeigte, waren jeweils drei Glomeruli positiv für GFP. Die Glomeruli, die von den ORNs innerviert wurden, waren VC3I, DA1 und VA6. Die dazugehörigen olfaktorischen Rezeptoren waren Or35a und Or67d (Fishilevich und Vosshall, 2005).

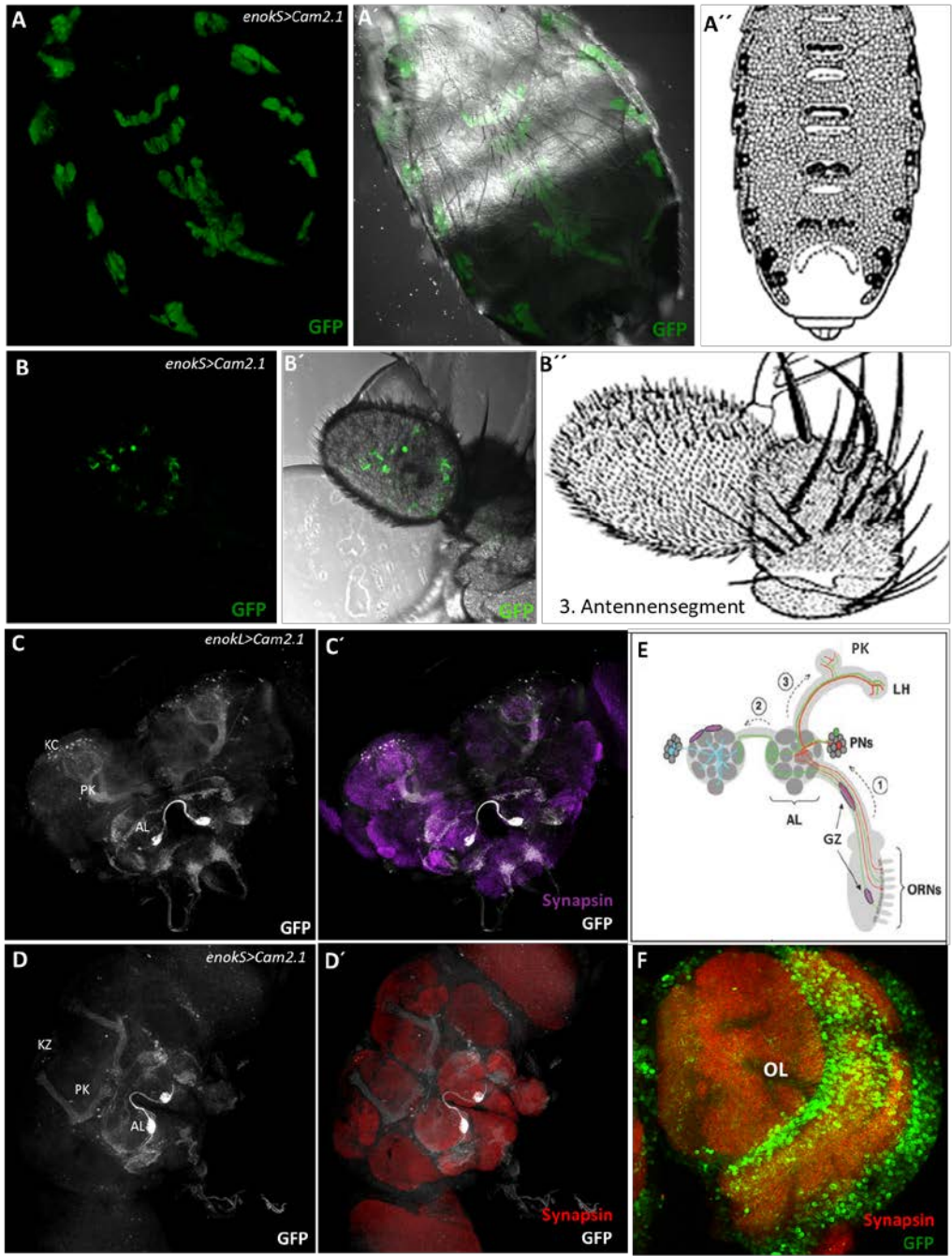


Abbildung 3.10: *enok*-Promotoranalysen in adulten Tieren.

In den adulten Tieren wurde das Expressionmuster mit Hilfe des GFP-Responders *UAS-Cam2.1* unter der Kontrolle des *enokL*-oder des *enokS*-Promotors untersucht. *In vivo* Aufnahmen des Abdomens zeigt, dass der *enokS*-Promotor dort nur in den Oenozyten aktiv ist. (A-A´). (A´´) Eine schematische Zeichnung des Abdomens zeigt die Verteilung der Oenozyten (übernommen von Miller, 1950). (B-B´) *In vivo* Aufnahme der Antenne. Das dritte Segment zeigt eine Expression von GFP unter der Kontrolle des *enokS*-Promotors. (B´´) Eine schematische Zeichnung des dritten Antennensegments (übernommen von Ferris, 1950). (C,C´,D,D´) Beide Gal4-Linien zeigen das gleiche Expressionsmuster im adulten ZNS. Zur Hilfe der Lokalisation wurde Synapsin als Hintergrundmarker angefärbt (C´, magenta; D´, rot). Die Expression (weiß) wurde in Zelltypen detektiert, die in die neuronale Verschaltung des olfaktorischen Systems involviert sind. Die Expression wurde in den Antennalloben (AL), den Pilzkörpern (PK) und den Kenyon Zellen (KZ) detektiert. In (E) ist eine schematische Zeichnung der neuronalen Schaltkreise des olfaktorischen Systems dargestellt. 1) Die antennalen olfaktorischen Rezeptorneurone (ORN) projizieren ihre Axone unterstützt durch Glia Zellen (GZ) zu dem ipsilateralen AL und enden in Glomeruli, entsprechend ihrem olfaktorischen Rezeptor. 2) Die meisten ORN Klassen senden Projektionen entlang der Kommissuren und innervieren den korrespondierenden Glomerulus im contralateralen AL. 3) Projektionsneurone übermitteln die olfaktorische Information an die PK und Neurone im lateralen Horn (LH). (übernommen von Rodrigues und Hummel, 2008). (F) Expression im visuellen System. In Zellkörpern der Medulla des optischen Lobus (OL) wurde GFP-Signal detektiert. Primäre Antikörper: (C-F) chicken α -GFP; (C´,D´,F) mouse α -Synapsin.

Bei einer Expression von Enok in diesen spezifischen Geweben würde das Protein eine wichtige Rolle in der Verarbeitung ganz bestimmter Gerüche, Duftstoffe oder sogar Pheromone übernehmen. Or53a reagiert bei einer Applikation von Hexansäureethylester, was zur Gruppe der Fruchtester gehört (Richgels und Rollmann, 2012). Der Rezeptor Or67d dagegen detektiert ein für Männchen spezifisches Pheromon 11-cis-vaccenyl Acetat (cVA), welches das Paarungsverhalten von männlichen und weiblichen Fliegen reguliert (Kurtovic et al., 2007). Außerdem spielt dieser Rezeptor eine Rolle bei der Aggressionsverarbeitung (Wang und Anderson, 2010). Neben der Innervation der Antenne und der Antennalloben wurde die GFP Färbung in den Projektionsneuronen (PN), die zu den Pilzkörpern (PK) führen, und in den Kenyon-Zellen (KZ) detektiert. In der schematischen Darstellung (Abb. 3.10E) sind diese Gewebe und der Weg der Signalübermittlung zu sehen (Rodrigues und Hummel, 2008). Die Expression im ZNS der adulten Fliege würde die bereits gezeigte Funktion in der olfaktorischen Verarbeitung bestätigen und ebenfalls die funktionelle Homologie zum murinen Enok-Homolog Querkopf bestärken.

Die ebenfalls schon bekannte Expression von Enok im visuellen System (Berger et al, 2008) konnte mit der Gal4-Linie verifiziert werden. Das GFP Signal war sehr stark in den Zellkörpern, die die Medulla innervieren, zu sehen (Abb. 3.10F und Abb.7.8E). Diese Expression würde auch den starken Augendefekt erklären, welcher in der Dissertation von Zinke 2003 und mit der Überexpression von *enok* unter der Kontrolle der *OK107-Gal4* Linie gezeigt wurde (Moderau, 2009).

Um sicher zu gehen, dass nicht fälschlicherweise das beschriebene Expressionsmuster von dem Promotorbereich von *gek* stammte, wurde das Expressionsmuster der *gek-Gal4* Treiberlinie ebenfalls untersucht. In Abbildung 3.11 ist das GFP-Signal während des ersten (A-A´) und zweiten (B-B´) Larvalstadiums zu sehen. Die Expression in dieser Linie war sehr spezifisch, sie zeigte eine Fluoreszenz in den Speicheldrüsen, welche durch den Basalpromotor des Vektors verursacht wurde, dem ZNS und den Muskelzellen. Das Expressionsmuster ist entwicklungsunabhängig und stimmt mit dem bekannten Phänotyp der

Regulation von Actin-Polymerisation überein (Luo et al., 1997). Weder die Expression im ZNS, welche sich ausschließlich in Elav positiven postmitotischen Neuronen befand (Abb. 3.11 C', Abb. 7.9 A'), noch die Färbung in den Abdominalsegmenten stimmte mit dem durch die *enok-Gal4* Treiberlinien verursachtem Muster überein. (Abb. 3.11 D,D' Abb. 7.9B,B'). Da die Expression nicht durch den Promotorbereich des benachbarten Gens beeinflusst wurde, musste jetzt die Spezifität der *enok-Gal4* Linien verifiziert werden. Da die *enokS-Gal4* ein Expressionsmuster aufwies, welches in weniger Geweben zu sehen und dadurch differenzierter war als das der *enokL-Gal4*, wurde im Folgenden alle Experimente mit der *enokS-Gal4* Linie durchgeführt.

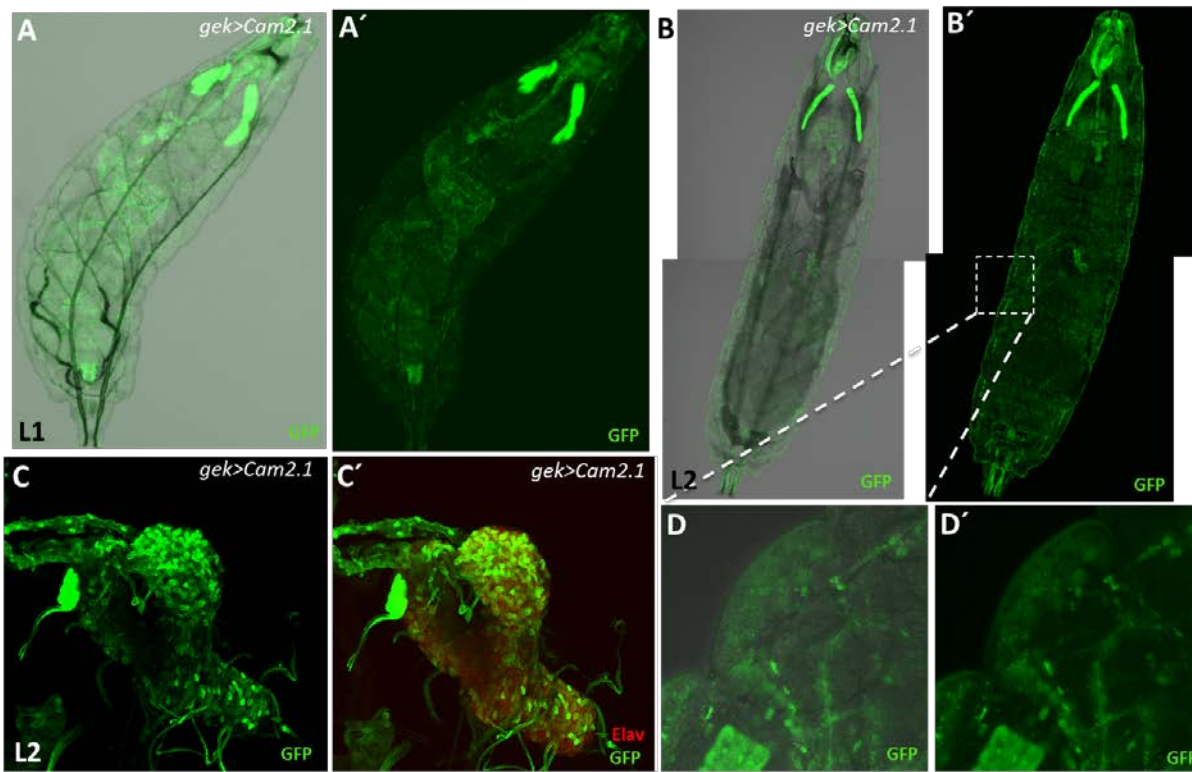


Abbildung 3.11: *gek*-Promotoranalysen.

Das Expressionsmuster der *gek-Gal4* Linie wurde mit dem Responder *UAS-Cam2.1* sichtbar gemacht. Das GFP-Signal wurde *in vivo* untersucht. Die *gek*-Promotorstudie wurde in L1 (A,A') und L2 (B-D') Larven durchgeführt. Im L1 war ein Signal im ZNS, in den Speicheldrüsen und in der Muskulatur sichtbar. Sowohl die Körperwandmuskulatur als auch die Darmmuskulatur zeigten ein Signal. Im L2 (B-B') sah das Expressionsmuster wie in L1 aus. (C-C') Im ZNS waren nur postmitotische, Elav-positive Zellen (rot) GFP-positiv. Keine Übereinstimmung mit dem *enok-Gal4* Expressionsmuster. (D-D') Das GFP-Signal in der Körperwand wurde nur in den Muskeln detektiert und war weder in den Oenozyten noch in dem Chordotonalorgan sichtbar. Primäre Antikörper: (C-C') chicken α -GFP; (C') mouse α -Elav.

3.2.3 Verifizierung der *enok-Gal4* Treiberlinie mit dem Anti-Enok Antikörper

Die schematische Zeichnung in Abbildung 3.12A stellt zusammenfassend die Expression der *enok-Gal4* Linie ab dem zweiten Larvalstadium dar. Um nachzuweisen, dass die Gal4 Linie die endogene Enok-Expression zeigt, wurden Gegenfärbungen mit dem anti-Enok Antikörper durchgeführt.

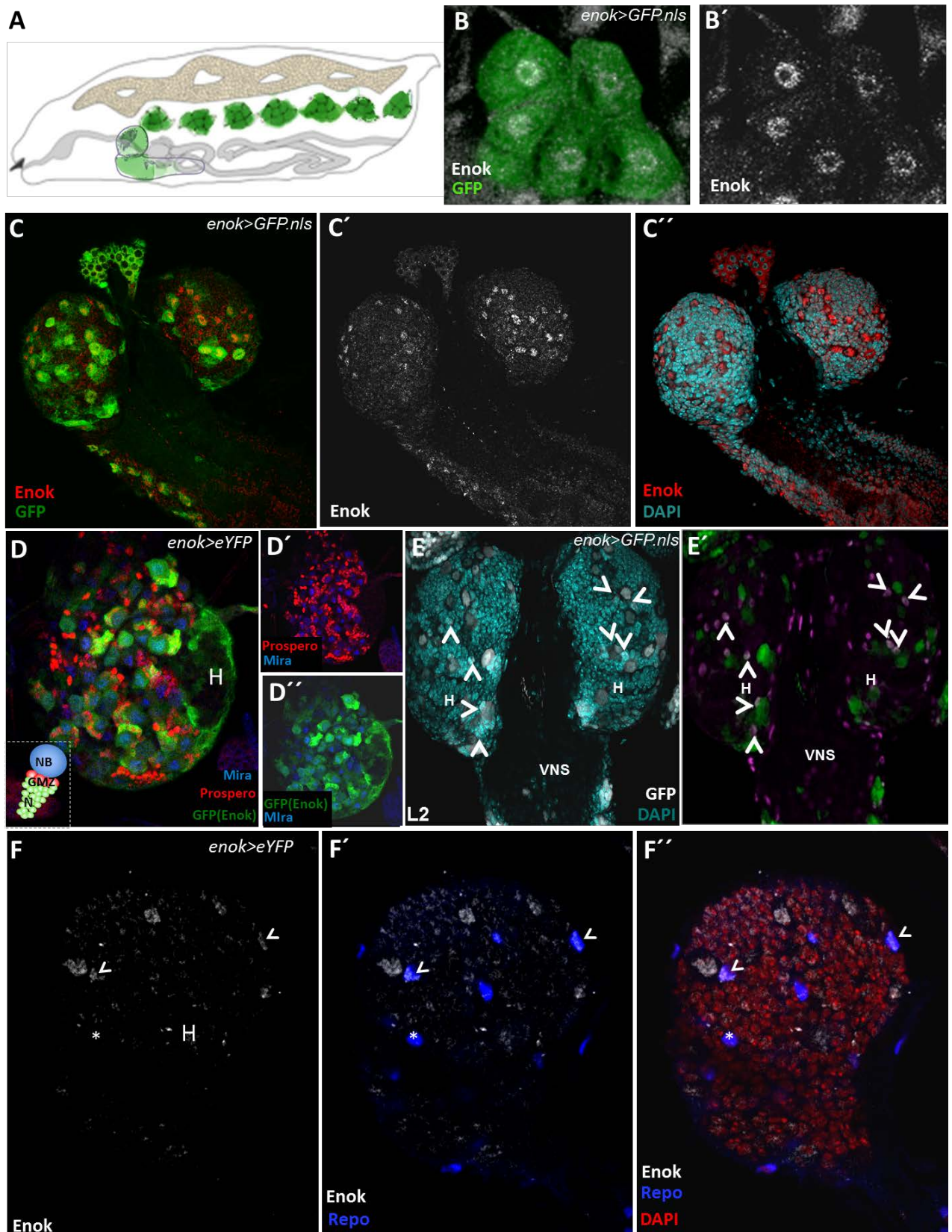


Abbildung 3.12: Verifizierung und Charakterisierung des *enok-Gal4* Expressionsmusters.

(A) Schematische Zeichnung des *enok-Gal4* Expressionsmusters in der Larve ab L2. Die exprimierenden Gewebe sind das ZNS und die Oenozyten, die sich lateral in den sieben Abdominalsegmenten befinden (übernommen und modifiziert von Gutierrez et al., 2007). (B-B') Enok Proteinsignal (weiß) in den Oenozyten stimmt mit dem *enok*-Promotorsignal (GFP, grün) überein. (C-C') In ZNS überlagert sich das Signal des *enok*-Promotors (GFP, grün) ebenfalls mit dem Signal des α -Enok Antikörpers (C': weiß, C'': rot). (C') Zudem wurden mit Hilfe von DAPI (cyan) die Lokalisation des endogenen Enok Proteins im Kern bestätigt, und die Enok-positiven Zellen wurden als Neuroblasten identifiziert. (D-D') Gegenfärbungen mit Markerproteinen bestätigten diese Annahme. Miranda (Mira, blau) als Neuroblastenmarker zeigte eine Überlagerung mit dem GFP-Signal (grün) in den Neuroblasten (NB). Die Ganglion-Mutterzellen (GMZ), die durch Prospero markiert wurden (rot) zeigten keine Co-Färbung mit dem GFP-Signal. (E-E') Neben den Neuroblasten wurde das GFP-Signal (E, weiß; E', grün) in Repo-positiven Zellen (E', magenta), den Glia Zellen, detektiert. (F-F') Nicht alle Repo-positiven Zellen (blau) waren Enok-positiv (weiß). Mit Pfeilspitzen markierte Zellen zeigten beide Signale. Mit einem Stern markierte Zellen waren nur Repo-positiv. Enok-positive Glia Zelle gehören einer Subpopulation an. Primäre Antikörper: (B,B', C-C', F-F') rat α -Enok; (B,B',C,D,D', E,E') chicken α -GFP; (D-D') mouse α -Prospero; (D-D') rabbit α -Mira; (E', F',F') mouse α -Repo. H, Hemisphäre; VNS, ventrales Nervensystem.

Gleichzeitig wurde die Charakterisierung der Enok-exprimierenden Zelltypen anhand von spezifischen Markerproteinen festgestellt (Abb. 3.12.D-F', Abb. 7.10C-E'). Die bereits im vorigen Kapitel als Oenozyten identifizierten Zellen waren ebenfalls positiv für Enok Expression. Das Signal des Enok Proteins war in den Kernen der Zellen lokalisiert (Abb. 3.12 B,B', Abb. 7.10A,A').

Das GFP-Signal in dem larvalen Gehirn stellte sich als etwas komplexer heraus. Die Expression des Enok Proteins stimmte nicht ganz mit dem Signal der GFP-Expression überein. Da in diesem Fall eine zytoplasmatische Variante des GFP exprimiert wurde (Abb. 3.12C, Abb.7.10B), war das Signal in mehr Zellen zu sehen als das Signal des Enok Proteins, welches nukleär lokalisiert war (Abb. 3.12C', Abb. 7.10B'). Jedoch kann man sagen, dass die GFP-Expression durch die Gal4 Treiberlinie in allen Zellen aktiv war, welche auch endogen das Enok-Protein exprimieren. Die Identität der Enok-positiven Zellen konnte durch eine Gegenfärbung mit dem DNA-interkalierenden Farbstoff DAPI eingegrenzt und durch eine Gegenfärbung mit dem anti-Miranda (Mira) Antikörper als Neuroblasten (Abb. 3.12D-D', Abb. 7.10C-C') identifiziert werden. Die Neuroblasten werden als besonders große Zellen beschrieben, die sich asymmetrisch teilen. Dabei entsteht eine kleine Ganglion-Mutterzelle (GMZ=*ganglion mother cell*) und wiederum ein größerer Neuroblast (Homem und Knoblich, 2012). Die Gegenfärbung mit dem GMZ-Marker Prospero ergab keine Überlappung mit den Enok-Expressionsmuster. Neben den Neuroblasten wurden zusätzlich kleinere Zellen detektiert, die eine GFP-Färbung aufwiesen (Abb. 3.12D, Abb. 7.10C). Die mit den Pfeilspitzen markierten Zellen zeigten eine Kolo-kalisation mit dem Pangliamarker Repo (*reversed polarity*), was diese Zellen als Glia Zellen identifiziert (Abb. 3.12E, Abb. 7.10D). Jedoch war nur eine geringe Zahl der Zellen sowohl positiv für GFP als auch für Repo, was für eine Subpopulation der Glia Zellen spricht. Durch die Färbung mit dem α -Enok AK und dem α -Repo AK konnte genau dieselbe Übereinstimmung der Signale gezeigt werden (Abb. 3.12F, Abb. 7.10E). Nur eine Unterpopulation der Zellen war positiv für Enok und Repo gleichzeitig. Die mit einem Stern markierte Zelle, die für Repo positiv war, zeigte kein Enok Signal.

Zusammenfassend, kann man sagen, dass die hergestellte *enok-Gal4* Linie mit dem endogenen Enok-Proteinsignal übereinstimmt. Die Expressionsmuster der Treiberlinie, sowohl in den Oenozyten, als auch im Gehirn konnten mit dem Enok AK bestätigt werden. Dies verifiziert die Linien, was sie auch für phänotypische Experimente als geeignet identifiziert. Bevor jedoch der Überexpressionsphänotyp beschrieben werden konnte, musste zuerst die *enok*-Mutante genauer analysiert werden.

3.3 Phänotypische und transkriptionelle Analyse der *enok*-Mutante

Die genomische Lokalisation der Deletionsmutation und das Fressverhalten wurde bereits von Ingo Zinke in Teilaspekten beschrieben (Zinke, 2003). Außerdem wurde im Zusammenhang mit der *I(2)09373* Deletionsmutation der Defekt der Kutikulaentwicklung gezeigt (Perrimon et al., 1996). Dieser Phänotyp konnte in meiner Diplomarbeit (Moderau, 2009) durch die Überexpression von *enok* mit Treibern, die im Zusammenhang mit Kutikulaentwicklung (*th-Gal4*) und Kutikulaanbindung (*stripe-Gal4*) stehen, kopiert werden.

In Abbildung 3.13A ist der vorher als *rotkehlchen*-Phänotyp beschriebene Phänotyp dargestellt. Dieser Phänotyp wird ab jetzt als *enok*-Phänotyp bezeichnet. Die Deletionsmutante *I(2)09373* mit der Bezeichnung *enok^{Δ/Δ}* zeigte im Vergleich zu einer gleich alten und gleich behandelten Kontrolllarve deutliche Unterschiede. Die wichtigsten Charakterisierungsmerkmale waren der Wachstumsdefekt und die gestörte Nahrungsaufnahme. Letzteres bedingt das verminderte Wachstum. Integriert in die Abbildung 3.13A ist eine schematische Darstellung, die ein weiteres auffälliges Merkmal des *enok*-Phänotyps aufzeigt. Es wurde beobachtet, dass die *enok*-Mutanten sofort nach der ersten Nahrungsaufnahme das Futter verließen und nicht mehr zurückkehrten. Kontrollarven (*Wt*) dagegen verblieben im Futter (durch den roten Klecks dargestellt) und nahmen ununterbrochen Nahrung zu sich. Das Balkendiagramm in Abbildung 3.13B zeigt die statistische Auswertung des Verhaltens der Mutante. In Abbildung 7.11A sind die 16 Versuchsplatten der unabhängigen Experimente und die dazugehörigen Statistiken zu sehen. Dieses für eine L1 Larve unübliche Verhalten trat bei über 73% der Tiere 24h nach der Eiablage (nE) auf. Diese Tiere zeigten eine Abneigung gegenüber Hefe. Die meisten Tiere verließen sie nach der ersten Nahrungsaufnahme. Wie das Diagramm zeigt, befand sich die gefärbte Hefe bei 76% der Tiere im Oesophagus. Die Larven waren nicht im Stande diese weiter in den Magen zu transportieren. Trotz der fehlenden Nährstoffe überlebten die Larven in dem ersten Larvalstadium bis zu fünf Tage nE. In dieser Zeitperiode unterließen sie die Nahrungsaufnahme komplett und starben außerhalb der Nahrungsquelle.

Da jedoch die Deletionamutante *enok^{Δ/Δ}* durch eine *I(2)09373* P-Element Insertion von 14,545kb entstanden ist, wurden ebenfalls eine der entstandenen Ethyl-Methan-Sulfonat (EMS) Mutanten *enok¹⁰⁴* untersucht, die von Ingo Zinke (2003) hergestellt wurde. Abbildung 3.13C stellt die Position der EMS-Mutation mit Stern markiert in der kodierenden Sequenz (grün) (CDS=coding sequence) dar. Durch die Mutation entsteht ein Stopcodon in der MYST-

Domäne. Die Translation des gesamten Proteins bleibt dadurch aus. Das Enok Protein konnte in einer Gehirnhemisphäre mit dem α -Enok AK in der *enok*¹⁰⁴ Mutante nicht mehr detektiert werden, was vermuten lässt, dass das verkürzte Protein instabil ist und vollständig abgebaut wird (Abb. 3.13D, Abb. 7.11B), wie es in der wildtypische Situation möglich war (Abb. 3.12C-C'). In der Gehirnhemisphäre einer L1 *enok*¹⁰⁴ Larve konnte nach Doppelfärbung mit dem Neuroblastenmarker Mira und dem α -Enok AK keine Überlagerung der Signale detektiert werden, da ein Signal des α -Enok AK fehlte, sowohl in der Gehirnhemisphäre, als auch im Rest des larvalen Körpers. Das spricht für eine vollständige Deletion des Enok Proteins.

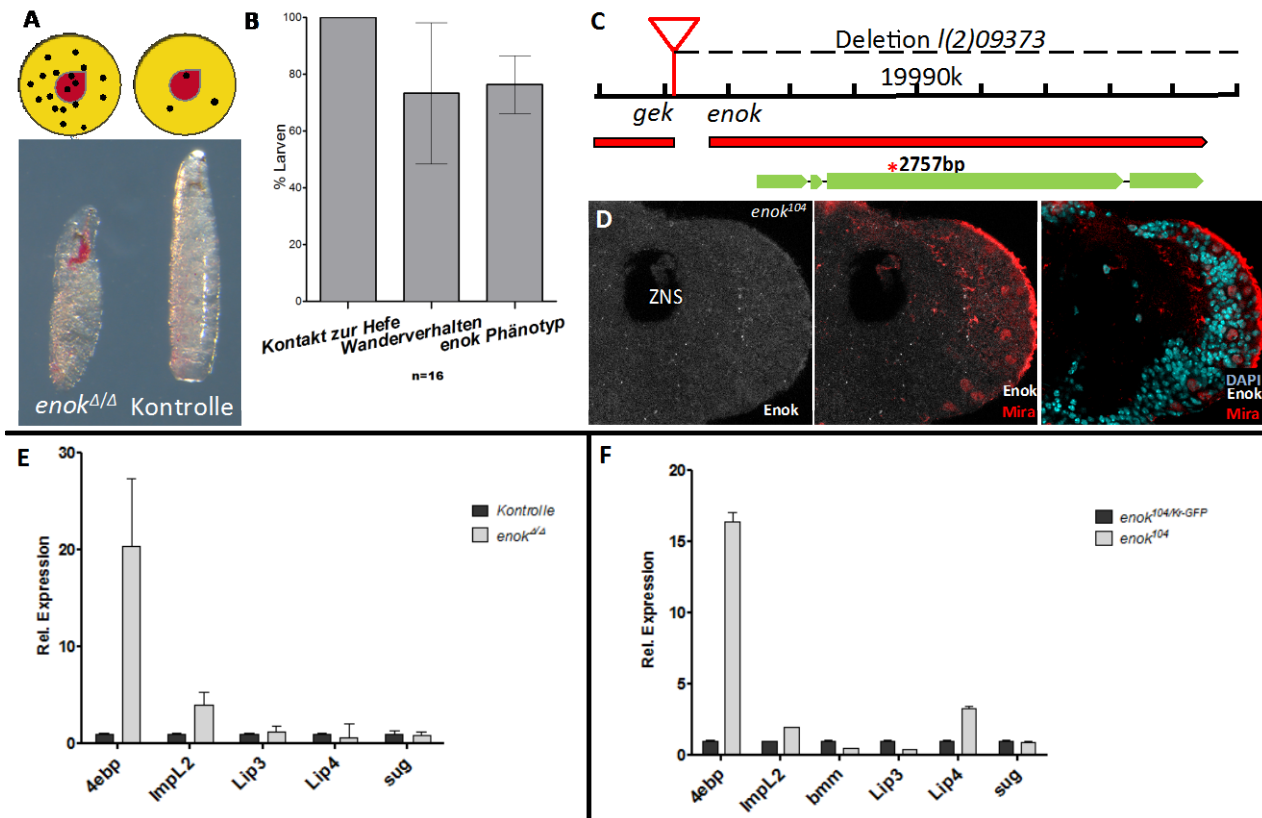


Abbildung 3.13: Phänotypische Beschreibung der Mutanten *enok*^{Δ/Δ} und *enok*¹⁰⁴.

(A) Schematische Zeichnung zur Verdeutlichung des Wanderverhaltens und der Nahrungsaufnahmedefekt in *enok*^{Δ/Δ}-Mutanten im Vergleich zur Kontrolle. Die Futterakkumulation in den Larven ist durch rot-gefärbte Hefe sichtbar gemacht. Das Schema zeigt eine Momentaufnahme der Larvenaufenthaltsorte (Punkte) außerhalb der Hefe (rot) auf der Apfelsaftagarplatte (gelb) nach 28h nE. In (B) ist die statistische Auswertung des Wanderverhaltens der *enok*^{Δ/Δ}-Mutante in einem Balkendiagramm dargestellt (n=16). (C) Eine Darstellung beider Mutationen auf genomischer Ebene. Die genomische P-Element-Insertion *I(2)09373* ist mit einem rotumrandeten Dreieck im Genbereich eingezeichnet. Der in *I(2)09373* deletierte Bereich ist durch eine gestrichelte Linie gekennzeichnet. Die Insertion traf das Exon 1 des *gek*-Gens und deletiert den Bereich rechts davon. Durch grüne Balken ist die kodierende Sequenz von *enok* dargestellt. Mit einem Stern markiert ist die Position der Ethyl-Methan-Sulfonat (EMS) Mutation *enok*¹⁰⁴ dargestellt. Durch die Punktmutation an der Position 2757bp entsteht eine Transition von C zu T, dadurch wird aus dem Codon CAG für Glutamin ein Stoppcodon TAG. (übernommen und modifiziert von Zinke, 2003). (D) Die *enok*¹⁰⁴-Mutante zeigt kein Enok Protein Signal (weiß) mehr im ZNS. Enok konnte nicht mehr in Neuroblasten (Mira-positiven Zellen) detektiert werden. (E-F) Transkriptionelle Analyse des Wachstumsarrests und der Hungermarker in *enok*^{Δ/Δ}- und *enok*¹⁰⁴-Mutanten im Vergleich zu der entsprechenden heterozygoten Kontrolle. Die transkriptionelle Analyse wurde 7h nE durchgeführt, entsprechend den Verhaltensexperimenten in A und B. In beiden Mutanten war das Wachstumsarrestgen *4ebp* stark induziert. Die Hungermarker *bmm*, *Lip3*, *Lip4* und *sug* waren trotz der fehlenden Nahrungsaufnahme nicht aktiviert. Fehlerbalken repräsentieren standard error of the mean (SEM). Primäre Antikörper: (D) rat α -Enok; rabbit α -Mira. *4ebp*, eukaryotischer Initiationsfaktor 4E-Bindeprotein; *bmm*, Brummer; *ImpL2*, Imaginal morphogenesis protein-Late 2; *Lip3*, Lipase3; *Lip4*, Lipase4; *sug*, sugarbabe.

Die weiteren phänotypischen Merkmale wie die gestörte Nahrungsaufnahme und der Wachstumsdefekt wurden ebenfalls untersucht und zeigten eine vollständige Übereinstimmung mit der Charakterisierung der Deletionsmutante. Daraufhin kann man davon ausgehen, dass der beschriebene *enok*-Phänotyp tatsächlich von der Mutation in dem Gen *enoki mushroom* verursacht wurde.

Die transkriptionelle Analyse der Deletionsmutante *enok^{Δ/Δ}* und der *enok¹⁰⁴* EMS-Mutante wurde anschließend durchgeführt, um molekulare Veränderungen im Organismus, die durch die Abwesenheit von *enok* verursacht wurden, zu untersuchen und zusätzliche Informationen zur Erklärung des beschriebenen Phänotypes erlangen zu können. Die bereits bekannte Missregulation der Wachstumsarrestgene (Zinke, 2003; Moderau, 2009) und die fehlende Hungerantwort wurden in beiden Mutantenarten analysiert. Als negativer Wachstumsmarker wurde *eukaryotischer Initiationsfaktor 4E-Bindeprotein (4ebp)* ausgesucht. Ein weiteres Gen, welches als guter Marker für *enok*-Missregulation beschrieben wurde und bereits bei einem Microarray screen, welcher von Ingo Zinke mit Hilfe von Prof. Kevin White durchgeführt wurde, aufgefallen ist und mit dem Häutungsprozess in Zusammenhang gebracht wurde, ist *Imaginal morphogenesis protein-Late 2 (ImpL2)* (bei Zinke, 2003 als *ecdysone-inducible gene L2 (ImpL2)* beschrieben). Den neuesten Publikationen zur Folge wird *ImpL2* eine sehr wichtige metabolische Funktion Insulinsignalweg (IS) zugeschrieben (Honegger et al., 2008; Bader et al., 2013). Als weitere Markergene wurden *Brummer (bmm)*, *Lipase 3 (Lip3)*, *Lipase4 (Lip4)* und *sugerbabe (sug)* ausgewählt, da diese Gene als Marker für die physiologische Hungerantwort beschrieben wurden (Zinke et al., 2002). Ebenfalls spielen die Gene *bmm*, *Lip3* und *Lip4* beim ersten Schritt des Lipid-Katabolismus und der Lipolyse, eine wichtige Rolle.

Die Ergebnisse der quantitativen PCR (qPCR) Analyse wurden in Abbildung 3.13E und F (Abb. 7.12A,B) zusammengefasst. Diese zeigen jeweils die entsprechende Mutante im Vergleich mit ihrer heterozygoten Kontrolle. Die Larven beider Experimentreihen wurden bei gleichen Bedingungen aufgezogen und behandelt. Die RNA für die transkriptionelle Analyse wurde aus sehr frühen L1 Larven isoliert (28h nE). Um den Tieren die Möglichkeit zur Nahrungsaufnahme zu geben, wurde die RNA erst 7h nach dem Schlüpfen isoliert. Anschließend wurde die complementary DNA (cDNA) synthetisiert und die quantitative PCR durchgeführt. Als Referenzgene dienten die Haushaltsgene *ribosomal protein L32 (rp49)* und *Actin 5C (Act5C)*. Um auszuschließen, dass das Expressionsprofil der Deletionsmutante durch einen sekundären Effekt, wie zum Beispiel, durch die Deletion der benachbarten Gene verursacht wurde, wurde die EMS-Mutante *enok¹⁰⁴* ebenfalls analysiert.

Wie die beiden Graphen (Abb. 3.13E und 3.13F, Abb. 7.12A und 7.12B) zeigen, waren die untersuchten Marker bei beiden Mutanten ähnlich reguliert. Das Wachstumsarrestgen *4ebp* war im Vergleich zu der jeweiligen Kontrolle sowohl bei *enok^{Δ/Δ}* als auch bei *enok¹⁰⁴* sehr stark hochreguliert. Diese starke transkriptionelle Antwort stimmt ebenfalls mit dem Wachstumsarrest der Mutanten überein. Die Hochregulation von *ImpL2* wurde bei beiden

Mutanten festgestellt, auch wenn diese nicht besonders ausgeprägt, jedoch stets sehr konstant war. Dieses Protein hat eine Funktion in der nahrungsabhängigen Entwicklung und fungiert als ein Antagonist des Insulinsignalweges (Honegger et al., 2008). Bei Mangelernährung wird ImpL2 sezerniert und bindet Insulin. Dadurch wird der Insulinsignalweg unterdrückt und die Tiere haben die Möglichkeit eine längere Hungerperiode zu überleben und nach Nahrung zu suchen. Jedoch sollten die Tiere in diesem Fall ihre Reserven dazu benutzen, genug Energie zu bekommen, so dass sie die Nahrungssuche überstehen. In diesen Tieren sollten Gene hochreguliert sein, welche die Gluconeogenese, die Lipidmobilisation, den Lipidtransport und die β -Oxidation kontrollieren (Palanker et al., 2009).

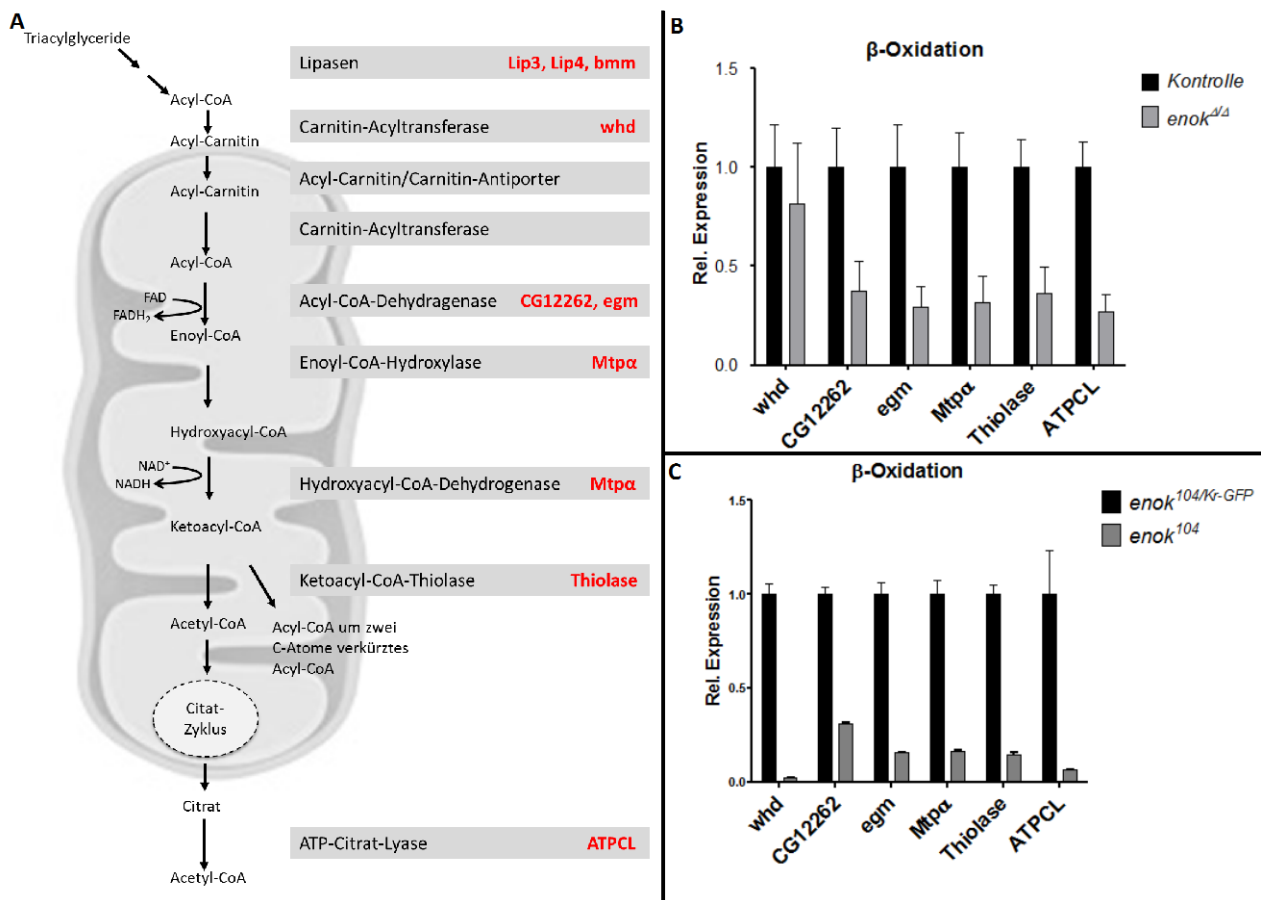


Abbildung 3.14: Transkriptionsanalyse der β -Oxidationsgene in den Mutanten *enok^{A/A}* und *enok¹⁰⁴*.

(A) Schematische Darstellung der mitochondrialen β -Oxidation. Die *Drosophila*-Homologe der Enzyme sind in rot markiert. Am Ende des Prozesses entstehen ein Acetyl-CoA und ein um zwei C-Atome verkürztes Acyl-CoA. (B-C) Transkriptionelle Analyse der Gene, die an der β -Oxidation beteiligt sind. Das Expressionsprofil beider *enok*-Mutanten im Vergleich zu der entsprechenden heterozygoten Kontrolle zeigt eine starke Beeinträchtigung der β -Oxidation auf transkriptioneller Ebene. Die Balkendiagramme zeigen die relative Expression, die Fehlerbalken repräsentieren standard error of the mean (SEM). *ATPCL*, ATP-Citrat Lyase; *bmm*, Brummer; *egm*, *enigma*; *Lip3*, *Lipase3*; *Lip4*, *Lipase4*; *Mtp α* , *Mitochondrial trifunctional protein a subunit*; *whd*, *withered*.

Wie schon das Verhalten der Mutanten implizierte, da sie das Fressverhalten komplett einstellten, zeigten *enok*-Mutanten, obwohl sie keine Nährstoffe zu sich nahmen, keine transkriptionelle Hungerantwort. Die Hungermarker *bmm*, *Lip3* und *Lip4* waren nicht hochreguliert, was für eine zuckerhaltige Ernährung sprechen würde. Gleichzeitig war aber

sug, welches in diesem Fall hätte hochreguliert werden müssen, ebenfalls nicht stärker reguliert als in der Kontrolle. Sowohl die Deletionsmutation als auch die EMS-Mutation zeigten eine ähnliche Tendenz in der transkriptionellen Regulation. Das zeichnet die Funktion von Enok als eine regulatorische Einheit für diese Gene.

Um herauszufinden, ob durch die Deletion von *enok* auch weitere Prozesse der transkriptionellen Hungerantwort beeinflusst werden, wurden zusätzlich Transkripte der Gene untersucht, welche in der β -Oxidation beteiligt und unter Hungerbedingungen hochreguliert werden. Zu diesen Genen gehören *Acetyl-CoA Synthetase (AcCoAs)*, *Carnitin-Acyltransferase (whd)* und *Acyl-Carnitin/Carnitin-Antiporter (CPTI)*, die als Schlüsselenzyme des Acyl-Importes in das Mitochondrium gelten (Palanker et al., 2009; Parisi et al., 2013). Zusätzlich wurden die Gene untersucht, welche die vier enzymatischen Schritte der β -Oxidation codieren. Zu diesen Genen gehörten: 1) die Acyl-CoA-Dehydrogenasen *CG12262* und *enigma (egm)*, 2) Enoyl-CoA-Hydrogenase *Mitochondrial trifunctional protein α subunit (Mtp α)*, 3) Hydroxyacyl-CoA-Dehydrogenase *Mtp α* und 4) Ketoacyl-CoA-Thiolase *Thiolase*. Ebenfalls wurde die Expression von *ATP-Citrat Lyase (ATPCL)* untersucht. Dieses Enzym spielt eine wichtige Rolle bei der Umwandlung von mitochondriellem Citrat zu Acetyl-CoA. Dieser enzymatische Schritt verbindet den Vorgang der β -Oxidation mit der Fettsäuresynthese. ATPCL wird für die wichtige Funktion benötigt, um wachstumsfaktorinduzierte Erhöhung im Metabolismus und die Regulation der Histonacetylierung und damit die Genexpression zu verbinden (Wellen et al., 2009). Enok als HAT wäre damit die Histon-Acetyltransferase, die die Acetylierung der Histone und dadurch die Produzenten und die Prozesse der Herstellung von Acetyl-CoA, das für die Histonmodifikation benötigt wird, steuern würde.

Die beschriebenen enzymatischen Prozesse sind in der Abbildung 3.14A zu sehen. Die rot-markierten Gene wurden mittels qPCR analysiert. Der Vergleich der Transkriptionsprofile der Kontrollen und der jeweiligen Mutante ergab, dass bei beiden Mutationsarten die Transkription der involvierten Gene sehr stark reduziert wurde. In den Graphen 3.14B und C (Abb. 7.13) werden die Ergebnisse zusammengefasst. Die *enok^{Δ/Δ}* Tiere zeigten eine nicht signifikante Reduktion der Carnitin-Acyltransferase *withered (whd)*. Jedoch war eine zwei bis dreifache Reduktion der Enzyme (*CG12262*, *egm*, *Mtp α* , *Thiolase*), welche an den vier enzymatischen Prozessen der β -Oxidation beteiligt sind, zu beobachten. Das würde bedeuten, dass obwohl die Vorbereitung des Transportes der Acylkette in das Mitochondrium funktioniert, die β -Oxidation in jedem der vier Schritte reduziert sein würde, da die Transkription dieser Enzyme unterdrückt bleibt. Zusammenfassend würde nicht nur die Energiequelle in Form von ATP, sondern auch das Substrat, welches für die Histonacetylierung benötigt wird, das Acetyl-CoA, reduziert. Dies würde auch die Bewegungsmüdigkeit der Tiere und ihre Langlebigkeit erklären. Da sie ihre Reserven nicht angreifen können um Energie zu gewinnen, sterben sie ohne sich weiter entwickeln zu können. Ebenfalls war die Transkription des Schlüsselenzyms *ATPCL* fast vierfach herunterreguliert. Die Acetyl-CoA Herstellung würde in diesem Fall ebenfalls reduziert werden. Dies würde zusammenfassend bedeuten, dass

durch die Abwesenheit von *enok* nicht nur die Hungerantwort, die Lipolyse und die β -Oxidation, nicht ablaufen konnten, sondern auch die Energiegewinnung und die Substratherstellung von Acetyl-CoA ausblieben.

Um zu zeigen, dass dieser Effekt tatsächlich durch die Abwesenheit von *enok* hervorgerufen wird, wurde dieselbe transkriptionelle Analyse mit *enok*¹⁰⁴ Mutanten durchgeführt. In diesem Fall war die Reduktion aller beschriebenen Enzyme sehr viel dramatischer ausgefallen. In der EMS-Mutante war im Gegensatz zu der Deletionsmutante das Schlüsselenzym Carnitin-Acyltransferase (*whd*), im Vergleich zu der Kontrolle 45-fach reduziert. Die Enzyme der β -Oxidation waren drei- bis sechsfach reduziert und bei *ATPCL* war eine 15-fache Reduktion zu beobachten. Die Ergebnisse dieses Vergleichsexperiments beweisen, dass die Regulation der untersuchten Gene tatsächlich von *enok* direkt oder indirekt abhängt, und keines der benachbarten Gene für den beschriebenen Phänotyp verantwortlich ist.

3.4 Phänotypische und transkriptionelle Analyse der *enok* Überexpression unter der Kontrolle des *enok-Gal4* Treibers

Nach der genauen Beschreibung des *enok*-Phänotyps konnte nun untersucht werden, ob die Überexpression von *enok*, die mit Hilfe der UAS-Enok Linie erreicht wurde (Zinke, 2003), unter der Kontrolle des *enok*-Promotors einen ähnlichen Phänotyp verursacht, und die Theorie der dosisabhängigen Regulation (Theorie der Balance) unterstützt. Anschließend wurde ebenfalls die transkriptionelle Analyse der Tiere der Kreuzung *enok>Enok;eYFP* durchgeführt. Phänotypisch wiesen die Larven folgende Merkmale auf: Einigen Stunden nach dem Schlüpfen aus der Eihülle zeigten die Larven das bereits beschriebene Wanderverhalten. Das heißt, dass sie direkt nach der ersten Nahrungsaufnahme das Futter verließen oder unregelmäßig zur Nahrung wanderten, sich jedoch nie in die Hefepaste eingruben oder die Nahrungsaufnahme wieder fortsetzten. Letzteres würde dem natürlichen Verhalten einer L1 Larve entsprechen, so dass sie die möglichst größte Menge an proteinreicher Nahrung aufnimmt und nicht zu viele Reserven auf der Suche nach einer neuen Nahrungsquelle verschwenden. Nach dem Erreichen des zweiten Larvalstadiums begannen die Larven an den Rand der Petrischale zu wandern und blieben dort am Rand kleben und starben schließlich durch Austrocknung. Die Häutung zum dritten Larvalstadium erreichte keine der Larven, jedoch überlebten die Tiere bis zu 12 Tage lang ohne weitere Entwicklung. Gleichzeitig zeigten die Larven eine Resistenz gegen Hunger. Im Vergleich zu den Kontrolltieren hatten sie eine mindestens doppelt so hohe Toleranz gegenüber Mangelernährung. Bei Haltung der Tiere auf PBS durchtränktem Filterpapier fiel auf, dass die Kontrolltiere schon nach 16 Std. zu sterben begannen, die *enok* Überexpressionstiere weitere 24Std. des Hungerns überlebten. Die Resistenz gegenüber Hunger, die lange Überlebenszeit, ohne dass die Tiere sich weiterentwickelten, und das Wanderverhalten stimmten mit dem Phänotyp der Mutante überein. In Tabelle 3.1 wurde in Stichworten sowohl das Expressionsmuster, als auch die phänotypische Beschreibung der *enok* Überexpression zusammengefasst.

Wie bereits publiziert wurde, wird durch die Abwesenheit von *enok* in den Pilzkörpern des zentralen Nervensystems eine Reduktion der Zellzahl verursacht (Scott et al., 2001), da Enok für die Proliferation der Neuroblasten essentiell ist. Wie das Expressionsmuster der *enok-Gal4* und des Enok AK zeigten, ist Enok in den Neuroblasten zu finden.

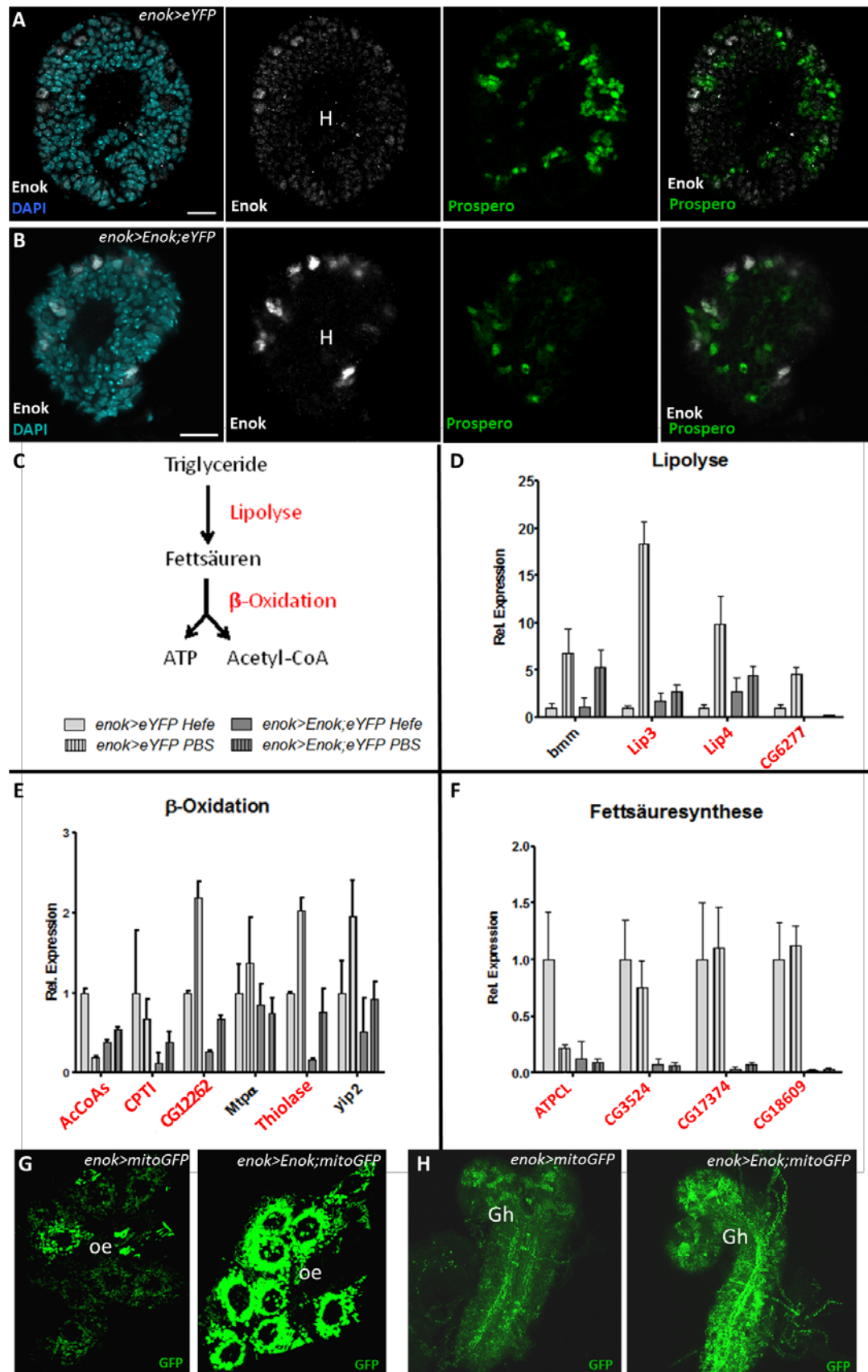


Abbildung 3.15: Phänotypische Beschreibung der *enok*-Überexpression unter der Kontrolle des *enok*-Promotors.

(A-B) *enok*-Überexpression im Gehirn verursacht einen Proliferationsdefekt in den Neuroblasten. Die Proliferationsrate wurde semiquantitativ durch eine Färbung mit α -Prospero bestimmt. Die Zahl der Prospero-positiven Ganglion-Mutterzellen (grün) korreliert mit der Anzahl der Zellteilungen des Neuroblasts. Enok-positive Zellen (weiß) markieren die Position des Neuroblasts. Der Schnitt durch die Hemisphäre (H) des jeweiligen Genotyps wurde in derselben Ebene gemacht. Die Tiere deren Gehirne verwendet wurden, waren gleich alt und wurden gleich behandelt. (A) zeigt die Kontrollkreuzung *enok*>*eYFP*. (B) Die Überexpression von *enok* unter der Kontrolle des *enok*-Promotors. Die Zahl der Ganglion-Mutterzellen ist in der Überexpression deutlich reduziert. (C-F) Transkriptionelle Analyse der Lipidmetabolismusede. (C) Vereinfachte Darstellung des Lipidkatabolismus. Die untersuchten Prozesse sind in rot markiert. (D-F) Das Expressionsprofil der Lipidmetabolismusede wurde unter verschiedenen Nahrungsbedingungen untersucht. Hier wurde die Expression in Larven unter Hungerbedingungen (PBS) oder auf proteinreicher Nahrung (Hefe) verglichen. *enok*-Überexpressionstiere wurden mit Kontrolltieren verglichen. Gene, deren Expression in der Überexpression signifikant reduziert war, sind in rot markiert. (G,H) Die Reduktion ist nicht mitochondrien-abhängig. *In vivo* Aufnahmen der Oozyten (oe) des Gehirns (Gh) zeigen das mitochondriale GFP-Signal in der Überexpression und in der Kontrolle. Die Mitochondrien werden durch die Überexpression von *enok* weder in ihrer Morphologie, noch in ihrer Anzahl negativ beeinflusst. Transkriptionelle Analysen wurden min. mit einem n=3 durchgeführt. Fehlerbalken repräsentieren standard error of the mean (SEM). Maßstab repräsentiert 10 μ m. Primäre Antikörper: (A,B) rat α -Enok; mouse α -Prospero. *AcCoAs*, *Acetyl-CoA Synthetase*; *ATPCL*, *ATP-Citrat Lyase*; *bmm*, *Brummer*; *CPT1*, *Acyl-Carnitin/Carnitin-Antiporter*; *Lip3*, *Lipase3*; *Lip4*, *Lipase4*; *Mtp α* , *Mitochondrial trifunctional protein a subunit*; PBS, phosphate buffered saline, *yip2*, *yippee interacting protein 2*.

Die Überexpression in diesen Zellen mittels der *enok-Gal4* Linie führte zu einer Reduktion der Neuroblastenteilungen. In Abbildung 3.15A ist ein Querschnitt durch eine Gehirnhemisphäre einer Kontrolllarve (*enok*>*eYFP*) zu sehen, Abbildung 3.15B zeigt dieselbe Ebene der Hemisphäre einer gleich alten und gleich behandelten *enok* Überexpressionslarve (*enok*>*Enok*; *eYFP*). Beide Bilderreihen zeigen eine Analyse der Neuroblastenproliferation gemessen an der Zahl der Tochterzellen. In Abbildung 7.14A und B sind weitere Ebenen der jeweiligen Gehirne und die statistische Auswertung der Neuroblastenproliferation zu sehen. Die Neuroblasten wurden mit dem α -Enok AK sichtbar gemacht und die Tochterzelle (GMZ), welche aus der asymmetrischen Teilung der Neuroblasten entstanden, wurden mit dem α -Prospero AK detektiert. Es ist deutlich zu sehen, dass die Anzahl der Prospero-positiven Zellen in der *enok* Überexpression sehr viel geringer war. Diese deutliche und statistisch signifikante Reduktion der Tochterzellen (Abb. 7.14C), wurde ebenfalls in der Mutante beschrieben (Scott et al, 2001). Der Effekt der verringerten Zellteilung im ZNS wurde ebenfalls bei der murinen Mutante *Querkopf* beobachtet. Diese Tiere wiesen kleine Gehirne auf, was auf geringere Zellteilung zurückgeführt werden konnte (Merson et al., 2006).

Der phänotypische Vergleich der Mutanten und der Überexpression von *enok* lässt vermuten, dass nicht wie erwartet die Überexpression von *enok* das Gegenteil zeigt, sondern genau den Phänotyp kopiert. Das bedeutet darauf hin, dass die Menge des Enok Proteins sehr fein reguliert werden muss, um eine Fehlfunktion zu vermeiden.

Die transkriptionelle Analyse sollte diese Vermutung verifizieren. Mit der Überexpression von *enok* unter der Kontrolle des *enok-Gal4* Promotors wurde ebenfalls das Transkriptionsprofil der Gene angeschaut, die am Abbau von Lipiden beteiligt sind (Abbildung 3.15C, Abbildung 7.16). Zusätzlich zur Untersuchung des Transkriptionslevels des Enzyms ATPCL, dessen starke Reduktion in den Mutanten festgestellt wurde, wurden weitere Gene der Fettsäuresynthese analysiert. Für die transkriptionelle Analyse wurden Larven der

Kontrollkreuzung *enok>eYFP* und der Kreuzung *enok>Enok;eYFP* verwendet. In diesem Fall wurde dafür gesorgt, dass der genetische Hintergrund der Kreuzungen, derselbe war, und der einzige genetische Unterschied die Überexpression von *enok* sein sollte. Auf diese Weise wurden mögliche Fehlinterpretationen der Genaktivität umgangen, welche entweder auf den unterschiedlichen genetischen Hintergrund oder auf die Aktivität des Gal4 Proteins zurückzuführen wären (Liu und Lehmann, 2008). Da die *enok* Überexpressionslarven das zweite Larvenstadium erreichen und eine längere Überlebenszeit haben als die Mutanten, ergab sich die Möglichkeit die transkriptionelle Expression bei verschiedenen Futterbedingungen anzuschauen. Für dieses Experiment wurden Larven beider Genotypen, die auf Apfelsaftagerplatten mit etwas frischer Hefe aufgezogen wurden, nach 50h nE abgesammelt, gründlich gewaschen, um die Nahrungsreste zu entfernen. Daraufhin wurden sie entweder auf eine Platte mit einem PBS befeuchteten Filterpapier mit Hefe oder auf eine Platte nur mit einem PBS befeuchteten Filterpapier gesetzt und 14h auf der jeweiligen Futterbedingung gehalten. Nach 14h wurden die Larven abgesammelt, gewaschen und für die RNA Extraktion benutzt. Nach der cDNA-Herstellung wurde anschließend die qPCR durchgeführt.

Die transkriptionellen Level von *enok* zeigen eine deutliche Induktion bei einer Überexpression (Abb. 7.15). Die Daten der qPCR zeigten die Expressionsprofile der Gene aus verschiedenen Prozessen der Lipidhomöostase (Abb. 3.15D-F, Abb. 7.16, Abb. 7.17, Abb.7.18). Die Untersuchung der Lipolyse, welche der erste Schritt der Spaltung der Triglyceride (TAG) ist, ergab eine starke Ähnlichkeit zum Expressionsprofil der Mutante (Abb. 3.15D, Abb. 7.16): zwei von den drei bereits bekannten zellulären Lipasen, *Lip3* und *Lip4*, die in der Mutante reduziert waren, waren auch in der Überexpression sowohl bei proteinreicher Ernährung, als auch bei Hunger im Vergleich zur gehungerten Kontrolle signifikant ($p < 0,01$) runterreguliert. In den Tieren der Kreuzung *enok>Enok;eYFP* wurde die Lipolyse nicht eingeleitet, obwohl sie nichts aßen. Dadurch blieb die Energiegewinnung aus, was dem natürlichen Transkriptionsprogramm während einer Hungerperiode entsprechen würde. Eine andere Lipase, *CG6277*, die im Darm produziert wird (Zinke et al., 2002), zeigte eine sehr viel stärkere Reduktion bei beiden Futterbedingungen. Bei einer Hungerantwort der Kontrolltiere wurde die Lipase fast fünffach induziert. Bei den Larven der *enok*-Überexpression dagegen war die Expression dieses Gens fast nicht vorhanden. Das Level der mRNA lag bei 0,08 bei proteinreicher Nahrung und bei 0,02 im gehungerten Zustand. Diese schwache Expression lässt vermuten, dass dieses Gen ein direktes Zielgen von Enok sein kann.

Im Fall von *bmm* sah das Expressionsprofil anders aus, als bei den restlichen Lipasen. Hier glich die nahrungsabhängige Regulation der Überexpression komplett der Regulation der Kontrolle. Das bedeutet, dass dieses Gen unabhängig von Nahrungsaufnahme und Wachstumszustand reguliert wurde. Obwohl die Überexpressionstiere nicht aßen und das Wachstum auf proteinreicher Nahrung stoppten, war die Lipase *bmm* nicht aktiviert. Die

Induktion konnte erst nach einer 14-stündigen Hungerperiode beobachtet werden. Dieses Gen scheint nur bei vorhandener Nahrung *enok* abhängig reguliert zu sein, was bedeuten würde, dass es möglicherweise einen anderen Multiprotein-Komplex benötigt als bei Nahrungsmangel. Die Zusammensetzung eines Multiprotein-Komplexes kann sich durch die Zusammensetzung der einzelnen Subeinheiten unterscheiden, so dass die Komplexe in ihrer Funktion flexibel bleiben. So kann der Austausch einer der Einheiten zu einer anderen Funktion führen. *Enok* scheint keinen direkten Einfluss auf *brummer*-vermittelte Lipolyse zu haben.

Im Fall der Überexpression von *enok* unterstützte die transkriptionelle Analyse der in der β -Oxidation wichtigen Gene die Ergebnisse des Mutanten-Expressionsprofils. Zwar war die Regulation nicht so stark wie bei der Mutante, jedoch konnte auch hier gezeigt werden, dass die Transkription der betroffenen Gene fehlreguliert war (Abb. 3.15E, Abb. 7.17). Die Transkripte der Schlüsselenzyme des Transports von Acyl-CoA in das Mitochondrium, die Acetyl-CoA-Synthetase (AcCoAs) und die Carnitin-Palmetoyltransferase (CPTI) waren im Vergleich zu der gefütterten Kontrolle unter beiden Bedingungen (Hefe und PBS) signifikant reduziert. Zusätzlich zu diesen wichtigen Enzymen waren auch die vier enzymatischen Schritte der β -Oxidation betroffen. Die normale Regulation dieser Gene zeigte, wie in den Kontrollexperimenten sichtbar, eine starke Induktion in der Hungersituation. Die transkriptionelle Aktivität der auf Hefe gehaltenen Kreuzung *enok>Enok:eYFP* erreichte nie die Level der Kontrolle. Man kann vermuten, dass in Abwesenheit eines möglichen *Enok*-Multiprotein-Komplexes die Transkription von *CG12262*, *Thiolase* und *yippee interacting protein 2 (yip2)* grundsätzlich in diesen Larven stark reprimiert wurde. Auch während einer Extrembedingung wie Hunger war zwar ein Anstieg in der Transkription zu beobachten, jedoch erreichte es nie das Level der Kontrolle und zeigte eine signifikante Repression.

Da durch die Untersuchung der *ATPCL*-Level in der Mutante Hinweise auf eine mögliche Missregulation der Fettsäuresynthese gegeben wurden, wurde dieser Prozess als weiterer Teil des Lipidmetabolismus ebenfalls analysiert (Abb. 3.15F, Abb. 7.18). Zusätzlich zu den Transkriptleveln der *ATPCL* wurden auch die Fettsäure-Synthasen *CG3524* und *CG17374*, so wie die Fettsäure-Elongase *CG18609* analysiert. Letztere ist insofern interessant, da sie eine starke transkriptionelle Aktivität spezifisch in den Oenocyten zeigte (Gutierrez et al., 2007).

Die Ergebnisse des Experiments zeigten, dass bei *enok*-Überexpression die transkriptionelle Aktivität dieser Gene sowohl auf Hefe als auch auf PBS eine sehr schwache Expression aufwies. Die Reduktion war im Vergleich zu der Kontrolle bei *CG3524* und *CG18609* sogar höchst signifikant ($p < 0,01$). Die Transkriptlevel waren in diesen Fällen so niedrig, dass von einer fast vollständigen Abwesenheit der Transkripte ausgegangen werden konnte. Diese Reduktion würde auf Proteinebene bedeuten, dass die Enzyme fast nicht vorhanden wären und damit der Aufbau von langkettigen Fettsäuren ausbliebe. Zusammenfassend kann man sagen, dass die Gene, die während des Hungerns normalerweise den schnellen Abbau von TAGs zu Fettsäuren und dann zu energieliefernden Substanzen steuern sollten, im Fall von

enok-Fehlexpression nicht in genügenden Mengen transkribiert werden. Ebenfalls war die Transkription der Gene sehr stark reduziert, die im Fall einer reichhaltigen Ernährung aktiv sein sollten und die Fettsäuren aufbauen. Man kann also vermuten, dass die Expression von *enok* einen sehr starken Einfluss auf den Lipidmetabolismus hat, egal ob *enok* deletiert ist oder sehr stark überexprimiert wurde. Die Balance der Enok-Protein Mengen scheint für seine Funktion entscheidend zu sein.

Da die bis jetzt beschriebenen enzymatischen Prozesse zum größten Teil in den Mitochondrien statt finden, wurden die Morphologie und die Verteilung der Mitochondrien innerhalb der Zelle untersucht, um auszuschließen, dass die Mitochondrien selbst durch die Überexpression von *enok* auf irgendeine Weise negativ betroffen waren. Zu bedenken in diesem Fall wäre zum Beispiel eine verringerte Zahl der Mitochondrien, die dafür sorgen würde, dass weniger ATP hergestellt und damit auch eine Wachstumsreduktion des ganzen Organismus hervorgerufen werden würde. Um dies zu überprüfen, wurde eine optische Analyse der Mitochondrien-Beschaffenheit durchgeführt (Schmidt et al., 2012). Hier wurde die Expression des mitochondrialen-GFPs (mitoGFP) unter der Kontrolle des *enok*-Promotors und mit oder ohne der zusätzlichen *enok* Überexpression analysiert. Das mitoGFP Signal wurde in zwei verschiedenen Geweben untersucht. Abbildung 3.15G und Abbildung 7.19A zeigt die Oozyten, Abbildung 3.15H und Abbildung 7.19B zeigt das larvale Gehirn und Abbildung 7.19C zeigt Fettkörper im zweiten Larvenstadium. Für dieses Experiment wurden Larven der Genotypen *enok>mitoGFP* und *enok>Enok;mitoGFP* auf Apfelsaftagerplatten mit Hefe großgezogen und nach 50h nE abgesammelt. Zu diesem Zeitpunkt befanden sich die Larven der Kreuzung *enok>Enok;mitoGFP* im frühen zweiten Larvalstadium und unterschieden sich in der Größe kaum von der Kontrollkreuzung *enok>mitoGFP*. Beide Genotypen wurden betäubt und mittels *in vivo* Mikroskopie untersucht. Das mitochondrielle GFP Signal wurde mit denselben Intensitätseinstellungen aufgenommen. Dabei war es besonders wichtig die Tiere gleich zu behandeln und die Mikroskopieeinstellungen gleich zu belassen, um die optische Analyse semiquantitativ auswerten zu können. Es wurde hier auf eine Antikörper Färbung zur Verstärkung des Signals verzichtet, um eine Verfälschung der Signalstärke zu vermeiden und nur anhand des eigentlichen GFP Signals auf die Beschaffenheit der Mitochondrien schließen zu können. In den Oozyten (Abb. 3.15G, Abb. 7.19A), im Gehirn (Abb. 3.15H, Abb. 7.19B) sowie im Fettkörper (Abb. 7.19C) war zu sehen, dass das mitoGFP Signal in der *enok* Überexpression sehr viel stärker war als in der Kontrolle. Dies lässt nicht nur auf eine stärkere GFP Produktion schließen, sondern auch auf eine größere Zahl der Mitochondrien. Es konnte also ausgeschlossen werden, dass die Überexpression von *enok*, einen negativen Einfluss auf die Herstellung und die Funktionalität der Mitochondrien hat. Es kann sogar spekuliert werden, dass bei einer Fehlfunktion von Enok die Mitochondrienzahl zwar erhöht wird, jedoch die für die mitochondrialen Prozesse wichtigen Enzyme trotzdem nicht in ihrer Anzahl steigen, da ihre Transkription nicht induziert werden kann. Auf diese Weise hat Enok eine essentielle Aufgabe in der Kontrolle der enzymatischen Prozesse innerhalb einer Zelle

und gleichzeitig einen systemischen Einfluss auf den Metabolismus im gesamten Körper, da die Energiegewinnung in den Mitochondrien stark reduziert wird.

3.4.1 Triglycerid-Gehalt in *enok* Überexpressionstieren vermindert sich nicht während des Hungerns

Wie durch die transkriptionelle Analyse gezeigt wurde, waren die *enok* Überexpressionstiere nicht in der Lage die Prozesse der Lipolyse und der β -Oxidation zur Gewinnung von ATP und Acetyl-CoA transkriptionell zu induzieren. Das würde bedeuten, dass die Triacylglycerid-Reserven in diesen Larven nicht mobilisiert wurden. Um dies zu untersuchen wurde eine histochemische Färbung mit dem fettlöslichen und rot färbenden Farbstoff Oil Red O angewandt. Dieser ermöglicht es den Neutral-Lipidgehalt sichtbar zu machen und diesen dann unter verschiedenen Bedingungen zu vergleichen. Der Lipid-Gehalt und dessen Abbau wurden in drei larvalen Zelltypen untersucht. Die Zelltypen, die nach Gutierrez et al., 2007 zahlreiche große (0,5-2,5 μm) Lipidtröpfchen enthalten, gehören zu Fettkörperzellen, Mitteldarm-Epithelzellen und larvalen Oenozyten (Abb. 3.16A-H / Abb. 7.20A-F). Da die Prozesse der Lipolyse und der β -Oxidation normalerweise unter Nahrungsmangel stark induziert werden, wurde der Lipid-Gehalt in den erwähnten Zelltypen sowohl unter proteinreicher, als auch unter Mangel-Ernährung untersucht. Anders als in der zitierten Publikation von Gutierrez et al. beschrieben wurde, wurden die Hungerexperimente mit L2 und nicht mit L3 Larven durchgeführt, da die *enok* Überexpressionstiere ihr Wachstum während des zweiten Larvalstadiums stoppten. Die Larven speicherten bei proteinreicher Ernährung auf Hefe Lipide in den Fettkörperzellen und in den Mitteldarm-Epithelzellen, jedoch war keine Ansammlung der Lipidtröpfchen in den Oenozyten zu sehen (n=30). Nach einer 14stündigen Periode des Hungerns auf PBS zeigten die Tiere der Kontrollkreuzung *enok>eYFP* eine weniger intensive und verbreitete Oil Red O Färbung im Fettkörper (n=35), was auf eine Reduktion der Fettreserven hindeutet. Im Gegensatz dazu wurden die Lipide aus dem Mitteldarm nach der Hungerperiode komplett mobilisiert (n=35), da dieser eine geringere Speicherkapazität aufweist. Die Oenozyten als dritter Zelltyp bestehen aus einem Cluster aus sechs bis acht Zellen und befinden sich lateral in jedem Abdominalsegment. Die eigentliche Funktion dieser Zellen ist weitestgehend unbekannt, jedoch zeigten sie eine starke Akkumulation von Lipidtröpfchen während anhaltender Hungerperioden (Abb. 3.16C, Abb. 7.20F). Zusammenfassend wurde in der Abbildung 3.16G und G' die Akkumulation der Neutrallipide (rote Färbung) während der proteinreichen und Mangel-Ernährung dargestellt. Durch die genaue Charakterisierung der TAG Verteilung in der Kontrollsituation bei Hefe oder PBS, konnten Abweichungen in der Überexpression untersucht werden.

Die Überexpression von *enok* unter der Kontrolle des *enok*-Promotors zeigte bei proteinreicher Ernährung (Hefe) keinen Unterschied zur Kontrollsituation in Lipid-Gehalt und -Verteilung. Die TAGs wurden in Fettkörperzellen (Abb. 3.16D, Abb.7.20G) und in den

Mitteldarm-Epithelzellen (Abb. 3.16E, Abb. 7.20I) detektiert. Es wurde keine Akkumulation in den Oenozyten gesehen. Im Vergleich dazu unterschied sich die TAG-Speicherung der gehungerten *enok* Überexpressionstiere (n=56) sehr stark von der Kontrolle. Die Lipid-Mobilisierung in Fettkörperzellen (Abb. 3.16D', Abb. 7.20H) und in Mitteldarm-Epithelzellen (Abb. 3.16E, Abb. 7.20J') fand nicht statt. Das bedeutet, dass sogar nach 14 Stunden kompletten Hungerns die Larven ihre Fettreserven nicht angriffen um Energie zu gewinnen. Die Akkumulation von Lipidtröpfchen in den Oenozyten (Abb. 3.16F', Abb. 7.20L) blieb ebenfalls aus.

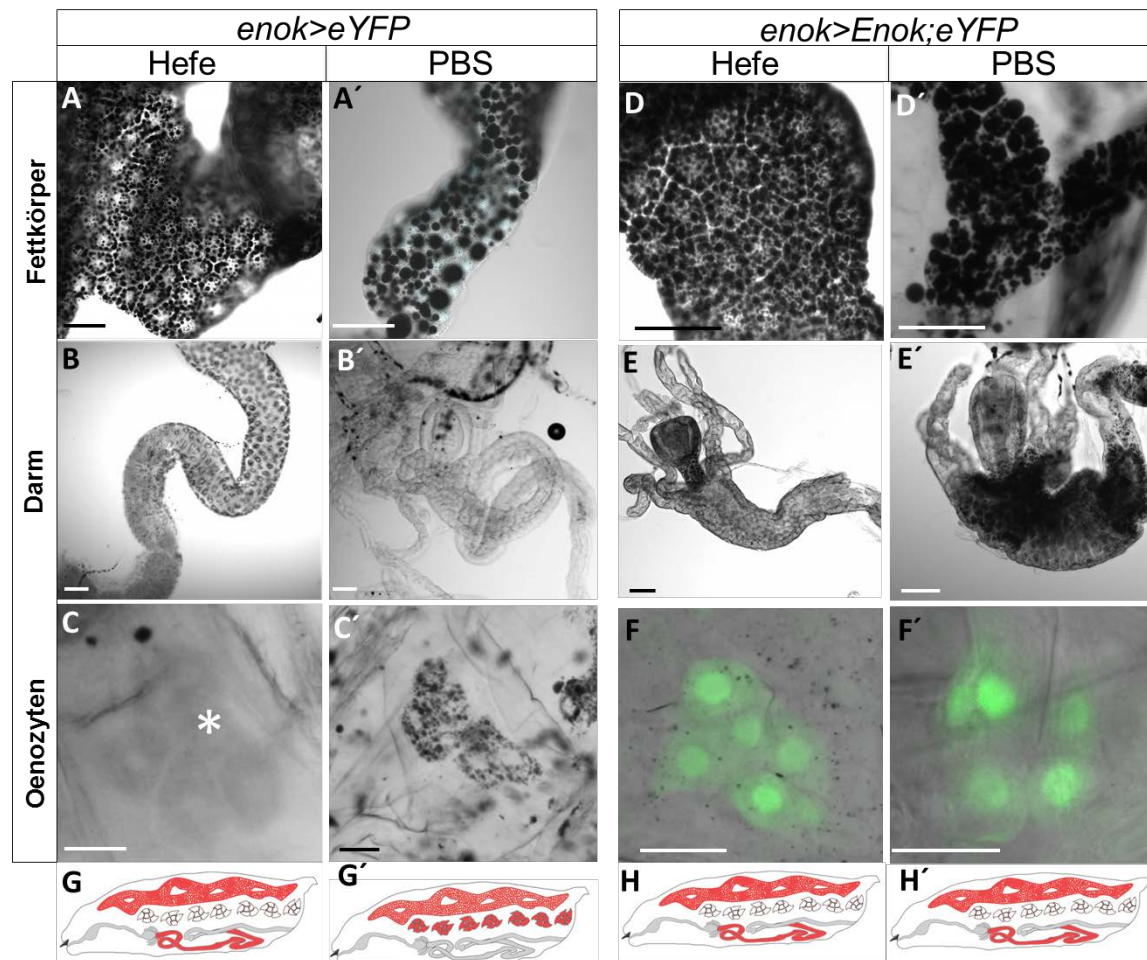


Abbildung 3.16: Lipidmobilisation und Abbau finden in *enok*-Überexpressionstieren unter der Kontrolle des *enok*-Promotors nicht statt.

Oil Red O Färbungen von L2 Larven zeigen die drei Gewebe Darm, Oenozyten und Fettkörper, die Lipide akkumulieren (A-C', D-F'). Je nach Genotyp oder Nahrungsbedingung ist der Phänotyp in einer schematischen Zeichnung zusammengefasst (G,G',H,H'). Die Lipidakkumulation wurde in Larven der Kontrollkreuzung *enok>eYFP* und *enok>Enok;eYFP* untersucht. Zusätzlich wurden zwei Nahrungsbedingungen angeschaut: Hefe (proteinreiche Nahrung) oder PBS (Hunger). Die Akkumulation der Lipide in den L2 Kontrolllarven auf Hefe ist in Fettkörper (A) und Darm (B) aber nicht in den Oenozyten (C, Stern) zu sehen. Nach 14 Stunden des Hungerns auf PBS beginnt der Fettkörper seine Lipidreserven abzubauen (A'). Im Darm sind die Lipide nach 14h beinahe vollständig abgebaut (B'). In den Oenozyten dagegen ist eine starke Akkumulation der Lipide zu beobachten (C'). Im Fall der *enok*-Überexpression sah die Verteilung der Lipide auf Hefe aus wie in der Kontrolle. Lipide wurden im Fettkörper (D), im Darm (E) jedoch keine in den Oenozyten (F) detektiert. Nach der Hungerperiode von 14h änderte sich die Verteilung nicht (D',E',F'). Die Tiere bauten ihre Fettreserven nicht ab. Die Lipide wurden im Fettkörper (D') und zu großen Mengen im Darm (E') detektiert. Die Akkumulation in den Oenozyten (F') fand nicht statt. Maßstab repräsentiert in (A-B', D-E') 50µm, (C,C',F,F') 20µm. PBS, phosphate buffered saline.

Die Tiere zeigen damit eine starke Hungerresistenz, die auch bereits auf transkriptioneller Ebene beobachtet wurde. Dies würde auch das Verhalten der *enok* Überexpressionslarven

erklären. Sie überleben bis zu zwölf Tagen nE, obwohl sie nichts aßen. Da sowohl die transkriptionelle Hungerantwort als auch der Abbau der Fettreserven fehlte, verhielten sich die Tiere als hätten sie genügend Energiereserven und benötigen keine Nahrung.

Obwohl der Mutanten Phänotyp durch die Überexpression unter der Kontrolle des *enok*-Promotors kopiert werden konnte, und durch diese Überexpression weitere Einblicke in die Physiologie des Phänotyps gewonnen wurden, blieb immer noch die Frage offen, in welchem Gewebe Enok diese wichtige Funktion des Lipidmetabolismus steuert und damit den ganzen Organismus beeinflusst. Um diese Frage beantworten zu können, wurden verschiedene sehr spezifische Gal4-Linien benutzt, um diesen Lipid-Abbaufekt zu kopieren.

3.5 Phänotypische Analyse der Überexpression von *enok* unter der Kontrolle spezifischer Treiberlinien

Das Expressionsmuster der *enok-Gal4* wurde in vorigen Kapiteln genau beschrieben und analysiert. Daraufhin wurden verschiedene, gewebe- und zeitspezifische Promotor- oder Enhancer/Trap-Linien ausgesucht, die in Teilen das Expressionsmuster der *enok-Gal4* Linie widerspiegeln. Die ausgesuchten Linien wurden mit der *enok* Überexpressionslinie *UAS-Enok;eYFP* gekreuzt und mit dem Phänotyp der *enok-Gal4* Linie verglichen. Zu den Linien, welche das periphere Expressionsmuster abdecken sollten, gehörten die im Fettkörper aktiven Linien *CG-Gal4* und *dilp6-Gal4*, und die in den Oenozyten treibende Linie *Oenozyten-Gal4*. Im ZNS wurde die Überexpression unter der Kontrolle von Gal4 Treibern, die in spezifischen Zelltypen aktiv sind und in denen auch die *enok-Gal4* treibt, untersucht. Die Zelltypen waren Neuroblasten (*31-1-Gal4*), Glia Zellen (*repo-Gal4*, *cortex glia-Gal4*) und postmitotische Neurone (*elav-Gal4*). Das jeweilige Expressionsmuster und der Phänotyp, verursacht durch die Überexpression von *enok*, sind in der Tabelle 3.1 zusammengefasst. In Abbildung 3.17A-F sind die Expressionsmuster der einzelnen Linien in L2 Larven zu sehen. Die Linien, welche einen auffälligen Phänotyp aufwiesen oder dem *enok*-Phänotyp ähnelten, wurden anschließend genauer nach der Akkumulation der Lipide in verschiedenen Geweben untersucht.

Tabelle 3.1: Phänotypische Analyse der Überexpression von *enok* unter der Kontrolle spezifischer Treiberlinien.

Die ausgewählten und untersuchten Treiberlinien unterteilen die Expression von *enok* in die einzelnen Gewebe und decken das Expressionsmuster der *enok-Gal4* Linie ab. Sie sind jeweils in einem speziellen Gewebe oder in einer Zellgruppe aktiv. Das jeweilige Expressionsmuster ist in der zweiten Spalte beschrieben. In der dritten Spalte sind die phänotypischen Auswirkungen der *enok*-Überexpression unter der Kontrolle des jeweiligen Treibers zu sehen.

Gal4-Linie	Expressionsmuster	Phänotyp
<i>enok</i>	embryonal ubiquitär, L1 (Kutikula, Fettkörper , Verdauungstrakt, Speicheldrüsen, Oenozyten , Neuroblasten , Glia) ab L2 (Oenozyten , Neuroblasten , Glia)	Nahrungsaufnahmedefekt, Wachstumsdefekt, Wanderverhalten 100%, Letalität L2, erhöhte Hungerresistenz, einzelne Larven überleben bis zu 12 Tage nE
CG (A)	Fettkörper , Hämozyten	Wachstumsdefekt, Nahrungspräferenz zu Zucker, Wanderverhalten, Letalität L2
<i>Dilp6</i> (B)	Fettkörper , Speicheldrüsen, Perineuralglia und Cortex glia	Wachstumsdefekt, Nahrungspräferenz zu Zucker, Wanderverhalten, Letalität L2
Oenozyten (C)	Oenozyten , Prothoraxdrüse, Zellen an anterioren Spirakeln	Wachstumsdefekt, Letalität 100% während 3L und Verpuppung
31-1 (D)	Neuroblasten , Speicheldrüsen, Terminalorgan	Letalität 90% später L2
<i>Elav</i>	Postmitotische Neurone	normale Entwicklung
<i>Repo</i> (E)	Alle Gliazellen , Speicheldrüsen	Wanderverhalten, Lokomotionsdefekt, Letalität frühes L2
<i>cortex glia</i> (F)	Cortex glia , Speicheldrüsen, chordatona Organe	Wanderverhalten, Wachstumsdefekt, Nahrungsaufnahmedefekt, Letalität frühes L2, Hungerresistenz

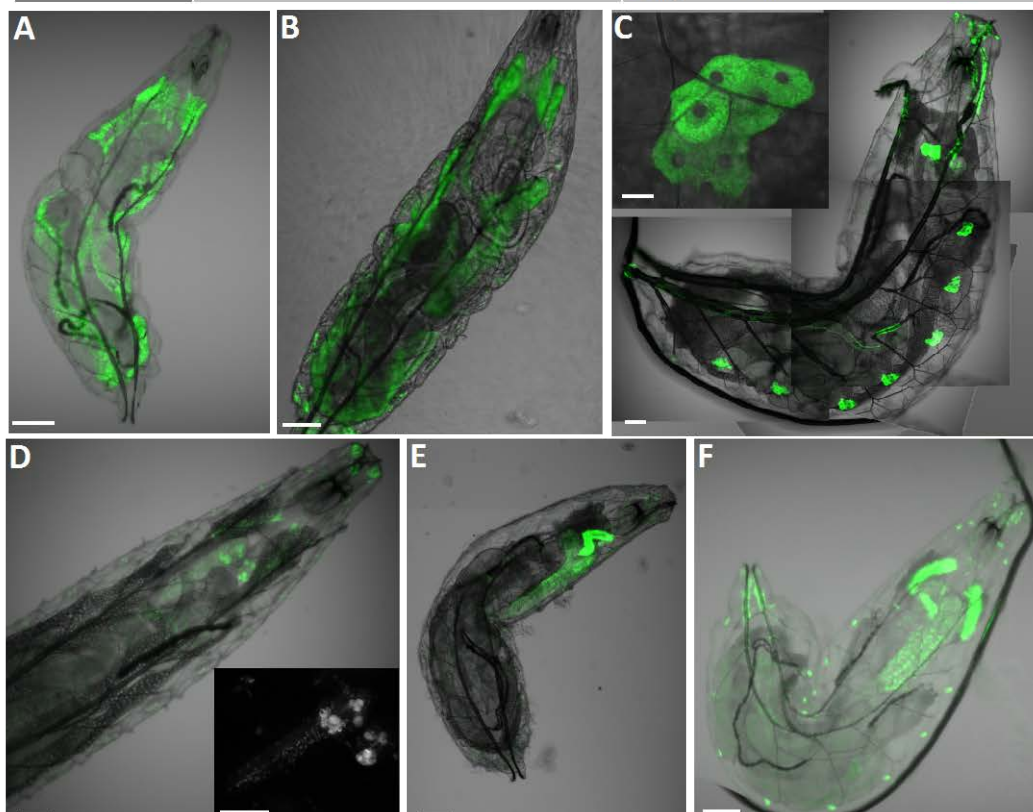


Abbildung 3.17: Expressionsmuster der untersuchten spezifischen Treiberlinien.

Die in der Tabelle 3.1 zusammengefassten Linien wurden nach ihrem Expressionsmuster untersucht, um die Spezifität der Promotoren festzustellen. Das eYFP Signal, zeigt die Aktivität des jeweiligen Promotors in lebenden L2 Larven. (A) Fettkörpertreiber *CG-Gal4*. (B) *Dilp6*-Treiber *Dilp6-Gal4*. (C) Oenozyten-treiber *Oenozyten-Gal4*. In der Detailaufnahme ist ein Oenozyten-Cluster zu sehen. (D) Neuroblastentreiber *31-1-Gal4*. In der Detailaufnahme ist das Gehirn zu sehen. (E) Panglia-Treiberlinie *Repo-Gal4*. (F) Cortex Glia-Treiberlinie *cortex glia-Gal4*. Maßstab repräsentiert 100µm in den Hauptbildern und 20µm in den Detailaufnahmen.

3.5.1 Effekt der *enok*-Überexpression im Fettkörper

Wie die Analyse des *enok*-Promotors zeigte, wurde Enok im Embryo und im ersten Larvalstadium in vielen Fettkörperzellen exprimiert. Jedoch endete die Promotor-Aktivität in diesem Gewebe mit dem Übergang in das zweite Larvalstadium. Um zu untersuchen, ob der *enok*-Phänotyp durch diese zeitspezifische Expression verursacht wurde oder die Expression im Fettkörper nur bei der Entwicklung relevant ist, wurde der Fettkörpertreiber *CG-Gal4* benutzt. Mit diesem spezifischen und sehr starken Treiber wurde das Überexpressionskonstrukt *UAS-Enok;eYFP* aktiviert und der Phänotyp untersucht. Die Larven zeigten im Laufe der Entwicklung einen ähnlichen Verhaltens-Phänotyp wie die *enok-Gal4* Tiere. Gleich nach dem Schlüpfen aus dem Ei konnte der Wanderphänotyp beobachtet werden. Sie verließen die Hefe und wanderten auf der Apfelsaftagarplatte, ernährten sich von dem zuckerhaltigen Apfelsaftagar und mieden die Hefe. Trotz der zuckerhaltigen Nahrungsquelle zeigten die Tiere einen sehr deutlichen Wachstumsdefekt und starben alle im zweiten Larvalstadium. Die Frage, warum die Tiere ungewöhnlicher Weise Zucker vor Protein bevorzugten, konnte durch die Analyse der TAG-Verteilung erklärt werden.

Die Oil Red O Färbung ließ erkennen, dass die Tiere eine gestörte Fettspeicherung aufwiesen. Die Larven (n=40), die auf PBS durchtränkten Filterpapieren mit Hefe aufgezogen wurden, zeigten eine andere Verteilung der Neutrallipide, als die Kontrolle. Erstaunlicherweise speicherten diese Tiere keine Lipide in den Fettkörperzellen (Abb. 3.18A, Abb. 7.21A). Der Fettkörper war komplett frei von TAGs. Im Gegensatz dazu waren in Mitteldarm-Epithelzellen ungewöhnlich viele und besonders große Lipidtröpfchen (2,5-20 µm) gespeichert (Abb. 3.18B,F und Abb. 7.21C,G). Außerdem wurden TAGs in Mitteldarm-Epithelzellen detektiert, wo normalerweise keine gespeichert werden. Die Oenozyten enthielten wie auch bei der Kontrolle keine Lipidtröpfchen (Abb. 3.18C). Nach 14 Stunden der Hungerperiode änderte sich die Verteilung der TAGs nicht in den Geweben (n=24). Die Morphologie des Fettkörpers hatte sich dahingehend verändert, dass dieser sehr dünn und flach wurde. Auch hier wurden keine Lipidtröpfchen in den Zellen detektiert (Abb. 3.18A', Abb. 7.21B). Der Mitteldarm enthielt im Gegensatz dazu auch nach den 14 Stunden des Hungerns auf PBS immer noch sehr viel Lipidtröpfchen (Abb. 3.18B',F, Abb. 7.21D,G), auch der Durchmesser der Tröpfchen war auffällig vergrößert (1-11µm). In den Oenozyten wurde ebenfalls im Gegensatz zur Kontrolle keine Akkumulation von Lipiden detektiert. Das würde bedeuten, dass sogar unter einer Extrembedingung wie dem Hungern, der Transport der Fette von den Speicherorten zu den Zielorten, wo diese Fette zur Energiegewinnung gebraucht werden, nicht stattfindet. Dasselbe konnte auch bei der Überexpression unter der Kontrolle des *enok*-Promotors beobachtet werden, da auch dort unter Hungerbedingungen die Lipide aus dem Darm nicht abtransportiert wurden (Abb. 3.18B',F, Abb. 7.21D,G). Dieser fehlende Abtransport der Lipide aus dem Darm würde auch die Präferenz für Zucker erklären. Die Larve adaptiert ihr Verhalten und ihre Nahrungspräferenz für eine schneller zugängliche Energieform (Zucker), deren Transport aus den Mitteldarm-Epithelzellen nicht betroffen war.

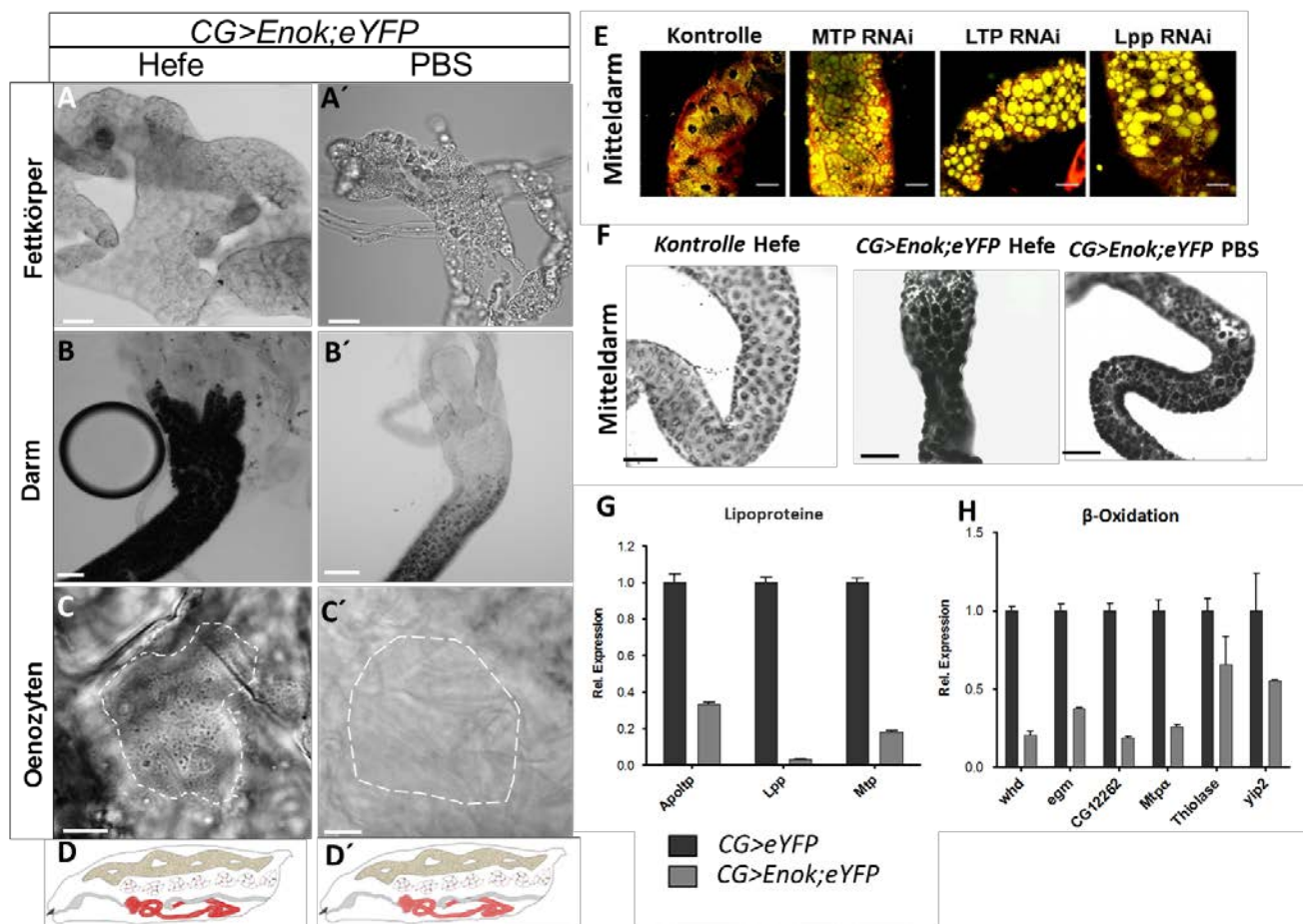


Abbildung 3.18: Funktion von Enok im Fettkörper.

Unter Anwendung des CG-Treibers wurde die Funktion von Enok im Fettkörper analysiert. Die Überexpression wurde auf die Lipidverteilung mittels der Oil Red O Färbung analysiert. Die Akkumulation wurde unter zwei Nahrungsbedingungen angeschaut: Hefe (proteinreiche Nahrung) oder PBS (Hunger) (A-C'). Die Akkumulation der Lipide bei proteinreicher Nahrung konnte nur im Darm detektiert werden (B). Die Akkumulation war ungewöhnlich stark und die Lipidtröpfchen besonders groß (2,5-20 μ m). Der Fettkörper enthielt keinerlei Lipide (A). Nach 14-stündigem Nahrungsentzug änderte sich die Akkumulation nicht. Es konnten keine Lipide im Fettkörper (A') und in den Oenozyten detektiert werden (C'). Die Oenozyten wurden mit einer gestrichelten Linie umrandet. Im Darm waren immer noch Lipide akkumuliert (B'). In der schematischen Zeichnung ist die Lipidverteilung bei beiden Bedingungen zusammengefasst (D,D'). (E) Bei der Herunterregulation von Lipoproteinen MTP, LTP und Lpp im Fettkörper werden die Lipidtröpfchen im Mitteldarm akkumuliert. Visualisierung mit NILE RED. (Übernommen von Palm et al., 2012). Phänotyp ähnelt dem, welcher durch die *enok*-Überexpression im Fettkörper verursacht wurde. (F) Die durchschnittliche Tröpfchengröße in der Kontrolle unter Hefe beträgt 1-4 μ m. Im Mitteldarm der Überexpressionstiere werden unter Hefe sehr große Lipidtröpfchen akkumuliert (2,5-20 μ m). Diese werden auch nach einem Nahrungsentzug (PBS) von 14h nur langsam verkleinert (1-11 μ m). (G) Transkriptionelle Analyse der Lipoprotein Expression zeigte, dass die Transkripte von *Apoltp/LTP*, *Lpp* und *Mtp* in in der Überexpression im Vergleich zur Kontrolle stark reduziert sind. (H) Die Gene der β -Oxidation waren in den Tieren ebenfalls reduziert. Bei einer Überexpression von *enok* im Fettkörper findet kein Lipidtransport zwischen den Geweben statt, zusätzlich sind die Gene der β -Oxidation in ihren Transkriptleveln reduziert. Fehlerbalken repräsentieren standard error of the mean (SEM). Maßstab repräsentiert in (C,C') 10 μ m, in (A,A') 20 μ m, in (B,B',E,F) 50 μ m. *Apoltp/LTP*, Lipid Transfer Protein; *egm*, *enigma*; *Lpp*, Lipophorin; *Mtp*, Microsomal Triglyceride Transfer Protein; *Mtpa*, Mitochondrial trifunctional protein a subunit; *yip2*, *yippee interacting protein 2*.

Interorganeller Lipid-Transport wird durch Lipoproteine gesteuert (Palm et al., 2012). Zu diesen Proteinen gehören LPP, LTP und MTP. Die bei Palm et al. beschriebenen RNAi Experimente, bei denen jeweils eins der Lipoproteine runterreguliert wurde, zeigten einen ähnlichen Phänotyp in den Mitteldarmzellen (Abb. 3.18E). Bei der Reduktion von LTP und LPP konnte ebenfalls eine dramatische Vergrößerung der Neutrallipidtröpfchen beobachtet werden (Palm et al., 2012). Die mRNA Level der Lipoproteine in den Larven der Kreuzung *CG>Enok;eYFP* waren im Vergleich zur Kontrolle signifikant reduziert (Abb. 3.18H, Abb. 7.22A). LPP als der wichtigste Hämolymphe-Lipidträger war in den Überexpressionsmutanten 48fach reduziert. Diese dramatische Reduktion des Transkripts von LPP könnte neben der primären Funktion des Lipidtransports eine weitere Funktion beeinträchtigen, welche ebenfalls den Enok-Phänotyp erklären könnte. Diese Aufgabe von LPP wurde von Brankatschk und Eaton (2010) beschrieben. In dieser Publikation wurde gezeigt, dass LPP notwendig ist um die Neuroblastenproliferation zu induzieren (Brankatschk und Eaton, 2010). Dies könnte eine weitere Hypothese bieten, welche die fehlende Neuroblastenteilung erklären könnte. Die Transkriptionslevel der beiden anderen Lipoproteine *LTP* und *MTP* war nicht dramatisch jedoch signifikant ($p < 0,01$) reduziert (*LTP* 2,6fach, *MTP* 6,9fach). Bei diesen Tieren war eindeutig der Lipidtransport auf transkriptioneller Ebene durch die Fehlfunktion von Enok verursacht (Abb. 3.18G, Abb. 7.22A). Hier wurden die Level der Transportproteine so stark reduziert, dass gar kein Transport der durch die Nahrung aufgenommenen oder neusynthetisierten Lipide aus dem Darm mehr stattfinden konnte. Zusätzlich dazu waren ebenfalls die Gene der β -Oxidation in den Überexpressionstieren reduziert (Abb. 3.18H, Abb. 7.22B), was erklärt warum auch nach einer 14-stündigen Hungerperiode immer noch Neutrallipidtröpfchen in den Zellen des Mitteldarm-Epithels in sehr hoher Zahl vorhanden waren (Abb. 3.18F, Abb. 7.21E-G). Zusammenfassend kann man sagen, dass Enok im Fettkörper die transkriptionelle Kontrolle der Lipoproteine übernimmt, und damit mehrere systemische Prozesse steuert.

3.5.2 Die Regulation der Lipoproteine durch Enok

Der Lipidtröpfchen-Phänotyp stimmte nicht mit dem überein, der durch die Überexpression unter der Kontrolle der *enok-Gal4* Linie verursacht wurde. Deshalb wurde untersucht, ob mRNA Level der Lipoproteine überhaupt in den Überexpressionstieren des Genotyps *enok>Enok;eYFP* und in den *enok* Mutanten beeinträchtigt wurden. Das Expressionsmuster des *enok*-Promotors zeigt, dass der Fettkörper nur während der Embryonalentwicklung und des ersten Larvalstadiums (Abb. 3.19A, Abb. 7.23A) Enok exprimiert. Dies erklärt auch, warum die mRNA Level der Lipoproteine während des zweiten Larvalstadiums in den Überexpressionstieren nicht mehr so stark reduziert waren (Abb. 3.19B, Abb. 7.23B,C). Zu diesem Zeitpunkt war der *enok*-Promotor im Fettkörper nicht mehr aktiv und die Enok Proteinlevel möglicherweise wieder normalisiert. Im dritten Larvalstadium konnte gar kein GFP-Signal im Fettkörper mehr detektiert werden (Abb. 7.23A-A''). Dadurch könnte Enok die Transkription der Zielgene nach der Theorie der Balance wieder steuern. Die Expression war

nur noch um die Hälfte herunterreguliert, was jedoch immer noch ausreichte, um den Transport der Lipide aus den Darmepithelzellen oder zu den Oenozysten während des Hungerns zu verhindern. Durch die Analyse der *enok* Mutante wurde bestätigt, dass tatsächlich auch durch das Fehlen von Enok die Transkription von *LPP* und *MTP* sehr stark beeinflusst wurde, da die mRNA Level nur ein Zehntel der Kontrollmenge ausmachten (Abb. 3.19C, Abb. 7.23B,C).

Da der Enok Promotor während des zweiten und des dritten Larvalstadiums nicht mehr im Fettkörper aktiv ist, wurde das temperatursensitive Gal80-System (*tubGal80ts*) benutzt, um die Expression des gewünschten Promotors nur zur gewünschten Zeit zu aktivieren und damit entwicklungsabhängige Effekte zu vermeiden. Dazu wurden zwei von einander unabhängige Experimente durchgeführt. Der Verlauf ist in Abbildung 3.19D dargestellt. Die Tiere wurden auf 18°C für 96Std. bei proteinreicher Nahrung aufgezogen. Die restriktive Temperatur von 18°C ermöglichte es dem Gal80ts Protein an das Gal4 Protein zu binden und dadurch die Transkription des Respondergens zu verhindern. Bei dieser Temperatur wurde jedoch das Wachstum der Larven verlangsamt, so dass diese 96 Stunden brauchten um das dritte Stadium zu erreichen. Nach diesem Zeitpunkt wurden die Larven auf 29°C transferiert, dadurch dissoziierte das Gal80ts vom Gal4 und das Gal4 konnte die Transkription des Respondergens starten. Die Larven beider Versuchsdurchführungen wurden für drei Stunden bei 29°C gehalten, bevor sie dann auf die verschiedenen Futterbedingungen gesetzt wurden. Danach wurde ein Versuchsansatz für weitere 12 Stunden auf 29°C gehalten, während der andere für dieselbe Zeit zurück auf 18°C transferiert wurde, um das Gal80ts wieder zu aktivieren und das Gal4 zu blockieren. Dadurch wurde erreicht, dass die Menge des *enok* Transkripts in den verschiedenen Versuchsansätzen variierte (Abb. 7.24A,B). Nach dreistündiger Aktivität von *enok* wurde eine vierfache Induktion gemessen. Nach 15 Stunden konnte eine mehr als 100fache Menge des *enok* Transkripts detektiert werden. Der Effekt der dreistündigen Aktivierung auf die Lipoproteine ist in Abbildung 3.19E und Abbildung 7.25A festgehalten. Die kurze Aktivität hatte zur Folge, dass die Transkription von *LPP* und *MTP* sogar induziert wurde, was durch das zusätzliche Hungern eher verstärkt wurde. Diese kurze Aktivierungszeit imitiert die natürliche Induktion von *enok* während einer Hungerperiode (Zinke, 2003) und hat die Induktion der Enok-abhängigen Gene zur Folge.

Bei einer über 100-fachen Überexpression von *enok* nach 15 Stunden war der loss-of-function Phänotyp zu beobachten. Zusätzlich war der *enok*-Promotor seit dem zweiten Larvalstadium nicht mehr im Fettkörper aktiv, um die Transkription der Lipoproteine zu beeinflussen. Sowohl bei proteinreicher, als auch bei Nahrungsentzug unterschieden sich die Level der Transkripte nicht von denen der Kontrollen (Abb. 3.19F, Abb. 7.25B). Das bedeutet, dass während der embryonalen und frühen larvalen Entwicklung bis zum zweiten Stadium Enok die transkriptionelle Aktivität von Lipoproteinen im Fettkörper steuert, diese Aufgabe jedoch nach dem zweiten Larvenstadium möglicherweise von einem anderen Protein übernommen wird.

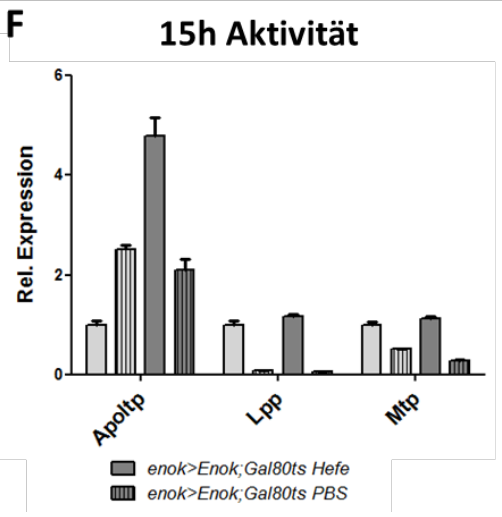
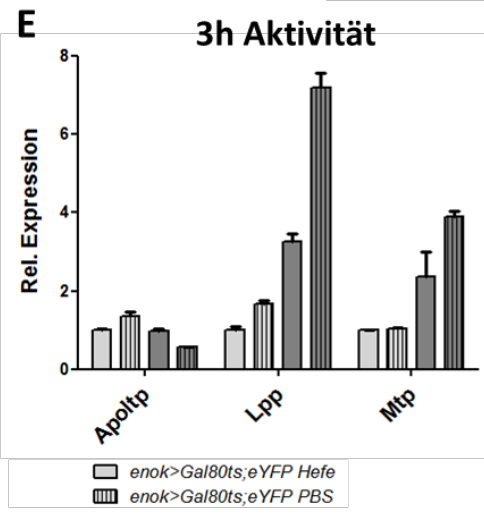
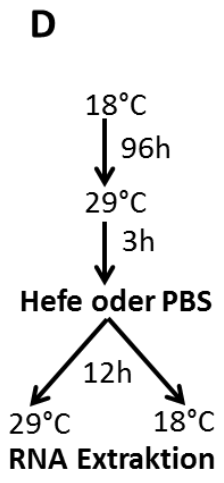
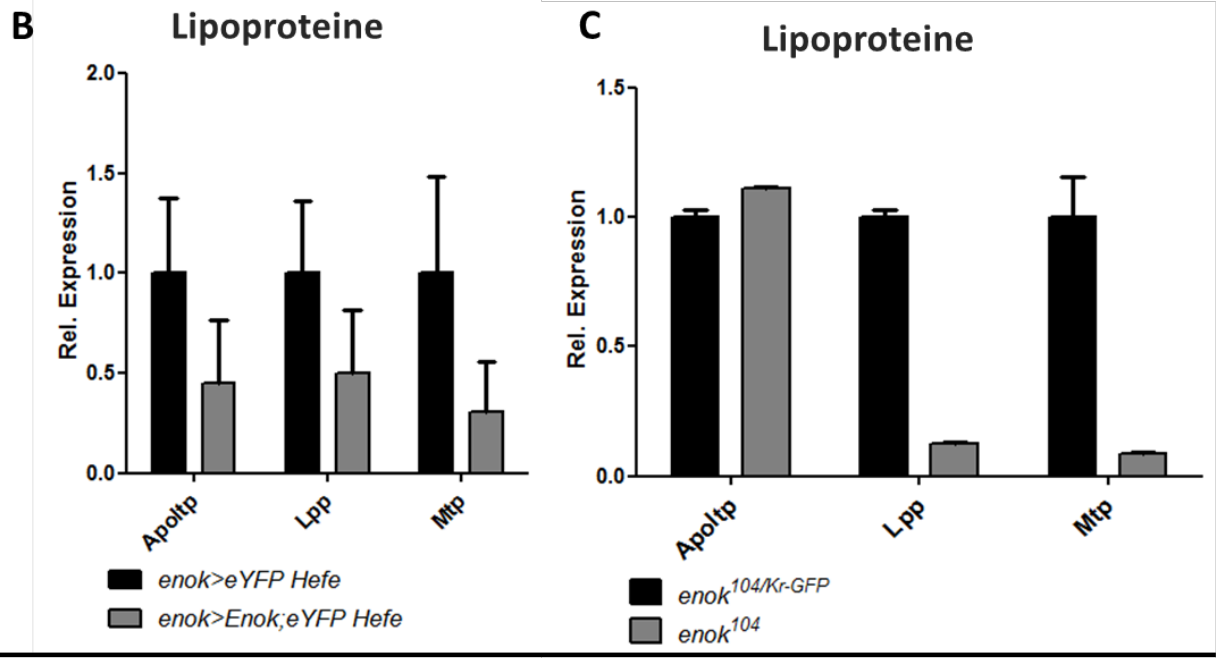
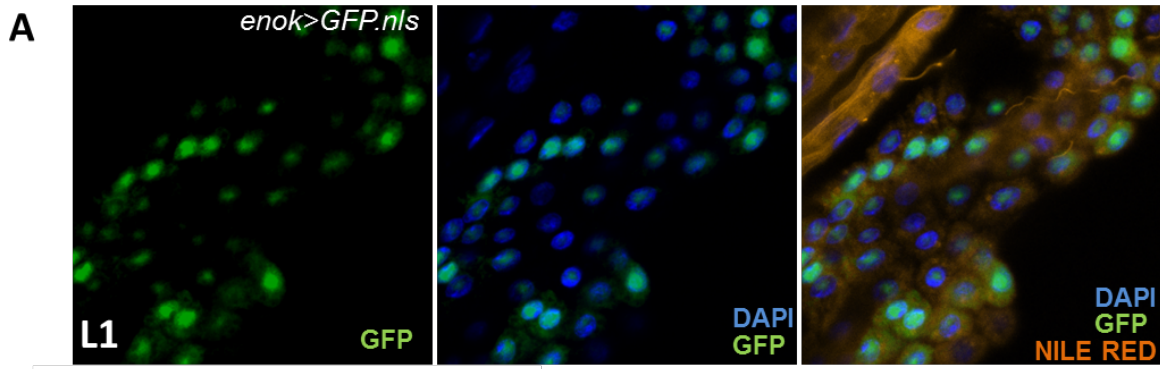


Abbildung 3.19: Lipoproteinexpression wird nicht während der gesamten Entwicklung von Enok kontrolliert.

(A) Immunfluoreszenz-Färbung des kernlokalisierten GFP-Signals unter der Kontrolle des *enok*-Promotors in der Larve des ersten Larvalstadiums (L1). Die Expression von GFP (grün) ist in den Kernen des Fettkörpers (NILE RED, orange) während dieses Stadiums zu sehen. Die Expression ist nicht mehr in allen Zellen zu sehen. Der Promotor verliert schon seine ubiquitäre Expression. (B) Transkriptionelle Analyse der Lipoproteinexpression in der Überexpression von *enok* kontrolliert durch den *enok*-Promotor. Hier wurde die Expression im zweiten Larvalstadium untersucht. (C) Transkriptionelle Analyse der Lipoproteine in *enok*¹⁰⁴-Mutanten. Die Expression der Lipoproteine ist in beiden Genotypen durch die Missexpression von *enok* beeinträchtigt. (D-F) Gal80ts-abhängige Expressionsanalyse der Lipoproteine. Durch das Gal80ts-System wird eine gewebe- und zeitspezifische Überexpression von *enok* unter der Kontrolle des *enok*-Promotor erreicht. (D) Schematischer Aufbau des Versuchsverlaufs. (E) Gal80ts-abhängige Expression der Lipoproteine nach einer dreistündigen Überexpression von *enok*. (F) Gal80ts-abhängige Expression der Lipoproteine nach einer 15-stündigen Überexpression von *enok*. Die Aktivität wurde zusätzlich unter verschiedenen Nahrungsbedingungen (Hefe und PBS) untersucht. Die Expression der Lipoproteine hängt im dritten Larvalstadium (nach 96h) nicht mehr von Enok ab. Enok reguliert die Lipoproteine entwicklungsabhängig. Fehlerbalken repräsentieren standard error of the mean (SEM). Primäre Antikörper: (A) chicken α -GFP. *Apoltp*, *Lipid Transfer Protein*; *Lpp*, *Lipophorin*; *Mtp*, *Microsomal Triglyceride Transfer Protein*.

Im dritten Stadium verursacht die starke Überexpression keinen *loss-of-function* Phänotyp mehr. Die Lipoproteine werden adäquat exprimiert (Abb. 3.19F, Abb. 7.25F). Zusammenfassend könnte man sagen, dass die Überexpression von *enok* im Fettkörper nur partiell an dem Phänotyp beteiligt ist, wie zum Beispiel an dem fehlenden Transport der Lipide aus dem Darm und zu den Oenozysten während des Hungerns, jedoch nicht das Wanderverhalten und die fehlende transkriptionelle Hungerantwort erklärt. Diese Vorgänge müsste demzufolge ein anderes Gewebe steuern.

3.6 Effekt der *enok*-Überexpression in den Oenozysten

Ein weiterer Zelltyp, in welchem Enok während der gesamten Entwicklung bis zum adulten Tier exprimiert wird, sind die Oenozysten. Die Funktion dieser Zellen ist weitestgehend unbekannt. Nach den neuesten Erkenntnissen wird ihnen die Funktion der humanen Hepatozyten zugesprochen, da sie ähnlich diesem Zelltyp, während einer Hungerperiode Lipidtröpfchen akkumulieren, um diese dann schneller und in größeren Mengen in Energie umwandeln zu können.

Um zu untersuchen, ob die Funktion von Enok in diesen Zellen eine autonome oder eine systemische Rolle übernimmt, wurde die *UAS-Enok;eYFP* Responderlinie unter der Kontrolle des spezifischen Oenozysten-Promotors *Oenozysten-Gal4* exprimiert. Die phänotypische Untersuchung ergab einen etwas anderen Phänotyp als den, der durch die *enok-Gal4* Linie verursacht wurde. Die Larven zeigten einen Wachstumsdefekt, der während des dritten Stadiums auftrat, dabei war das Ausmaß des Wachstumsdefekts sehr von der Nahrungsquelle abhängig. Je proteinreicher die Nahrungsquelle war, desto geringer war der Unterschied zwischen der Kontrolle und der Überexpressionskreuzung in der Größe, jedoch erreichten die Tiere nie die Größe der Kontrolllarven (Abb. 3.21B, Abb. 7.28A). Dabei zeigten die Larven ebenfalls das Wanderverhalten und verließen vorzeitig die Nahrungsquelle. Die Sterblichkeit der Kreuzung betrug 100%. Die meisten Tiere starben im frühen dritten Larvalstadium. Die

wenigen Ausreißer, die es schafften sich zu verpuppen, starben in der Puppe (Tab. 3.1).

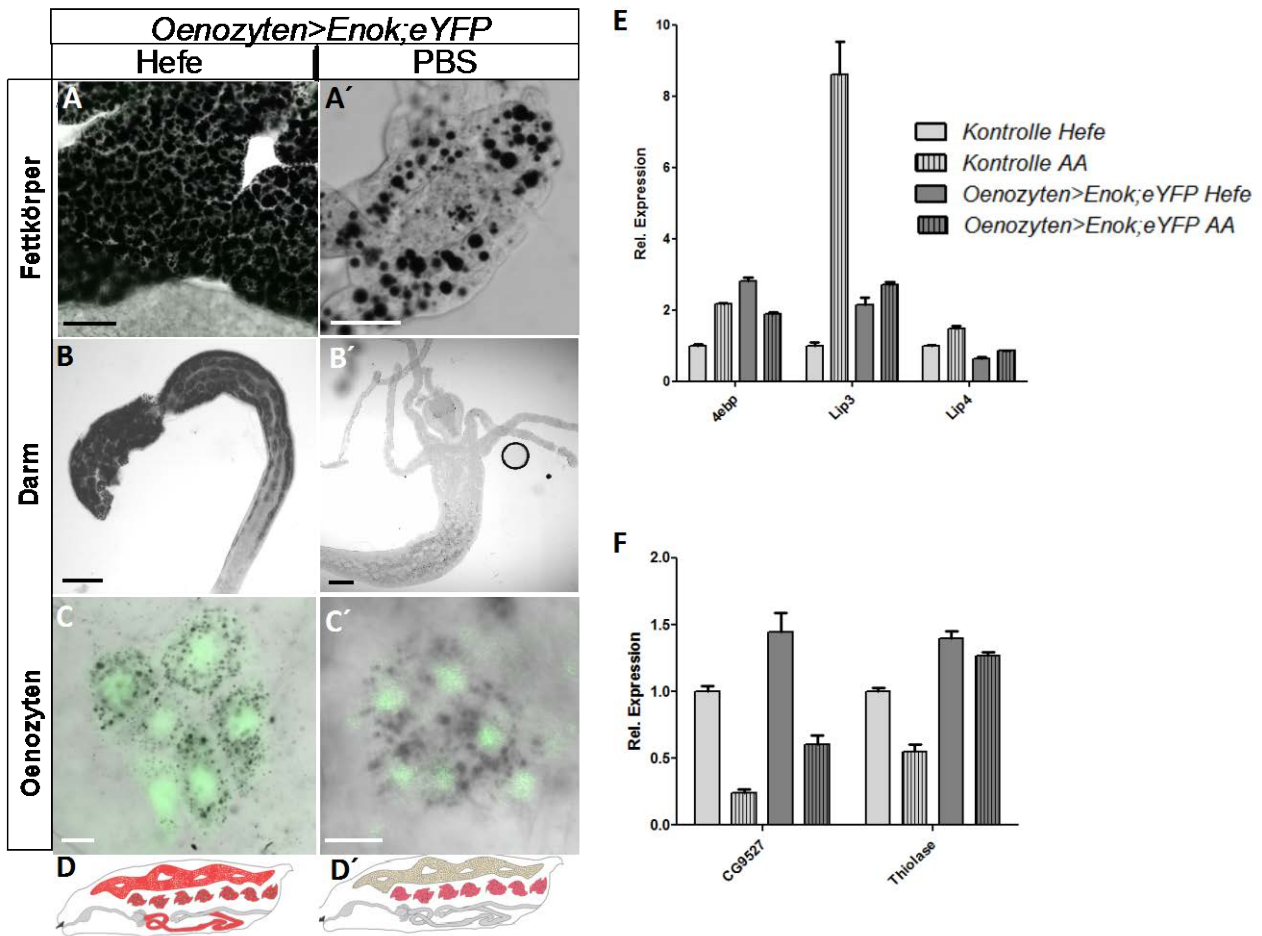


Abbildung 3.20. Phänotypische Analyse der Überexpression von *enok* in den Oenozyten.

(A-C') Oil Red O Färbung von *enok*-Überexpressionstieren unter der Kontrolle der *Oenozyten-Gal4* Linie. Die Lipidakkumulation wird auf proteinreicher Nahrung (Hefe) und unter Hunger (PBS) in den drei Geweben, Fettkörper, Darm und Oenozyten, untersucht. Die Lipidverteilung auf Hefe im Fettkörper (A) und Darm (B) entspricht der Kontrollsituation. In den Oenozyten ist ebenfalls eine Akkumulation zu sehen (C). Dies entspricht in der Kontrollsituation eher dem gehungerten Zustand. Nach einer Hungerperiode von 14h wurde der Lipidgehalt ebenfalls untersucht (A', B', C'). Hier konnte eine Verstärkung der Lipidmobilisation und des Abbaus beobachtet werden. (A') Im Fettkörper sind nur noch vereinzelte Lipidtröpfchen gespeichert (A'). Dies deutet auf einen gesteigerten Abbau hin. Der Darm (B') und die Oenozyten (C') verhielten sich wildtypisch. (D, D') Schematische Darstellung der Lipidverteilung. (E-F) Transkriptionelle Analyse der *enok*-Überexpressionstieren unter der Kontrolle des Oenozyten-Treibers. Untersucht wurde die Expression des Wachstumsarrestgens *4ebp* und der Hungermarker *Lip3* und *Lip4* (E). Weiterhin wurden Gene der β -Oxidation angeschaut (F). Die Expression der Gene deutete auf einen verstärkten Lipidabbau hin und bestätigte die Oil Red O Ergebnisse. Maßstab repräsentiert in (C, C') 10 μ m, (A, A') 50 μ m, (B, B') 100 μ m. Fehlerbalken repräsentieren standard error of the mean (SEM). *4ebp*, eukaryotischer Initiationsfaktor 4E-Bindeprotein; *Lip3*, *Lipase3*; *Lip4*, *Lipase4*.

Die Verteilung der Neutrallipidtröpfchen, detektiert durch Oil Red O Färbung in den Larven der Kreuzung *Oenozyten>Enok; eYFP* (n=40), zeigte eine andere Verteilung als bei der Kontrolle. Die Überexpression von *enok* in den Oenozyten führte zu einer starken Akkumulation der Lipidtröpfchen in den Oenozyten bei proteinreicher Nahrung (Abb.3.20C, Abb. 7.26E), was ungewöhnlich war, da bei dieser Diät keine Tröpfchen in der Kontrolle gefunden wurden (Abb. 3.16C). Im Fettkörper (Abb. 3.20A, Abb. 7.26A) und im Mitteldarm (Abb. 3.20B, Abb. 7.26C) wurden keine Unterschiede zur Kontrolle festgestellt. Die Tiere, die für 14 Stunden auf

proteinarmer Nahrung (AA= Apfelsaftagar) gehalten wurden, hatten fast komplett die Lipide im Fettkörper (Abb. 3.20A, Abb. 7.26B) abgebaut. Nur noch einzelne Zellen enthielten noch Lipidtröpfchen. Der Fettkörper glich mehr den Tieren, die für 24 Stunden auf PBS gehalten wurden, was für einen verstärkten Abbau spricht und damit für eine erhöhte Metabolismusrate. Der Darm war ebenfalls frei von Lipidtröpfchen (Abb. 3.20B, Abb. 7.26D). Die Oenozyten besaßen Lipidtröpfchen, jedoch weniger als die Kontrolle, was jedoch eher der starken Reduktion der Fettreserven im Fettkörper zuzuschreiben war.

Der leichte Wachstumsdefekt wurde auch durch die dreifache Induktion der *4ebp* RNA Level bestätigt. Dies erklärt auch weshalb die Tiere erst während L3 starben und nicht wie im Fall der *enok-Gal4* im L2. Es war jedoch sehr interessant, dass knapp 100 Zellen in der Lage waren, das Wachstum des gesamten Körpers zu steuern und zu stoppen. Trotz des starken Abbaus der Lipide während des Hungerns waren die beiden Lipasen *Lip3* und *Lip4* im Vergleich zu der gehungerten Kontrolle nicht induziert (Abb. 3.20E, Abb. 7.27). Möglicherweise wurde die Lipolyse von einer anderen Lipase übernommen, wie zum Beispiel von Brummer. Die β -Oxidation war im Gegensatz dazu nicht beeinträchtigt. Die Acyl-CoA Dehydrogenase *CG9527* und *Thiolase* waren bei beiden Futterbedingungen sogar induziert (Abb. 3.20F, Abb. 7.27). Dies würde auch den stärkeren Abbau der Lipide im Fettkörper erklären. Jedoch sah damit der Phänotyp bezüglich der transkriptionellen Regulation, als auch des Lipidgehalts anders aus als durch die *enok-Gal4* Linie hervorgerufen. Das bedeutet, dass der Phänotyp von einem anderen Gewebe verursacht wurde. Zusätzlich lässt es sogar vermuten, dass Enok in diesem bis jetzt unbekanntem Gewebe sogar die Funktion von Enok in den Oenozyten überschreibt.

Der Phänotyp, welcher durch die *Oenozyten-Gal4* verursacht würde, würde eigentlich nicht zum Tode der Tiere führen, sondern nur zu einer erhöhten Metabolismusrate. Warum der Tod eintritt und welche Rolle die Oenozyten darin spielen, muss noch beantwortet werden. Im nächsten Kapitel wurde diese Fragestellung ausführlich bearbeitet.

3.6.1 Funktion von Enok im respiratorischen System

Neben der Hepatozyten-ähnlichen Aufgabe des schnelleren Abbaus der Fettreserven während Mangelernährung wurde den Oenozyten eine weitere Funktion im Fettsäure Metabolismus zugeschrieben. Die Oenozyten produzieren hier eine bestimmte Fettsäure, die benötigt wird um aus der Distanz die Abdichtung des respiratorischen Systems zu kontrollieren (Parvy et al., 2012). Wie in der Abbildung 3.21A dargestellt, wird durch die Herstellung der *very long chain fatty acids* (VLCFA) in den Oenozyten ein Signal zu den Spirakeln gesendet, wo diese ihrerseits Lipide produzieren und die Spirakelöffnungen abdichten. Die daran beteiligten Schlüsselenzyme wurden mit einem ovalen Kreis gekennzeichnet (Abb. 3.21A). Um zu überprüfen, ob die Spirakel abgedichtet sind und damit das ganze respiratorische System, kann ein Wasserdichtungstest durchgeführt werden. Hier wurden Larven eines gewünschten

Alters für maximal 10 Minuten in eine 0,1%ige Lösung Brilliant Blue gegeben. Danach wurden sie rausgenommen, gewaschen und fotografiert. Wenn der wasserlösliche blaue Farbstoff in den Tracheen gefunden wurde, waren das respiratorische System und damit auch die Spirakel nicht abgedichtet.

Dieses Experiment wurde mit den Tieren der Kreuzung *Oenozyten>Enok;eYFP* durchgeführt.

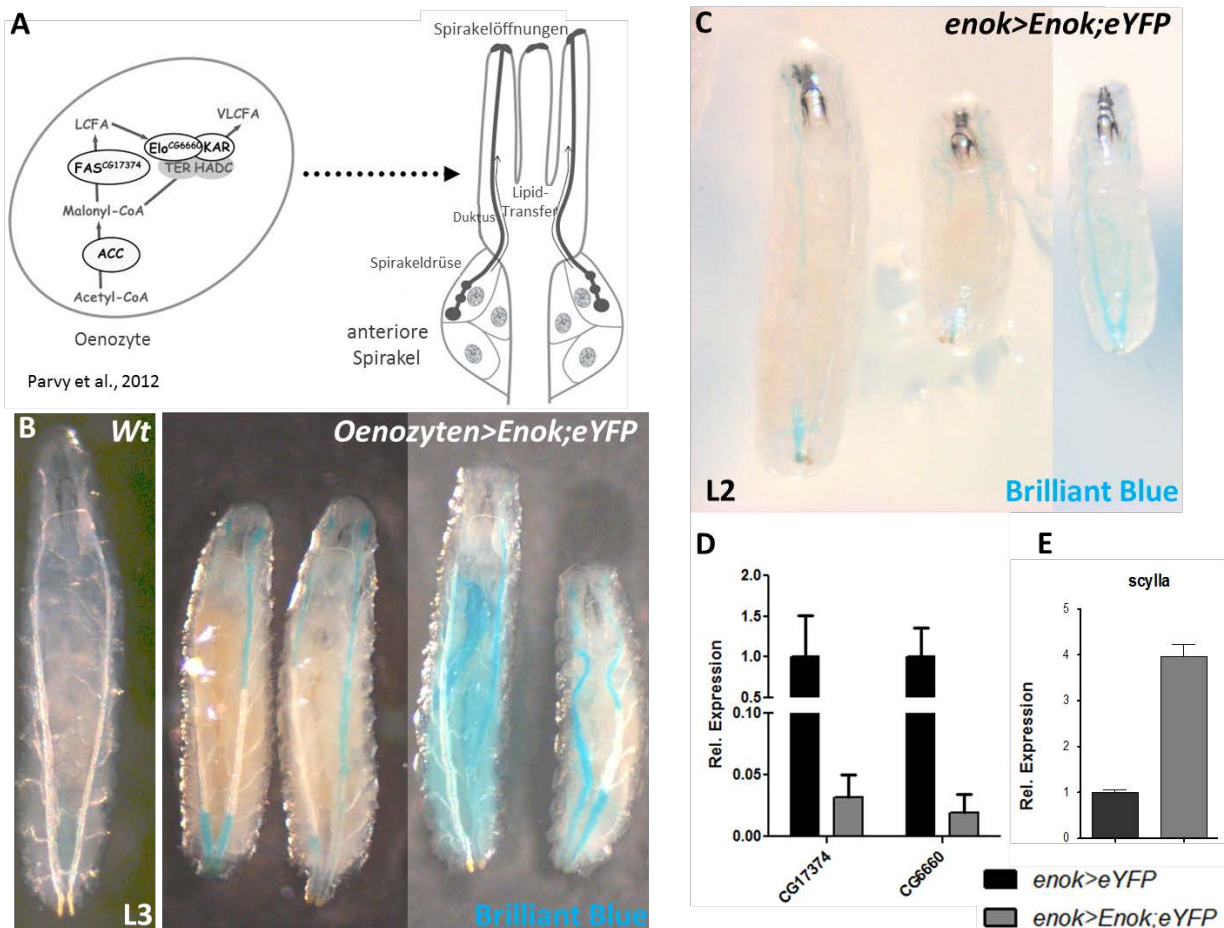


Abbildung 3.21: Enok ist verantwortlich für die Abdichtung des respiratorischen Systems.

(A) Schematische Darstellung der VLCFA-abhängigen Abdichtung des respiratorischen Systems. VLCFA-abhängiges fernlenkendes Signal aus den Oenozyten sorgt für die Abdichtung der Spirakelöffnungen. Bei fehlender Synthese der VLCFA in den Oenozyten misslingt der Transfer der Lipide aus der Drüse über den Duktus zu den Spirakelöffnungen. Die Gene, die für diesen metabolischen Prozess innerhalb der Oenozyten essenziell sind, sind mit einem Oval umrandet. Das Signal, welches die Oenozyten aussenden, ist bis jetzt nicht bekannt (übernommen von Parvy et al., 2012). (B,C) Um die Abdichtung der Spirakel zu testen, wird der Wasserabdichtungs-Test verwendet. Dazu werden Larven nicht länger als zehn Minuten in einer 0,1%igen Brilliant Blue Lösung gebadet. Dadurch kann man testen, ob und wie viel Flüssigkeit in die Tracheen eintritt. (B) Bei einer Überexpression von *enok* in den Oenozyten mit dem *Oenozyten*-Treiber wurde ein Eintritt der Flüssigkeit in die anterioren und posterioren Spirakel festgestellt. Larven befanden sich im dritten Larvalstadium. (C) Bei einer Überexpression von *enok* in den Oenozyten mit dem *enok*-Treiber liefen die Tracheen bereits in Larven voll, die sich im zweiten Larvalstadium befanden. Der Defekt scheint bei einer Überexpression mit dem *enok*-Treiber stärker zu sein, da hier noch andere Gewebe, die im Metabolismus eine wichtige Rolle spielen, betroffen sind. (D) Die transkriptionelle Analyse der Fettsäuresynthese-Gene, die für die Herstellung der VLCFA verantwortlich sind, zeigte eine starke Reduktion dieser Gene. (E) In den Überexpressionstieren der Kreuzung *enok>Enok;eYFP* wurde eine Induktion vom Hypoxiemarker *scylla* detektiert. Fehlerbalken repräsentieren standard error of the mean (SEM). VLCFA, very long chain fatty acid.

Die Überexpression von *enok* im zweiten Larvalstadium 64h nE zeigte keinen Defekt in der Wasserdurchlässigkeit. Dies ähnelte allerdings den Versuchen von Parvy und Kollegen (2012), in denen sie Gene, die an der Herstellung der VLCFA beteiligt waren, in Oenozyten herunterregulierten. Nach 86h nE zeigten die Tiere jedoch sehr starken Defekte in der Wasserabdichtung. Wie in Abbildung 3.21B und Abbildung 7.28A zu sehen, drang die blaugefärbte Flüssigkeit tief in die Tracheen ein, die Färbung war sogar in den kleineren Tracheenästen zu sehen. In den Oenozyten scheint Enok dafür verantwortlich zu sein, dass das Abdichten der Spirakel akkurat verläuft und die Tiere in ihrem semi-aquatischen Futter nicht ersticken.

Um zu untersuchen, ob auch im Fall der Überexpression unter der Kontrolle des *enok*-Promotors die Abdichtung nicht funktioniert, wurde der gleiche Test mit dem *enok*-spezifischen Treiber durchgeführt. In den *enok>Enok;eYFP* Tieren konnte der Wasserabdichtungsdefekt ebenfalls beobachtet werden. Der Defekt trat schon während des zweiten Stadiums, 64h nE auf (Abb. 3.21C, Abb. 7.28B). Die Larven zeigten eine ungewöhnlich frühe Füllung der Tracheen im Vergleich zu den bis jetzt bekannten Genotypen, die diesen Defekt verursachen könnten (Parvy et al., 2012). Auch hier wurde das Brilliant Blue in den Tracheen und in den Tracheenästen detektiert. Um sicher zu sein, dass der Defekt von den Oenozyten ausgelöst wurde, wurden die Schlüsselenzyme, die für die Abdichtung des Tracheensystems verantwortlich sind, auf ihre Transkriptmengen untersucht. Die Fettsäuresynthetase *FAS/CG17374* und die Elongase *Elo/CG6660* waren in ihrer Expression dramatisch reduziert (Abb. 3.21D, Abb. 7.28C). Dies lässt eine direkte Kontrolle von Enok über die Transkription dieser Gene vermuten. Beide Enzyme wurden mehr als 50-fach reduziert. Das lässt vermuten, dass der Wasserabdichtungsdefekt von den Oenozyten stammt und wahrscheinlich nicht durch einen sekundären Defekt der Tracheen verursacht wurde. Eine weitere transkriptionelle Kontrolle zur Analyse des Erstickens ist die Induktion des Hypoxie-Gens *scylla* (Reiling und Hafen, 2004) und das Auftreten des verfrühten Wanderverhaltens (McNabb et al., 1997). Im Fall der Überexpression von *enok* wurde sowohl die Induktion von *scylla* (Abb. 3.21E, Abb. 7.28D) als auch das Wanderverhalten, welches als Teil der Phänotypbeschreibung gilt, beobachtet. Zusammenfassend bedeutet es, dass mit Enok ein neuer Faktor in den Oenozyten beschrieben wurde, der vermutlich dafür sorgt, dass keine Flüssigkeiten in das respiratorische System eindringen kann und die Tiere nicht ersticken. Enok übernimmt damit eine weitere Funktion im Lipidmetabolismus, in diesem Fall in der Fettsäuresynthese der VLCFA.

3.7 Funktion von Enok im zentralen Nervensystem

Das zentrale Nervensystem macht während der Entwicklung zum adulten Gehirn verschiedene Teilungsprozesse durch. Aus den Neuroblasten entwickeln sich durch asymmetrische Teilung zuerst Ganglien Mutterzellen und danach, durch eine symmetrische Teilung dieser Zellen, differenzieren sich diese zu Neuronen. Neben Neuronen, die die Masse des ZNS dominieren,

gibt es einen weiteren sehr wichtigen Zelltyp, die Glia Zellen. Diese Zellen spielen eine entscheidende Rolle in der Erhaltung und Unterstützung der neuronalen Funktion.

Dass Enok eine wichtige Funktion in der Entwicklung des ZNS hat, wurde bereits von Scott et al., 2001 gezeigt. Welche der Zelltypen jedoch für den beschriebenen Effekt verantwortlich war, wurde nicht beschrieben. Da keines der Enok-exprimierenden Gewebe aus der Peripherie für den *enok* Phänotyp verantwortlich war, muss einer der betroffenen Zelltypen im ZNS diese Funktion erfüllen. Um zu untersuchen, welcher der Zelltypen für den Phänotyp verantwortlich ist, wurde auch hier mit spezifischen Treiber- und Enhancer/Trap-Linien gearbeitet.

In Tabelle 3.1 wurden die jeweiligen Phänotypen zusammengefasst. Neben den Neuroblasten (*31-1-Gal4*) wurde *enok* in zwei Gliazelllinien (*repo-Gal4* und *cortex glia-Gal4*) überexprimiert. Eine weitere Linie, *elav-Gal4*, wurde mit *UAS-Enok;eYFP* gekreuzt, um ausschließen zu können, dass der Effekt durch die postmitotischen Neurone verursacht wurde, da Enok zwar in den Vorläuferzellen jedoch nicht mehr in Neuronen selbst exprimiert wird. Dementsprechend hatte die Überexpression auch keine Wirkung auf die Entwicklung. Die Tiere zeigten keine Auffälligkeiten und entwickelten sich völlig normal (Tab.3.1).

Die Vorläufer der Neurone, die Neuroblasten, konnten durch die *31-1-Gal4* Linie gezielt und spezifisch untersucht werden. Die Überexpression von *enok* hatte eine starke Letalität von 90% während des zweiten Stadiums zur Folge. Weitere phänotypische Charakteristika des *enok* Phänotyps wurden nicht beobachtet. Die TAG-Gehaltanalyse zeigte ebenfalls keinen Unterschied zur Kontrolle. Dies lässt vermuten, dass dieser Phänotyp von einer anderen Zellgruppe verursacht wurde und in den Neuroblasten selbst hauptsächlich die Proliferation betroffen war.

Wie in Abbildung 3.12E und 3.12F dargestellt, wird Enok in Glia Zellen exprimiert. Der Phänotyp der Kreuzung *repo>Enok;eYFP* war ähnlich dem, der durch den *enok*-Promotor verursacht wurde (Tab. 3.1). Repo ist ein Panglia-Marker, der in allen vier Arten der Glia-Zelltypen vorkommt. Zu diesen gehören die Perineural Glia und die Subperineural Glia, die die Blut-Hirn-Schranke bilden. Die Cortex Glia Zellen ummanteln die Somata der Neurone und versorgen diese unter anderem mit Nährstoffen, bestimmen den Zeitpunkt der Proliferation der Neuroblasten und übernehmen viele weitere Aufgaben. Zwei weitere Typen der Glia Zellen sind im Neuropil zu finden. Die umhüllende Glia (*ensheathing glia*) trennt die Somata der Neurone von dem Neuropilfeld. Der zweite Zelltyp ist die Astrozyten Glia, welche das Neuropil, ähnlich wie bei den Säugetieren die Schwannschen Zellen, ummantelt.

Da der durch *repo-Gal4* verursachte Phänotyp mit sehr ähnlich dem *enok*-Phänotyp war, sollte als nächstes untersucht werden, welche der vier Zelltypen für den Effekt verantwortlich war.

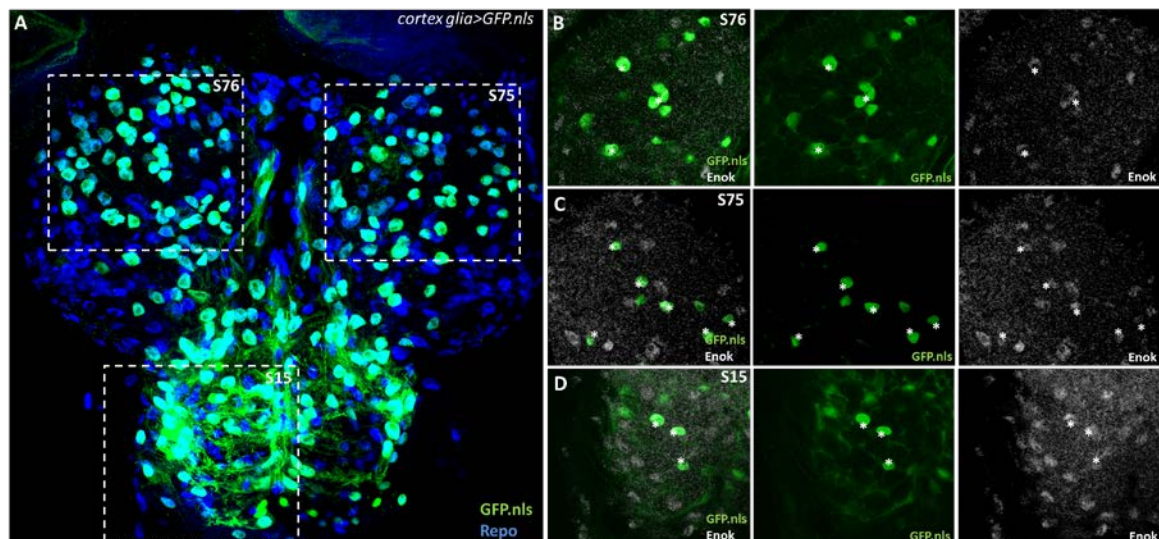


Abbildung 3.22: Enok ist in der Cortex Glia exprimiert.

(A) Immunfluoreszenz-Färbung der kernlokalisierten GFP-Expression (grün) unter der Kontrolle der *cortex glia-Gal4*. Die Gegenfärbung mit α -Repo AK markiert alle Glia Zellen. Das GFP-Signal ist ausschließlich in Glia Zellen zu sehen. Doch nicht alle Glia Zellen sind GFP-positiv. Die *cortex glia-Gal4* Linie ist nur in der Cortex Glia aktiv. Die eingezeichneten gestrichelten Umrandungen zeigen jeweils eine andere Ebene der Maximumprojektion an der eingezeichneten Position. Diese Ebenen sind in (B,C,D) gezeigt. Jede Ebene zeigt eine Co-Färbung von Enok (weiß) und dem GFP-Signal. Zellen, die positiv für beide Signale sind, sind mit einem Stern markiert. Jede GFP-positive Zelle ist auch positiv für Enok. S, Slide, die Zahl dahinter ist die Nummer des Slides in der Maximumprojektion. Primäre Antikörper: (A-D) chicken α -GFP; (A) mouse α -Repo; (B-D) rat α -Enok.

3.7.1 Überexpression in der Cortex Glia kopiert den *enok*-Phänotyp

Um herauszufinden, welche der vier Zellgruppen Enok-positiv ist, wurden Co-Färbungen von Enok, Repo und GFP, welches unter der Kontrolle des jeweiligen Treibers exprimiert wurde, durchgeführt. Nur die *cortex glia-Gal4* Linie zeigte eine 100%ige Überlagerung. In der Abbildung 3.22A und Abbildung 7.29A,E ist eine Färbung des kernlokalisierten GFP-Signals und des Repo Markers zu erkennen. In der Maximumprojektion ist zu sehen, dass jede GFP-positive Zelle auch eine Repo-positive Zelle ist, was diese Zellen als Glia Zellen identifizierte. In den eingesetzten Quadraten, welche jeweils eine Ebene der Projektion zeigen, war eine Doppelfärbung von Enok und GFP gemeinsam zu sehen (Abb. 3.22B-D, Abb. 7.29B-D und Abb. 7.29F-H). Die mit Sternen markierten Zellen weisen beide Signale auf. In diesen Fällen waren wiederum alle GFP positiven Zellen auch positiv für Enok. Die Zellen, welche nur positiv für Enok waren, waren Neuroblasten. Das bedeutet, dass die als Cortex Glia-positiv charakterisierte Gal4-Linie auch positiv für Enok war. Deshalb kann vermutet werden, dass der Phänotyp, welcher unter der Kontrolle der *repo-Gal4* verursacht wurde, tatsächlich nur durch die Subpopulation der Glia Zellen -die Cortex Glia- bewirkt wurde.

Um diese Theorie zu bestätigen, wurde auch die Kreuzung *cortex glia>Enok;eYFP* phänotypisch untersucht (n=24). Die Charakterisierung bestätigte, dass der Phänotyp durch Fehlexpression von Enok in Glia vollständig kopiert werden konnte (Tab. 3.1). Die Larven wanderten einige Stunden nach dem Schlüpfen aus der Nahrung. Sie zeigten einen Nahrungsaufnahmedefekt und einen durch diese Verhaltensweisen hervorgerufenen Wachstumsdefekt. Verbunden damit waren ebenfalls eine erhöhte Hungerresistenz und eine

Letalität im zweiten Larvalstadium. Auch hier starben die Tiere erst nach mehreren Tagen ohne das zweite Stadium zu verlassen.

Die Analyse der Neutrallipide in den Larven bestätigte die Hungerresistenz. Die Lipidtröpfchen konnten auf proteinreicher Nahrung wie in der Kontrolle (Abb. 3.16A,B,C) in den Fettkörperzellen (Abb. 3.23A, Abb. 7.30A) und den Mitteldarm-Epithelzellen (Abb. 3.23B) detektiert werden. In den Oenozyten konnten keine Lipidtröpfchen durch Oil Red O Färbung beobachtet werden (Abb. 3.23C, Abb. 7.30D). Bei den Tieren, die 14 Stunden lang gehungert wurden (PBS), sah man wie im Fall der *enok-Gal4* Linie keinen Abbau der Lipide in den Mitteldarm-Epithelzellen (Abb. 3.23B', Abb. 7.30C) und auch nicht im Fettkörper (Abb. 3.23A', Abb. 7.30B). Im Gegensatz zur Kontrolle akkumulierten in den Oenozyten keinerlei Lipidtröpfchen (Abb. 3.23C', Abb. 7.30E). Dies spiegelte den Phänotyp der Kreuzung *enok>Enok; eYFP* komplett wider.

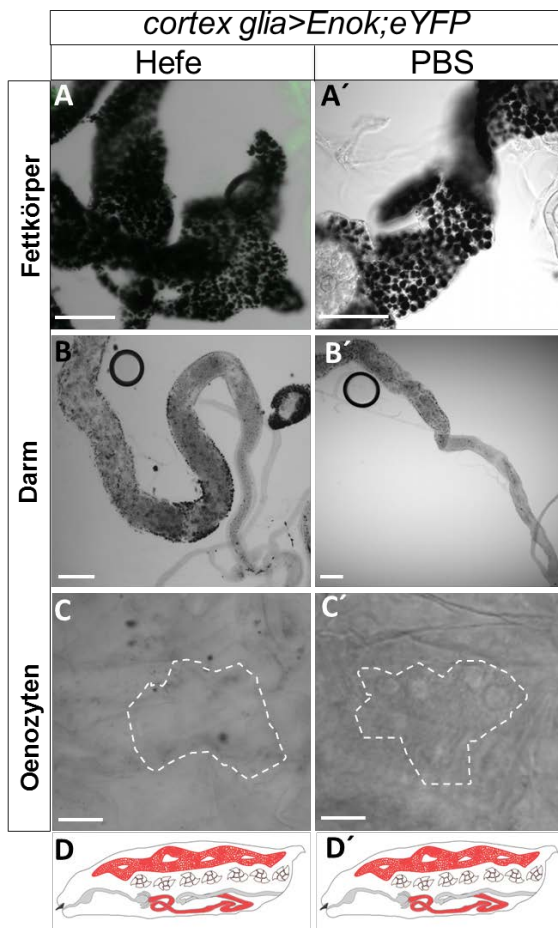


Abbildung 3.23: Phänotypische Analyse der Überexpression von *enok* in der Cortex Glia.

Die Überexpression von *enok* spezifisch in der Cortex Glia kopiert den *enok*-Phänotyp. (A-C') Oil Red O Färbung von *enok*-Überexpressionstieren unter der Kontrolle der *cortex glia-Gal4* Linie. Die Lipidakkumulation wird auf proteinreicher Nahrung (Hefe) und unter Hunger (PBS) in den drei Geweben, Fettkörper, Darm und Oenozyten, untersucht. Im Fall der *enok*-Überexpression in der Cortex Glia sah die Verteilung der Lipide auf Hefe aus wie im Wildtyp und wie bei der *enok*-Überexpression unter der Kontrolle des *enok*-Promotors. Lipide wurden im Fettkörper (A), im Darm (B), jedoch keine in den Oenozyten (C) detektiert. Nach 14stündigem Nahrungsentzug (PBS) konnte kein Lipidabbau festgestellt werden. Die Lipide wurden im Fettkörper (A') und zu großen Mengen im Darm (B') detektiert. Die Akkumulation in den Oenozyten (C') fand nicht statt. Die Oenozyten in C und C' sind mit weißer gestrichelter Linie umrandet. (D,D') Schematische Zusammenfassung der Lipidakkumulation unter verschiedenen Nahrungsbedingungen. Maßstab repräsentiert in (B,B') 100µm, in (A,A') 50µm, in (C,C') 10µm.

Zusammenfassend kann man sagen, dass der *enok*-Phänotyp von einer einzigen Zellgruppe verursacht wurde. Dies würde bedeuten, dass trotz der weiteren Funktionen, die Enok in der Peripherie einnimmt und steuert, der eigentliche Effekt der Lipidmetabolismus-Kontrolle durch die Expression von Enok in der Cortex Glia bewirkt wird.

3.7.2 Enok in der Cortex Glia reguliert die Dilp2 Sekretion

Kürzlich wurde eine Beteiligung des Fettkörpers, welcher die nahrungsabhängige Homöostase

wahrnimmt, bei der Kontrolle der *Drosophila* Insulin-like protein (Dilp) Sekretion aus den Insulin-like peptide producing cells (IPCs) im Gehirn festgestellt. Dadurch wurde ein physiologische Verbindung zwischen den beiden wichtigsten Geweben geschaffen, die Nährstoffwahrnehmung, Metabolismus und Alterungsprozesse regulieren (Geminard et al., 2009; Bai et al., 2012; Rajan und Perrimon, 2012; Parisi et al., 2013; Bader et al., 2013; Nässel et al., 2013; Kannan und Fridell, 2013). Einfacher gesagt, während der Nahrungsaufnahme registriert der Fettkörper die Nährstoffe, leitet das Signal fernlenkend an das Gehirn weiter und sorgt für die Sekretion von Dilp2. In mehreren Artikeln, die sich mit der Abgabe von Dilp2 in die Hämolymphe und die darauffolgende Regulation der Homöostase beschäftigten, wurden vor allem ZNS Neurone als vermittelnde und regulierende Instanz angegeben (Rajan und Perrimon, 2012; Kwak et al., 2013; Hong et al., 2012). Neben den Neuronen wurden die Glia Zellen als eine wichtige regulatorische Einheit in der Kontrolle der Dilp-Sekretion beschrieben. Auch hier wird durch ein bis jetzt unbekanntes Signal, welches je nach Ernährungszustand vom Fettkörper ausgesandt und von den Glia Zellen verarbeitet wird, die Sekretion der Dilps gesteuert (Chell und Brand, 2010; Sousa-Nunes et al., 2011). In diesem Fall sezernieren die Glia Zellen Dilp6 und aktivieren nahrungsabhängig die Neuroblastenteilung nach der entwicklungsabhängigen Stilllegung. Da *Enok* in beiden Zelltypen exprimiert wird, könnte vermutet werden, dass es signalabhängig die Transkription der benötigten Gene aktiviert, um die Proliferation der Neuroblasten zu starten. Diese Hypothese wird auch dadurch unterstützt, dass in Abwesenheit von *Enok* keine Proliferation stattfindet (Scott et al., 2001). Glia kann auch auf eine andere Weise das Insulin-abhängige Wachstum regulieren, nämlich indem es Faktoren wie *ImpL2* und *secreted decoy of InR* (SDR) in die Hämolymphe abgibt und diese die Dilps abfangen und in ihre Funktion hemmen (Okamoto et al., 2013).

Da in *enok* Überexpressionstieren die Nahrungsaufnahme und der Lipidmetabolismus nicht stattfinden und die Expression von *Enok* in den Glia Zellen festgestellt wurde, erschien es interessant sich im nächsten Schritt die Dilp2 Sekretion anzuschauen. Die Tiere wurden wie bei den Verhaltensversuchen bis zum zweiten Larvalstadium (50h nE) auf proteinreicher Nahrung aufgezogen, danach für 14 Stunden entweder wieder auf proteinreiches Futter, oder auf PBS zum Hungern gesetzt. Danach wurden die Gehirne präpariert und auf Dilp2 Gehalt in den IPCs mittels Immunfluoreszenz untersucht. Diese Analyse zeigte, dass bei den Kontrolltieren der Kreuzung *enok>eYFP* nach der Hungerperiode Dilp2 in den IPCs akkumuliert (Abb. 3.24A,E und Abb.7.31A,E,F) und bei einer proteinreichen Nahrung sehr stark ($p < 0,001$) sezerniert wurde (Abb. 3.24C,E, Abb. 7.31C,E,F). Diese Regulation der Sekretion blieb bei den Tieren der Kreuzung *enok>Enok;eYFP* aus. Dilp2 akkumulierte in den IPCs bei beiden Nahrungsbedingungen (Abb. 3.24B,D,E, Abb. 7.31B,D,E,F) und die Fluoreszenzintensität blieb sehr ähnlich ($p = 0,2773$). Das würde bedeuten, dass durch die fehlende Sekretion aus den IPCs der Insulinsignalweg in der Peripherie nicht aktiv wäre. Um diesen Schluss zu untersuchen, wurde RNA aus Larven isoliert, die alles bis auf das ZNS

enthielten, so dass nur das periphere Signal untersucht wurde. Die mRNA Level von *4ebp* als negativer Marker für den Insulinsignalweg spiegeln die Dilp2 Sekretion wieder. Schon auf proteinreicher Nahrung war *4ebp* in den *enok* Überexpressionstieren in Vergleich zur Kontrolle 7,5fach induziert (Abb. 3.24F, Abb.7.31G). Die Level in den gehungerten Tieren, sowohl beim Experiment als auch bei der Kontrolle waren ähnlich hoch (14fach) induziert. Es scheint, dass das Gehirn das Fehlen der Nährstoffe registriert und die Sekretion von Dilp2 zurückhält, jedoch scheint dieses Signal innerhalb des ZNS nicht richtig verarbeitet zu werden, da die Tiere die Nahrungsaufnahme nicht wieder aufnehmen.

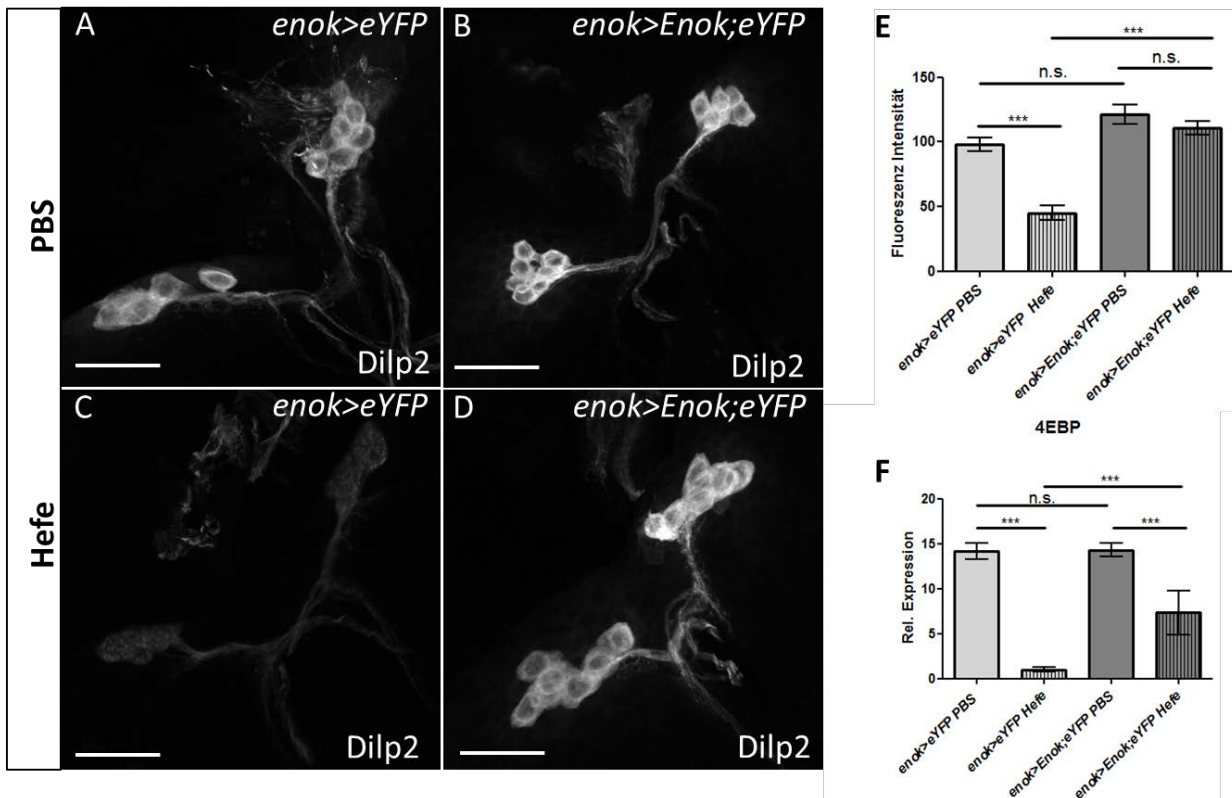


Abbildung 3.24: Dilp2 Sekretion wird durch *enok*-Überexpression verhindert.

Die Dilp2 Akkumulation oder Sekretion in und aus den neurosekretorischen Zellen -den Insulin-like peptide producing cells (IPCs)- wird nahrungsabhängig reguliert. Nach der jeweiligen Ernährungs-Behandlung werden die Gehirne entnommen und *Drosophila* Insulin-like peptide 2 (Dilp2) wird mittels einer Immunfluoreszenz-Färbung und Mikroskopie detektiert. Die Lasereinstellungen werden an die Akkumulation, welche während des Hungerns stattfindet, angepasst und nicht mehr verändert. (A,C) Dilp2 Signal in den IPCs der Kontrolle *enok>eYFP*. (A) Akkumulation von Dilp2 nach 14h Nahrungsentzug. (C) Auf proteinreicher Nahrung wird Dilp2 sezerniert. Die IPCs sind deshalb kaum sichtbar. (B,D) *enok*-Überexpression unter der Kontrolle des *enok*-Promotors verhindert die Sekretion von Dilp2 auf proteinreicher Nahrung (D). Bei Nahrungsentzug ist die Akkumulation leicht erhöht, jedoch nicht signifikant (B). (E) Quantifizierte Fluoreszenz Intensität für Dilp2 der Genotypen in A-D unter verschiedenen Nahrungsbedingungen. (F) Insulinsignalweg-Zielgen und Wachstumsarrestmarker *4ebp* reagiert auf die Dilp2-Sekretion in der Peripherie. Während der Akkumulation von Dilp2 auf PBS wird die Transkription von *4ebp* induziert. Bei proteinreicher Nahrung wird die Transkription gehemmt. In *enok*-Überexpressionstieren findet diese Anpassung nicht statt. (E), *** $p < 0,001$; Fehlerbalken repräsentieren standard error of the mean (SEM). (F) $n=3$ von jeder Bedingung, *** $p < 0,001$; Fehlerbalken repräsentieren standard error of the mean (SEM). Maßstab repräsentiert in (A-D) 20 μm . *4ebp*, eukaryotischer Initiationsfaktor 4E-Bindeprotein. Primärer Antikörper: (A-D) guinea pig α -Dilp2.

Um ausschließen zu können, dass die Peripherie, insbesondere die Oenozysten, diesen Effekt verursachen, wurde dasselbe Experiment mit der Kreuzung *Oenozysten>Enok,eYFP* und der

entsprechenden Kontrolle *Oenozysten>eYFP* durchgeführt. Die Larven beider Kreuzungen zeigten bei proteinreicher Nahrung eine Sekretion von Dilp2 in die Hämolymphe (Abb. 3.25B,D,E, Abb. 7.32B,D,E,F). Bei Mangelernährung akkumulierte Dilp2 in den IPCs beider Kreuzungen mit fast derselben Fluoreszenzintensität (Abb. 3.25A,C,E, Abb. 7.32A,C,E,F). Die Tiere zeigten etwas geringere Werte, jedoch war es nicht signifikant ($n=10$; $p=0,2264$). Zusammenfassend legte dieses Experiment dar, dass die Abwesenheit von Enok in der Peripherie nicht für die fehlende Sekretion von Dilp2 auf proteinreicher Nahrung verantwortlich ist.

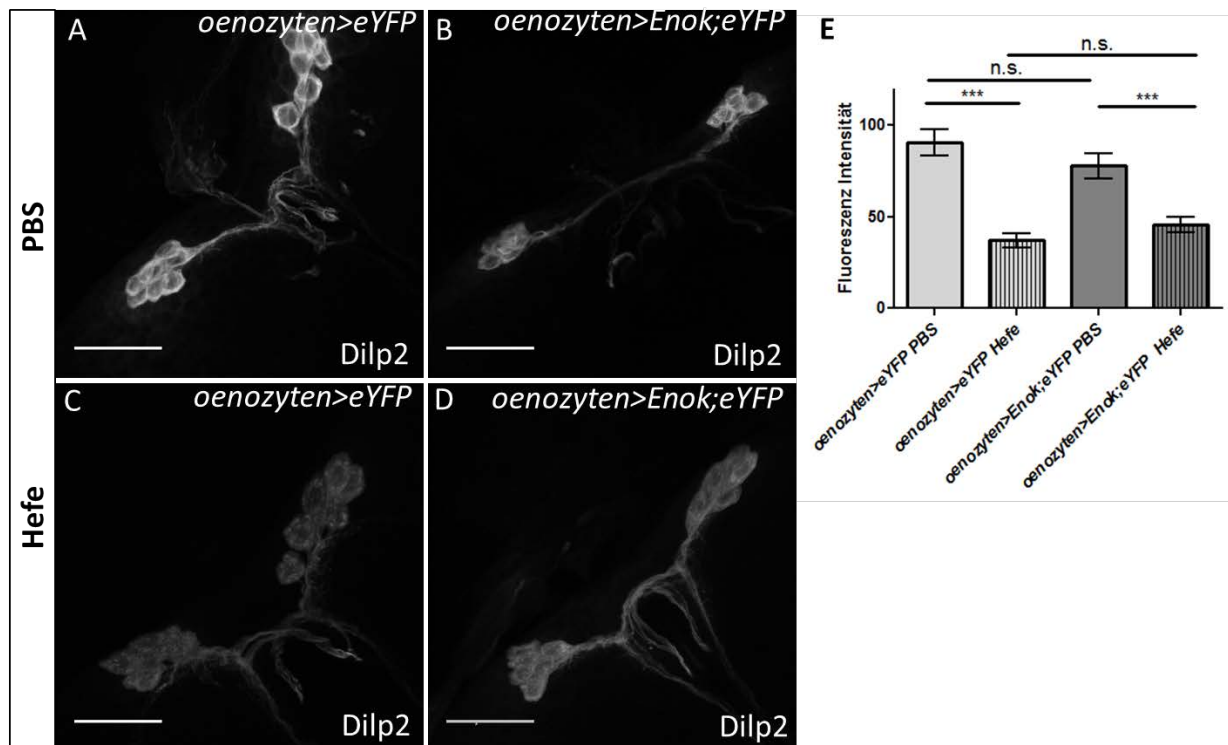


Abbildung 3.25: *enok*-Überexpression in den Oenozysten ist nicht für die Dilp2 Retention in den IPCs auf proteinreicher Nahrung verantwortlich.

(A,C) Dilp2 Signal in den IPCs der Kontrolle *oenozysten>eYFP*. (A) Akkumulation von Dilp2 nach 14h Nahrungsentzug. (C) Auf proteinreicher Nahrung wird Dilp2 sezerniert. Die IPCs sind deshalb kaum sichtbar. (B,D) Dilp2 Signal in den IPCs der Kreuzung *oenozysten> Enok;eYFP* unterscheidet sich nicht von der Kontrolle. Sowohl bei Hungerbedingung (B), als auch auf proteinreicher Nahrung (D), reagieren diese Larven wildtypisch. (E) Quantifizierte Fluoreszenz Intensität für Dilp2 der Genotypen in A-D unter verschiedenen Nahrungsbedingungen, $***p < 0,001$; Fehlerbalken repräsentieren standard error of the mean (SEM). Maßstab repräsentiert in (A-D) 20 μ m. Primärer Antikörper: (A-D) guinea pig α -Dilp2.

Zur Bestätigung dieser Theorie wurde ebenfalls die Kreuzung *cortex glia>Enok,eYFP* untersucht. Die Larven wiesen dieselben Tendenzen auf wie die Larven der Kreuzung *enok>Enok,eYFP*. Die Sekretion von Dilp2 auf proteinreicher Nahrung fand nicht statt, die Tiere akkumulierten Dilp2 in den IPCs (Abb. 3.26B,D,E, Abb. 7.33B,D,E,F). Auch hier fehlte die Regulation der Homöostase durch die Anpassung des Verhaltens an die wahrgenommene Nährstoffsituation des Körpers. Die Tiere nahmen die Nahrungsaufnahme nicht wieder auf. Und wie schon durch die Oil Red O Experimente gezeigt, griffen sie auch nicht ihre TAG-Reserven an um daraus Energie in Form von ATP zu gewinnen (Abb.23 A',B',C',D').

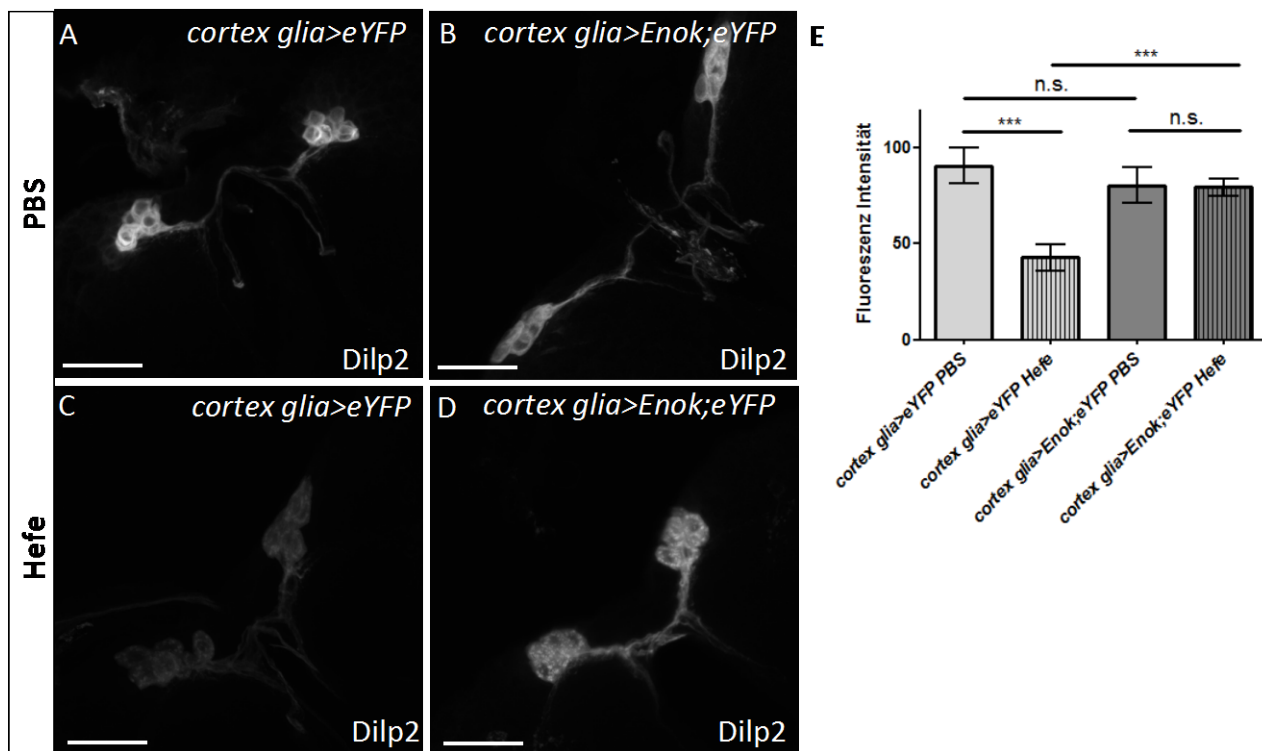


Abbildung 3.26: Die Überexpression von *enok* in der Cortex Glia ist für die Dilp2 Retention in den IPCs auf proteinreicher Nahrung verantwortlich.

Wird *enok* in der Cortex Glia exprimiert, wird der Phänotyp kopiert, welcher auch unter der Kontrolle des *enok*-Promotors beobachtet wurde. (A-D) Die Immunfluoreszenz-Färbung des Dilp2 Signals zeigt, dass Enok in der Cortex Glia für die Ausschüttung von Dilp2 auf proteinreicher Nahrung verantwortlich ist. (A,C) Dilp2 Signal in den IPCs unter der Kontrolle *cortex glia>eYFP*. (A) Akkumulation von Dilp2 nach 14h Nahrungsentzug. (C) Auf proteinreicher Nahrung wird Dilp2 sezerniert. Die IPCs sind deshalb kaum sichtbar. (B) Bei der Überexpression in der Cortex Glia wird Dilp2 in den IPCs bei Nahrungsentzug akkumuliert. (D) Auf proteinreicher Nahrung wird die Sekretion von Dilp2 verhindert. (E) Quantifizierte Fluoreszenz Intensität für Dilp2 der Genotypen in A-D unter verschiedenen Nahrungsbedingungen. *** $p < 0,001$; Fehlerbalken repräsentiert standard error of the mean (SEM). Maßstab repräsentiert in (A-D) 20 μ m. Primärer Antikörper: (A-D) guinea pig α -Dilp2.

3.7.3 Transkriptionelle Analyse der Kreuzung *cortex glia>Enok;eYFP*

Wie bereits im Kapitel 3.7.1 beschrieben, hat die Fehlexpression von *enok* einen dramatischen Einfluss auf die Regulation des Lipidmetabolismus. Es konnte gezeigt werden, dass die Cortex Glia für den Effekt verantwortlich war. Denn sowohl die fehlende Hungerantwort, welche mit Oil Red O Färbung gezeigt werden konnte, als auch die fehlende Sekretion von Dilp2 stimmte komplett mit dem Phänotyp überein, welcher durch die *enok-Gal4* kontrollierte Überexpression von *enok* hervorgerufen wurde.

Eine quantitative Analyse der Expressionsprofile der Gene, die an der Lipolyse und der β -Oxidation beteiligt waren, wurde in der Abbildung 3.27A,B und Abb. 7.34 A,B dargestellt. Die drei Lipasen *bmm*, *Lip3* und *Lip4* waren in ihrer Expression reprimiert. Ebenfalls konnte dieselbe Tendenz bei den Genen der β -Oxidation beobachtet werden. Zu den reprimierten Genen gehörten die *Carnitin-Acyltransferase (whd)*, welche die freien Fettsäuren für den Transport ins Mitochondrium vorbereitet, und die vier Schlüsselenzyme der β -Oxidation: 1)

die Acyl-CoA-Dehydrogenasen *egm*, 2) Enoyl-CoA-Hydrogenase *Mtpα*, 3) Hydroxyacyl-CoA-Dehydrogenase *Mtpα* und 4) Ketoacyl-CoA-Thiolase *Thiolase* (Abb. 3.27B, Abb. 7.34B). Diese Gene, welche unter Hungerbedingungen induziert sein sollten, waren in den Larven der Kreuzung *cortex glia>Enok;eYFP* in ihren Transkriptleveln sogar reduziert. Dieselbe Regulation wurde auch bei den Genen der Fettsäuresynthese beobachtet (Abb. 3.27C, Abb. 7.34C).

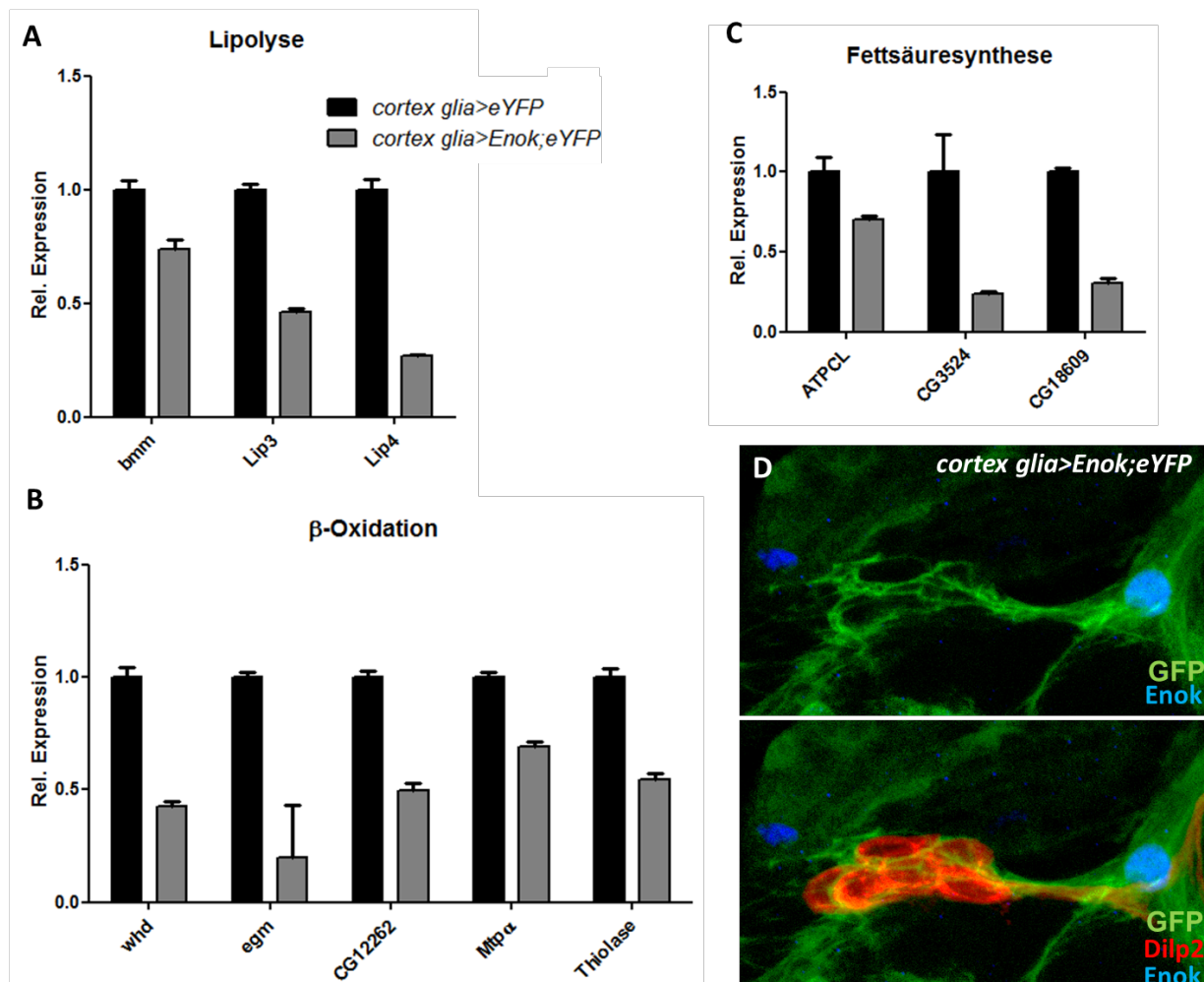


Abbildung 3.27: Systemische Kontrolle des Lipidmetabolismus in der Peripherie durch Enok in der Cortex Glia.

Systemische Regulation der Peripherie verursacht durch die Überexpression von *enok* in der Cortex Glia. Die Regulation geht zentral vom Gehirn aus. (A-C) Das Expressionsprofil der Lipidmetabolismuskene wurde zwischen der Kontrolle *cortex glia>eYFP* und der Überexpressionskreuzung *cortex glia>Enok;eYFP* verglichen. Die untersuchten metabolischen Prozesse waren: (A) Lipolyse, (B) β-Oxidation und (C) Fettsäuresynthese. Die transkriptionelle Analyse zeigte eine Beeinträchtigung der Lipidmetabolismuskene. (D) Immunfluoreszenz-Färbung der IPCs. Cortex Glia Zellen (GFP-positiv, grün) ummanteln die IPCs (Dilp2-positiv, rot) und beeinflussen möglicherweise somit direkt die Ausschüttung von Dilp2. Enok Signal (blau) markiert den Zellkern der Cortex Glia Zelle markiert. Fehlerbalken repräsentieren standard error of the mean (SEM). Primäre Antikörper: (D) chicken α-GFP, guinea pig α-Dilp2, rat α-Enok. *ATPCL*, *ATP-Citrat Lyase*; *bmm*, *Brummer*; *egm*, *enigma*; *Lip3*, *Lipase3*; *Lip4*, *Lipase4*; *Mtpα*, *Mitochondrial trifunctional protein a subunit*; *whd*, *withered*.

Die mRNA Level von *ATPCL* waren nur leicht reduziert, ebenfalls waren die Fettsäuresynthese *CG3524* und die Elongase *CG18609* stark betroffen. Die transkriptionelle Induktion des *UAS*-

Enok Konstrukt war 22fach erhöht im Vergleich zu der Kontrolle (Abb.7.34D). Zusammenfassend kann man behaupten, dass obwohl *Enok* in diesem Fall nur im ZNS-genauer gesagt nur in Cortex Glia- überexprimiert wurde, es systemisch die Prozesse des Lipidmetabolismus im gesamten larvalen Körper steuern kann.

Die mögliche Art der Steuerung könnte ein direkter Einfluss der Cortex Glia auf die IPCs sein, da die Cortex Glia Zellen im direkten Kontakt mit den IPCs stehen und die Dilp2 produzierenden Zellen ummanteln (Abb. 3.27D, Abb. 7.34E). Diese räumliche Nähe lässt einen unmittelbaren Effekt durch bis jetzt unbekannte Botenstoffe vermuten. Da bereits bekannt ist, dass die Cortex Glia die Proliferation der Neuroblasten (Chell und Brand, 2010; Sousa-Nunes et al., 2011) und damit das Wachstum der kompletten Gehirnmasse steuert, könnte auch hier eine bestimmte Funktion der Cortex Glia darin bestehen, systemisch die Homöostase des Gehirns zu messen und daraufhin das Verhalten des Tieres anzupassen. Wenn *Enok* also nicht funktionsfähig ist, kann die Verarbeitung des Signals nicht stattfinden und der Organismus nicht adäquat reagieren.

3.8 *Enok* reguliert Lipidmetabolismus entwicklungsunabhängig und auf zellulärer Ebene.

Wie in den vorherigen Kapiteln beschrieben, hat die Dysregulation von *Enok* einen Effekt auf die Transkription der Lipidmetabolismogene. Zusätzlich wurde gezeigt, dass diese Regulation systemischer Art ist und von den Cortex Glia Zellen ausgeht, die in der Lage ist den Metabolismus im ganzen Körper zu kontrollieren. Jedoch wurde bis jetzt nicht untersucht, ob dieser Effekt entwicklungsabhängig ist oder nicht, wie es sich zum Beispiel im Fall der Lipoproteine herausstellte. Durch diesen Versuchsaufbau würde der Einfluss von Sekundäreffekten, die vielleicht mit der Entwicklung zusammenhängen, so gut es geht ausgeschlossen.

Um die Entwicklungsunabhängigkeit zu untersuchen, wurde das *Gal80ts* System angewandt. Die Tiere wurden nach 96 Stunden nE auf 18°C und proteinreichem Futter, auf 29°C für 3 Stunden umgesetzt. Nach dieser Aktivierung von *UAS-Enok* wurden die Tiere getrennt und auf verschiedene Futterbedingungen für weitere 12Std. auf 29°C gesetzt. Der Phänotyp dieser Tiere ähnelte dem Phänotyp der Tiere, in denen *enok* durch die gesamte Entwicklung überexprimiert wurde. Die Larven stellten die Nahrungsaufnahme ein und verließen vorzeitig die Nahrungsquelle. Zusätzlich wurde ein geringer Wachstumsdefekt festgestellt. Wurden die Tiere weiterhin auf 29°C gehalten, starben sie entweder in der Puppe oder schafften es gar nicht erst bis zur Verpuppung, sondern blieben für weitere sechs Tage im dritten Larvalstadium. Der transkriptionelle Phänotyp wurde ebenfalls untersucht. Die Gene der Lipolyse waren in den Tieren der Kreuzung *enok>Enok; Gal80ts* nach 15Std. der *Enok*-Protein-Akkumulation transkriptionell reduziert im Vergleich zu der Kontrolle, die auf PBS gehungert wurden (Abb. 3.28A, Abb. 7.35). Die Level der β -Oxidationsgene waren ebenfalls reduziert (Abb. 3.28B, Abb. 7.36).

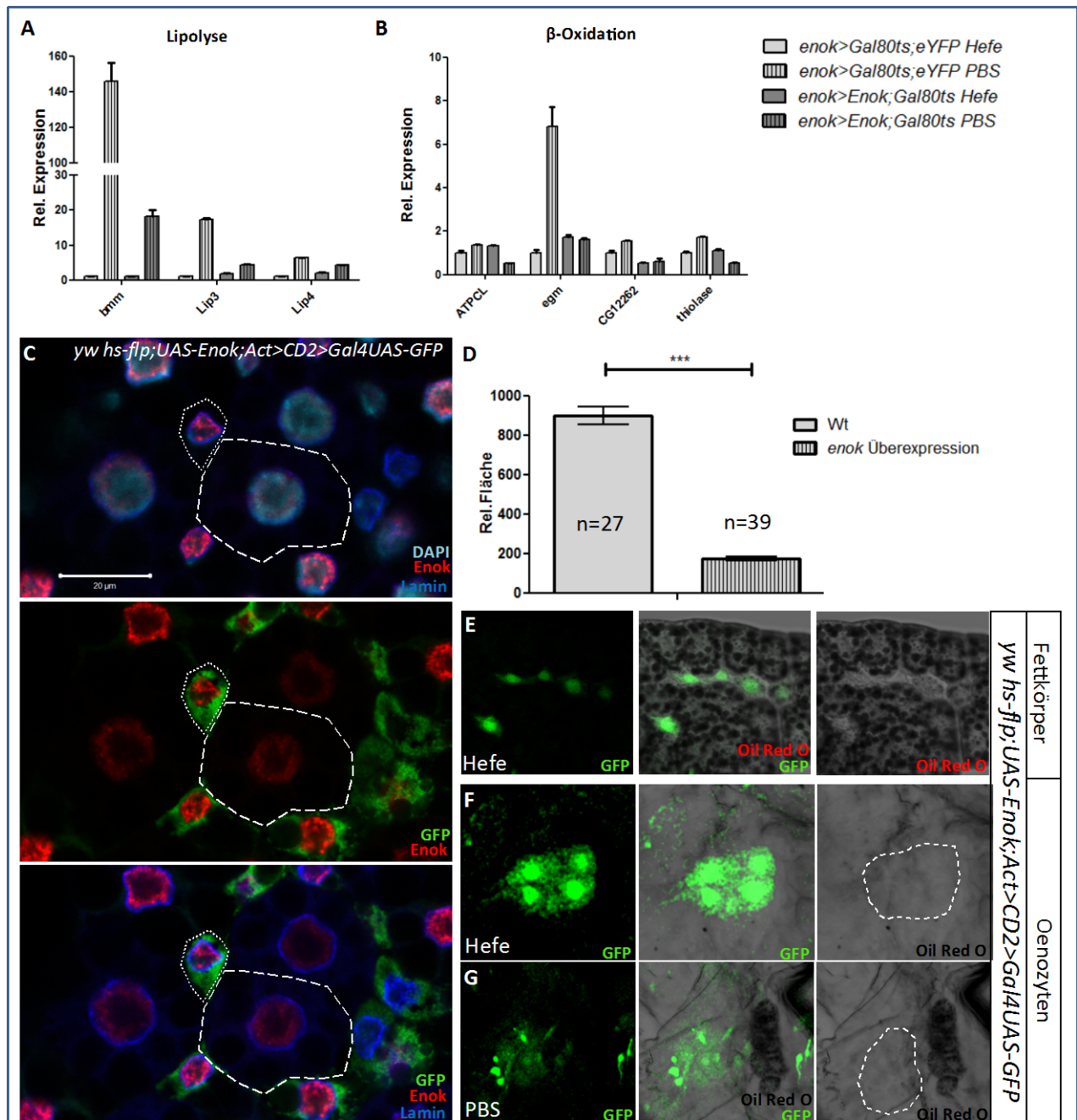


Abbildung 3.28: Entwicklungsunabhängiger und zellautonomer Effekt von Enok auf den Lipidmetabolismus und Wachstum.

Gal80ts-abhängige Expressionsanalysen ermöglichen es Effekte, die durch die Entwicklung verursacht werden, auszuschließen. Ebenfalls kann dadurch die „echte“ Funktion bestätigt werden. (A-B) Gal80ts-abhängige transkriptionelle Analysen der Lipolyse (A) und der β -Oxidation (B). Die Überexpression wurde nach 96h auf 18° C mit der Temperaturänderung auf 29°C für 15h aktiviert. Die Aktivität wurde zusätzlich unter verschiedenen Nahrungsbedingungen (Hefe und PBS) untersucht. Die Beeinträchtigung der Lipidmetabolismogene ist entwicklungsunabhängig. (C-G) Klonale Analysen ermöglichen es im selben Tier und im selbe Gewebe nebeneinander Klone zu erzeugen, welche einen unterschiedlichen genetischen Hintergrund haben. Die Flip-Out Linie *yw hs-flp;; Act>CD2>Gal4 UAS-GFP* wurde mit *UAS-Enok* gekreuzt. Die Nachkommen wurden ab dem Schlüpfen aus dem Ei auf 25°C gehalten. GFP-Signal (grün) positive Klone weisen ebenfalls eine *enok*-Überexpression auf. GFP-negative Zellen sind wildtypisch. (C) Wachstumsdefekt wird zellautonom durch Enok kontrolliert. *enok*-Überexpressionszellen (gepunktete Umrandung, grün) sind viel kleiner, als die wildtypische Zelle (gestrichelte Umrandung). Die Überexpressionszellen enthalten zudem sehr wenig Zytoplasma. (D) Quantitative Auswertung des Experiments (C).

Die relative Fläche zeigt einen signifikanten Größenunterschied zwischen *Wt* und *enok*-Überexpressionszellen. Die wildtypische Zelle ist im Schnitt fast fünf Mal so groß. (E-G) Oil Red O Färbungen zeigen den Lipidgehalt der Zellen im Fettkörper (E) oder in den Oenozyten von Tieren, die entweder auf proteinreicher Nahrung (F, Hefe) oder bei Nahrungsentzug (G, PBS) gehalten wurden. (E) Im Fettkörper enthalten die GFP-positiven Zellen keine Lipidtröpfchen. Auch durch das Forcieren der Lipidakkumulation in den Oenozyten durch Nahrungsentzug (G) konnten keine Lipidtröpfchen in den GFP-positiven Zellen (gestrichelt Umrandung) beobachtet werden. Die benachbarten wildtypischen Oenozyten waren in der Lage Lipide zu akkumulieren. In (B) $n=27$ bei *Wt* und $n=39$ bei der Überexpression. Fehlerbalken repräsentieren standard error of the mean (SEM). Maßstab repräsentiert in (C) $20\mu\text{m}$. Primäre Antikörper: (C) chicken α -GFP, mouse α -Lamin, rat α -Enok. *ATPCL*, *ATP-Citrat Lyase*; *bmm*, *Brummer*; *egm*, *enigma*; *Lip3*, *Lipase3*; *Lip4*, *Lipase4*; *Wt*, *Wildtyp*.

Die bis jetzt beschriebenen Analysen wurden im Kontext eines funktionierenden Lebewesens unternommen, bei dem gleichzeitig die Fehlfunktion von Enok ein komplettes Gewebe betraf. Wie jedoch Enok auf zellulärer Ebene die Morphologie und Physiologie beeinträchtigt, wurde bis jetzt nicht analysiert. Für die klonalen Analysen wurde die Linie *y w hs-flp;; Act>CD2>Gal4 UAS-GFP* (Bülow et al., 2010) mit UAS-Enok gekreuzt, um Klone mit verschiedenen genetischen Eigenschaften innerhalb eines Gewebes, in diesem Fall im Fettkörper, zu produzieren und diese vergleichen zu können. Der auffälligste morphologische Unterschied zwischen den Klonen, die *enok* überexprimierten und denen die normale Level von Enok aufwiesen, war die Größe der Zellen (Abb. 3.28C,D, Abb.7.37A,B). Die wildtypischen Zellen waren fünf Mal so groß wie die Enok Klone, die an der GFP Färbung zu erkennen waren. Dieser Größenunterschied war stark signifikant ($p<0,0001$). Ebenfalls wurde ein physiologischer Unterschied festgestellt. Die Zellen im Fettkörper, die positiv für GFP waren, enthielten keinerlei Lipidtröpfchen (Abb. 3.30E, Abb. 7.37C,D). Ebenfalls auf klonaler Ebene konnte gezeigt werden, dass die Zellen, die *enok* im Fettkörper überexprimieren, keine Fettreserven aufnehmen und speichern konnten. In den Oenozyten wurden Klone sowohl auf proteinreicher Nahrung, als auf PBS erzeugt, und auf Fettgehalt untersucht (Abb. 3.28F,G). Wie bereits in anderen Geweben, wie Fettkörper (Abb. 3.18A,A') und Oenozyten (Abb. 3.16F,F) bereits gezeigt, wurden auch auf zellulärer Ebene keine Lipidtröpfchen detektiert. Bei den klonalen Analysen in den Oenozyten war jeweils nur ein Kompartiment betroffen und man sah, dass sogar bei Mangelernährung in dem betroffenen Kompartiment keine Lipide akkumulierten und in dem benachbarten wildtypischen Kompartiment die normal Akkumulation der TAGs stattfand (Abb. 3.28F,G). Dies wurde auch bei der Überexpression unter der Kontrolle des *enok*-Promotors beobachtet (Abb. 3.16D-F'). Auch das Erzwingen des Transports der Lipide in den Fettkörper durch proteinreiche Nahrungsquelle, konnte keine Akkumulation in GFP-positiven Zellen nachgewiesen werden (Abb.7.37C). Auch dies wurde auf Organismusebene gezeigt, als *enok* unter der Kontrolle des CG-Promotors überexprimiert wurde (Abb. 3.18A,A''). Zusammenfassend kann man sagen, dass auch auf zellulärer Ebene Enok die Größe, das Wachstum und den Lipidmetabolismus steuert.

3.9. Enoks Einfluss auf nahrungsabhängige Signalwege im Gehirn

Die Wahrnehmung des Nährstoffzustandes ist lebenswichtig, da diese daraufhin eine Reaktion des Organismus steuert. Immer öfter wird berichtet, dass dieser Vorgang der Wahrnehmung direkt im zentralen Nervensystem stattfindet und von dort aus zentral den Metabolismus reguliert (Rajan und Perrimon, 2012; Bjordal et al, 2014; Brankatschk et al., 2014). Deshalb ist die eigentliche Homöostase des Gehirns entscheidend für die Ausführung dieser Funktion. Denn nur ein vollfunktionsfähiges Gehirn ist in der Lage den Nährstoffzustand zu analysieren und die anschließenden Entscheidungen adäquat treffen zu können.

3.9.1 Enok reguliert den Lipidmetabolismus und den Lipidtransport im Gehirn

Da wie es scheint Enok eine wichtige Aufgabe in der Peripherie hat, war es interessant zu sehen, ob auch im Gehirn Lipide und ihre Homöostase eine Rolle spielen. Mittels einer Oil Red O Färbung konnte nachgewiesen werden, dass im Gehirn tatsächlich Lipide akkumuliert werden (Abb. 3.29A). Ob diese Lipide über die Lipoproteine transportiert oder im Gehirn selbst aufgebaut werden, kann bis jetzt nur vermutet werden. Der Ort der Speicherung konnte jedoch als die Cortex Glia identifiziert werden (Abb.29B). Dass diese Lipidspeicherung in der Glia wichtig ist, wurde von Liu und Kollegen 2015 gezeigt. Sie haben nachgewiesen, dass zum Beispiel im adulten Gehirn die Glia-Lipidtröpfchen mit neuronaler Degeneration in Verbindung stehen (Liu et al., 2015). Deshalb wurde zunächst analysiert, ob die Überexpression von *enok* im ZNS direkt einen Effekt auf den Lipidmetabolismus hat. Dafür wurden aus Larven der Kontrolle (*enok>eYFP*) und der *enok*-Überexpression (*enok>Enok;eYFP*) jeweils 25 Gehirne präpariert und mRNA daraus gewonnen. Diese wurde daraufhin in cDNA umgewandelt. In der qPCR wurden Gene der β -Oxidation, der Fettsäuresynthese und des Lipid Transports angeschaut.

Beide Prozesse des Lipidmetabolismus waren wie auch in der Peripherie negativ reguliert (Abb. 3.29C,D, Abb. 7.38A,B). Dies lässt vermuten, dass wie schon im gesamten Körper die Regulation dieser Prozesse direkt oder indirekt der Kontrolle Enoks unterliegt. Da die Lipidspeicherung in der Cortex Glia im Gehirn stattfindet, wurde ebenfalls in einem vorläufigen Experiment die transkriptionelle Aktivität der β -Oxidations- und der Fettsäuresynthesegene angeschaut, wenn Enok unter der Kontrolle des *cortex glia*-Promotors überexprimiert wird. In diesem Fall wurde *enok* sehr spezifisch nur in der Cortex Glia exprimiert. Auch hier wurden pro Probe jeweils 25 Gehirne der Kontrolle *cortex glia>eYFP* und der Überexpression *cortex glia>Enok;eYFP* untersucht. Dieses vorläufige Experiment zeigt ebenfalls eine Tendenz zur negativen Regulation des Lipidmetabolismus durch *enok*-Missexpression (Abb. 7.39A,B, Abb.7.40A,B).

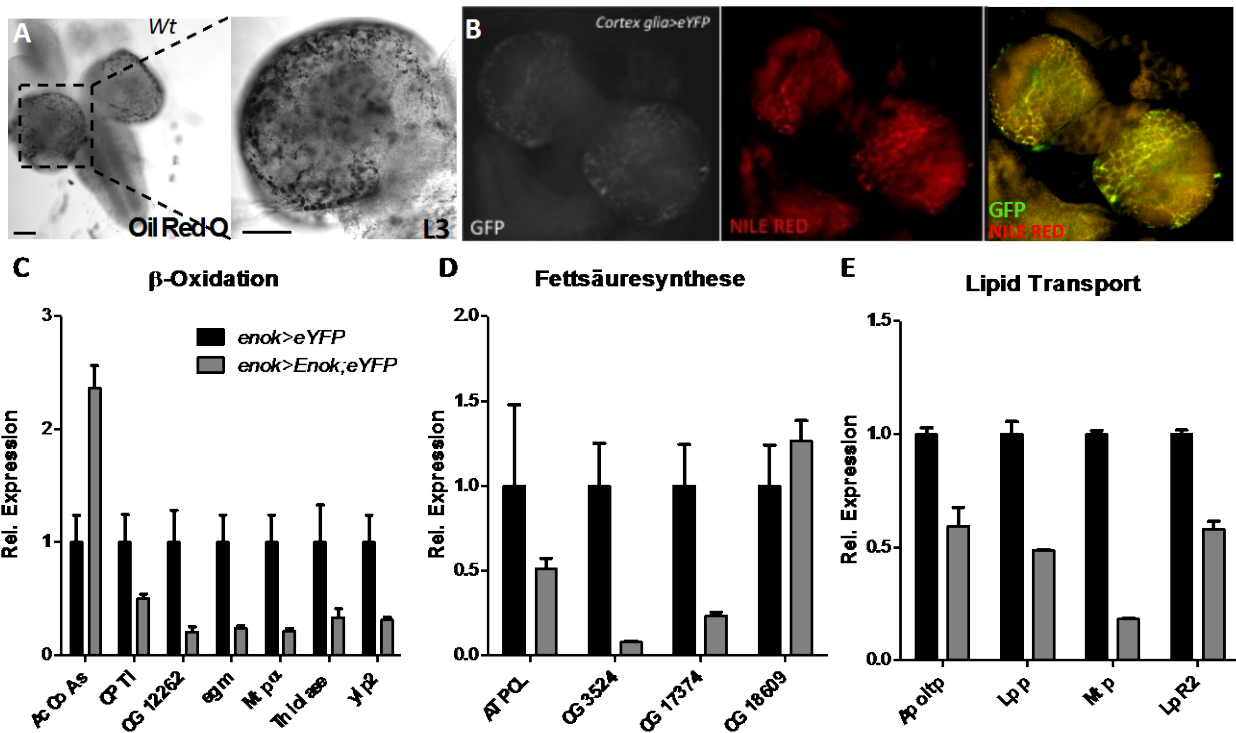


Abbildung 3.29: Enok reguliert Lipidmetabolismus im zentralen Nervensystem.

(A) Wildtypisches Gehirn des dritten Larvalstadiums. Oil Red O Färbung zeigt eine Akkumulation der Lipide. Die Position der Detailaufnahme ist durch den schwarzumrandeten gestrichelten Kasten gezeigt. (B) Die Akkumulation der Lipide im Gehirn des Genotyps *Cortex glia>eYFP*. Die Cortex glia ist durch GFP (weiß,grün) markiert und die Neutrallipide wurden mit NILE RED (rot) sichtbar gemacht. Gh, Gehirnhemisphäre. (C,D) Das Expressionsprofil der Lipidmetabolismusgene. Hier wurde die Expression in Gehirnen verglichen. *enok*-Überexpressionstiere wurden mit Kontrolltieren verglichen. Gene der β -Oxidation waren signifikant reduziert (C). Im Gehirn waren die Gene der Fettsäuresynthese ebenfalls negativ beeinflusst in der Transkription (D). Regulation der Gene des Lipid Transports sind ebenfalls reguliert (E). Fehlerbalken repräsentieren standard error of the mean (SEM). Die Signifikanz wurde mit dem unpaired 2-tailed Student's t-test bestimmt. Maßstab repräsentiert in (C) 50 μ m. *AcCoAs*, Acetyl-CoA Synthetase; *Apoltp*, Lipid Transfer Protein; *ATPCL*, ATP-Citrat Lyase; *CPT1*, Acyl-Carnitin/Carnitin-Antiporter; *egm*, *enigma* Lip3, *Lipase3*; *Lip4*, *Lipase4*; *Lpp*, Lipophorin; *LpR2*, LDL receptor 2; *Mtp*, Microsomal Triglyceride Transfer Protein; *Mtp α* , Mitochondrial trifunctional protein a subunit; *yip2*, *yippee interacting protein 2*.

Zusätzlich wurde in beiden Experimentansätzen die Regulation der Lipid Transportgene wie *Apoltp*, *LPP* und *Mtp* angeschaut. In beiden Experimentreihen waren die Lipoproteine transkriptionell reduziert (Abb.3.29E, Abb. 7.39C). Allerdings ist bis jetzt noch nicht bekannt, welche Funktion diese Proteine übernehmen, wenn sie im zentralen Nervensystem selbst translatiert werden. Jedoch ist bereits beschrieben, welche wichtigen Rollen diese Proteine in zentralen Nervensystem übernehmen, wenn sie aus der Peripherie kommen und die Blut-Hirn-Schranke überwunden haben. In 2010 wurde von Brankatschk und Eaton gezeigt, dass LPP für die Reaktivierung der Neuroblastenproliferation zuständig ist. In einer kürzlich erschienenen Publikation in 2014 von der selben Gruppe wurde beschrieben wie, LTP zentral an den insulinproduzierenden Zellen den systemischen Insulinsignalweg steuert. Da beide Gene in der Peripherie durch die Missexpression von *enok* negativ beeinflusst werden, könnten die in Abb. 3.15A,B, Abb. 3.24 gezeigten Ergebnisse auf die jeweilige Reduktion von LPP und *Apoltp* im gesamten Organismus zurückzuführen sein. In diesem Zusammenhang wäre der Transport der Lipoproteine durch die Blut-Hirn-Schranke ein wichtiger Faktor. *LpR2*

ist einer der zwei redundanten Rezeptoren im Gehirn, die den Transport der LTP durch die Blut-Hirn-Schranke übernehmen (Brankatschk et al., 2015). Wie das Diagramm in Abb.3.29E zeigt, ist die Transkription des Rezeptors reduziert. Es könnte vermutet werden, dass durch diese Reduktion ebenfalls der Insulinsignalweg systemisch reguliert werden könnte, wie durch einen knock-down von LpR2 gezeigt wurde (Brankatschk et al., 2015).

Dass Enok auch im zentralen Nervensystem den Lipidmetabolismus reguliert, ist nicht überraschend, da diese Regulation, sowohl auf der Ebene des gesamten Organismus als auch auf zellulärer Ebene gezeigt werden konnte. Die Funktion und der Einfluss der Lipid-Transportgene auf und in dem zentralen Nervensystem bieten eine neue und interessante Möglichkeit der Regulation, die von Enok abzuhängen scheint.

Der nächste Schritt war es zu untersuchen, welche Prozesse im Gehirn der *enok* Überexpressionslarven möglicherweise beeinflusst wurden, wodurch das Verhalten der Tiere so dramatisch von der Kontrolle und der natürlichen Antwort abweicht.

3.9.2 Enoks Einfluss auf nahrungsabhängige Signalwege im Gehirn

Während der Entwicklung der Larve kommt es manchmal zur Nahrungsknappheit. Die Reaktion auf diesen Umstand ist der Wachstumsstopp der meisten Gewebe. Einige der Gewebe, wie zum Beispiel das Gehirn, wachsen trotz dessen weiter. Die Anaplastic Lymphoma Kinase (Alk) ist als eine Kinase beschrieben, die es dem *Drosophila* Larvengehirn ermöglicht den Insulinsignalweg und die Nahrungsrestriktion zu umgehen und weiter zu wachsen (Teleman, 2011; Cheng et al., 2011). Um die Transkriptionslevel dieses Gens und anderer Gene zu untersuchen, die in die Kontrolle des Gehirnwachstums und damit in die Verhaltenskontrolle involviert sind, wurde die RNA Extraktion von sauber präparierten Gehirnen ohne die Ringdrüse durchgeführt. In Perioden des Hungers wurde die Transkription von *Alk* im Gehirn 4,4fach induziert (Abb. 3.30A, Abb. 7.41A). Im Fall der *enok* Überexpression wurde das Gen im Gehirn sowohl bei proteinreicher Nahrung, als auch auf PBS 4,6fach induziert. Diese Induktion würde dafür sorgen, dass die Neuroblasten sich weiterhin teilen und das Gehirn wachsen sollte. Trotz der entsprechenden Regulation des Transkripts von *Alk* wurde in den *enok* Überexpressionstieren eine verminderte Zellteilung der Neuroblasten beobachtet (Abb. 3.15A,B). Der Grund für die fehlende Zellteilung könnte durch die Regulation zwei anderer Gene erklärt werden, die möglicherweise zusammen den Effekt von Alk überschreiben.

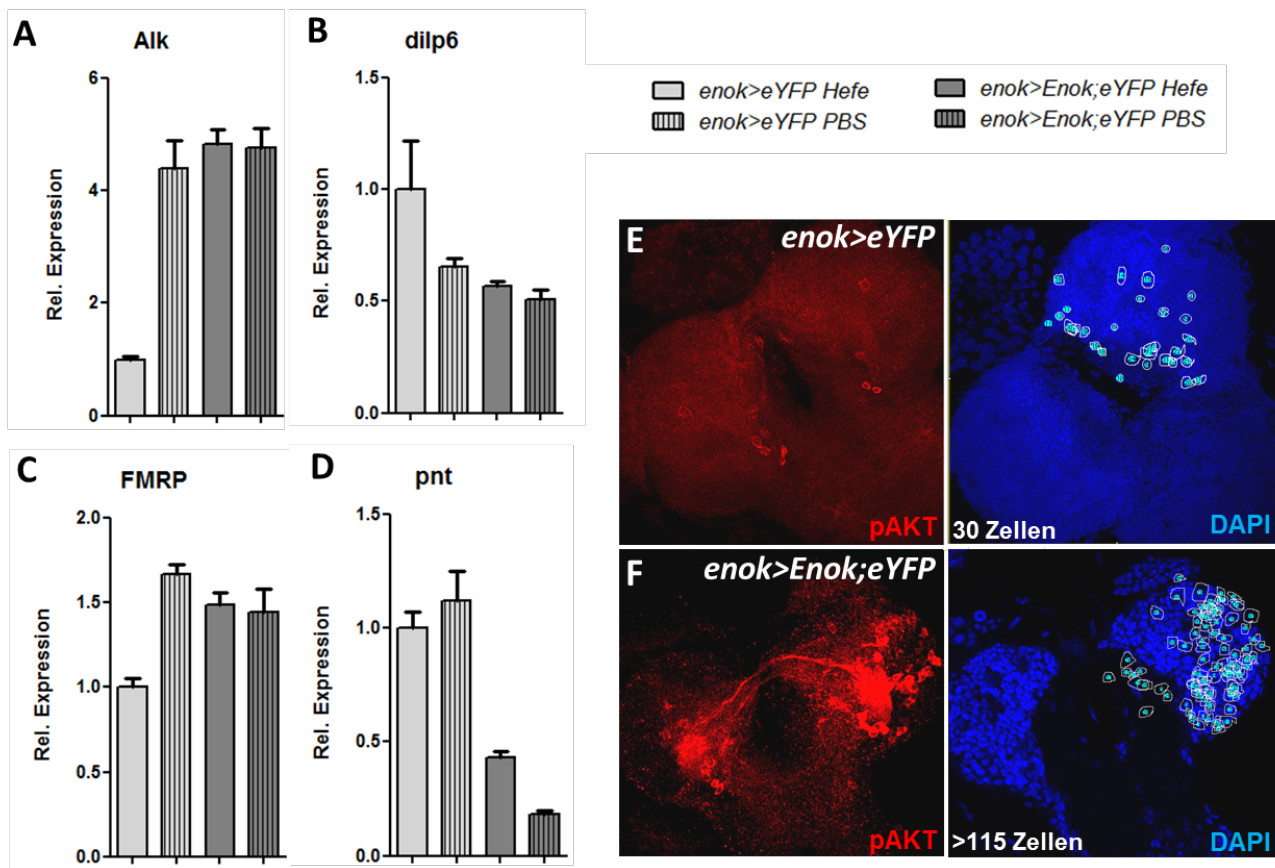


Abbildung 3.30: Enok beeinflusst nahrungsabhängige Signalwege im Gehirn.

(A-D) Transkriptionelle Analyse von Genen, die in nahrungsabhängige Signalwege wie Insulin/PI3K/AKT- oder MAPK-Signalweg involviert sind. Die Balkendiagramme zeigen gehirnspezifische Expression dieser Gene. Für diesen Versuch wurden ausschließlich nur Gehirne der L2 Larven präpariert. Das Expressionsprofil wurde unter verschiedenen Nahrungsbedingungen untersucht. Hier wurde die Expression in Gehirnen unter Hungerbedingungen (PBS) oder auf proteinreicher Nahrung (Hefe) verglichen. Einzelheiten zu den jeweiligen Signalwegen sind im Text beschrieben. (E-F) Immunfluoreszenz-Färbung von pAKT in Gehirnen zeigt eine Hyperphosphorylierung von AKT. Im Vergleich zur Kontrolle (E) sind im Gehirn bei Überexpression (F) fast viermal so viele Zellen pAKT-positiv (rot). Die pAKT-positiven Zellen wurden in das rechte Bild eingezeichnet. Trotz der fehlenden Insulin-Ausschüttung, ist der Insulinsignalweg im Gehirn hyperaktiviert. Fehlerbalken repräsentieren standard error of the mean (SEM). *Aik*, Anaplastic Lymphoma Kinase; *dilp6*, *Drosophila Insulin-like Peptide 6*; *FMRP*; *Fragile X Mental Retardation 1 Protein*; *pnt*, *pointed*.

Das Expressionsprofil von *dilp6* im Gehirn zeigte, dass *dilp6* unter proteinreicher Nahrung induziert und unter Hungerbedingungen reduziert wurde (Abb. 3.30B). Bei der Überexpression von *enok* unter beiden Nahrungsbedingungen blieben die Level von *dilp6* reduziert, was erklären würde, warum die Larven niemals die nötige Proteinmenge von Dilp6 in Glia Zellen erreicht haben, um die Stilllegung der Neuroblastenteilung wieder aufzuheben. Dadurch würde der Startpunkt der Teilung nie erreicht werden. Ein weiteres Gen, das Fragile X Mental Retardation 1 und sein Protein FMRP, wird erst in Neuroblasten selbst und dann in Glia Zellen benötigt, um die Neuroblastenteilung zu reaktivieren (Callan et al., 2012). Die Expression des Transkripts wurde bei Nahrungsknappheit induziert. Die selbe Induktion wurde auch bei den Überexpressionstieren beobachtet (Abb. 3.30C, Abb. 7.41C), was ebenfalls eine adäquate Reaktion des Gehirns ist. FMRP selbst kontrolliert die Modifikation des phosphorylierten AKT (pAKT) im sich entwickelnden Gehirn. Es inhibiert die Neuroblasten-Reaktivierung und den Insulinsignalweg, indem es die Level von pAKT reguliert. Bei der

Analyse der pAKT Level im Gehirn von enok Überexpressionstieren zeigte sich, dass die Anzahl der Zellen, die positiv für pAKT waren, fast vier Mal so hoch war, wie bei der Kontrolle (Abb. 3.30E,F). Die Zellen, in welchen AKT hyperphosphoryliert wurde, gehörten weder den Neuroblasten, noch den Glia Zellen, sondern den Neuronen an. Die meisten der betroffenen Neurone lagen im Protocerebrum. Die pAKT positiven Zellen gehörten unter anderem zur Gruppe der Kenyon Zellen, der Projektionsneurone, die zu den Pilzkörpern projizieren und möglicherweise der neurosekretorischen Zellen. Die Hyperaktivität des pAKT-Signalweges würde bedeuten, dass Neurone, die für die Verarbeitung von olfaktorischen Reizen, Lernen und Gedächtnis verantwortlich sind, sich trotz der mangelnden Ernährung in einem guten homöostatischen Zustand befinden würden. Diese Fehlinterpretation der Homöostase würde zu einem Verhalten führen, welches von Enok Missexpressionstieren gezeigt wurde, nämlich dem Verlassen der Futterquelle und dem Nichtangreifen der Fettreserven während Hungerperioden. Diese verstärkte Überaktivität von AKT könnte mit der Hyperaktivität des MAPK Signalwegs zusammenhängen, welche bereits in Menschen und Mäusen durch die Zerstörung des jeweiligen Enok-Homologs hervorgerufen wurde. Dort wurden ebenfalls erhöhte Werte der pAKT Mengen festgestellt (Kraft et al., 2011). Die Beeinträchtigung des MAPK Signalwegs würde ebenfalls zu Problemen bei Zellproliferation, Differenzierung und Apoptose führen. Einer der wichtigen Transkriptionsfaktoren des MAPK Signalweges in *Drosophila* ist *pointed* (*pnt*). Das Protein ist unter anderem in Glia Zellen stark exprimiert (Scholz et al., 1993) und ist für die Neuron-Glia Zellinteraktion während der Entwicklung entscheidend (Klämbt, 1993). Wie das Expressionsprofil dieses Gens in Abbildung 3.30D zeigt, wurde durch die Überexpression von *enok* die Transkriptmenge von *pointed* beeinträchtigt. Unabhängig von der Nahrungsbedingung war *pointed* in diesen Tieren reprimiert, was ein eindeutiges Zeichen für die Missregulation des MAPK Signalwegs ist. Weitere Gene des MAPK Signalwegs waren ebenfalls reprimiert (Abb. 7.42). Damit könnten die Gene dieses Signalwegs ebenfalls vielversprechende direkte transkriptionelle Zielgene sein. Weitere Gene müssten zur Bekräftigung dieser Hypothese analysiert werden oder eine Chromatin-Immunpräzipitation (CHIP) durchgeführt werden.

4. Diskussion

Die Regulation von Wachstum, Nahrungsaufnahme und metabolischen Prozessen spielt eine wichtige Rolle in der Entwicklung eines jeden Organismus. In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass Enoki Mushroom eine wichtige Aufgabe in diesen Prozessen übernimmt. Seine enzymatische Funktion und seine Sequenzhomologie zu der KAT6B-Familie charakterisiert das Protein als einen epigenetischen Modulator und eine putative Histon-Acetyltransferase. Die Expression des Proteins im larvalen Gewebe zeigte, dass das Protein neben seiner sehr wichtigen Funktion in der Gehirnentwicklung auch eine mögliche Funktion in metabolisch wichtigen und aktiven Geweben wie Fettkörper, Oenozysten oder Glia Zellen übernimmt. Die ausführliche transkriptionelle Expressionsanalyse bestätigte die Rolle von Enok in der Regulation des Wachstums und des Lipidmetabolismus sowohl in der Null-Mutante, als auch in den Überexpressionstieren. Die gewebespezifische Analyse ergab, dass Enok sehr spezielle Aufgaben in verschiedenen Geweben übernimmt und die Transkription der Gene steuert, die den Lipidtransport, den Lipidabbau und die Lipidsynthese betreffen. Enok kontrolliert das Wachstum nicht nur zellautonom, sondern auch systemisch, da es im zentralen Nervensystem neben dem Lipidstoffwechsel auch die Ausschüttung von Dilps reguliert und damit das Wachstum des gesamten Organismus. Eine derart spezifische Funktion einer Histon-Acetyltransferase im Lipidmetabolismus und in der Wachstumskontrolle unterstreicht die Bedeutung von Enok als eine mögliche epigenetische Schnittstelle zwischen diesen beiden Prozessen. In den folgenden Kapiteln wird die Rolle von Enok unter Berücksichtigung der beschriebenen Analysen diskutiert und die aufgestellten Hypothesen erläutert. Damit soll die Bedeutung von *Drosophila* als Modellorganismus hervorgehoben werden. Denn durch die Fliege und ihre Anwendungsvielfalt konnte im Fall von Enok ein neuer Aspekt der KAT6B-Funktion gezeigt werden. Diese Studie könnte damit möglicherweise als Hilfe zur Aufklärung von KAT6B-assoziierten Krankheiten dienen.

4.1 Spaltung, Acetylierung, und Komplexbildung von Enok

Die posttranslationalen Modifikationen eines Proteins sind oft notwendige Veränderungen, die dafür sorgen, dass ein Protein seine Funktion korrekt, gewebe- und zeitspezifisch erfüllen kann. Diese Modifikationen können in den Zellen konstitutiv ablaufen, als Antwort auf bestimmte Umwelteinflüsse, oder auf interne Abläufe hin aktiviert werden. Zu diesen Modifikationen gehören neben Peptidabspaltungen, auch Acetylierungen und Komplexbildungen. Im Fall von Enok scheinen diese Modifikationsvarianten alle vorhanden zu sein. Dass eine Spaltung von Enok stattfindet, wurde bereits von I. Zinke (2003) vermutet. Die damalige Hypothese, welche anhand der durchgeführten Experimente aufgestellt wurde, konnte durch bioinformatische Analysen (Schmitz, 2011) und durch diese Arbeit nicht bestätigt werden. Ein neuer Ort der möglichen Spaltung konnte eingegrenzt werden. Durch

einen N-Terminus spezifischen, polyklonalen Antikörper (von I. Zinke und S. Opp hergestellt und durch N.Moderau aufgereinigt und verifiziert), durch die Herstellung des getaggtten Enok Konstrukts und die Untersuchung im endogenen Gewebe stellte sich heraus, dass C-terminal zwischen dem Epitop des polyklonalen Antikörpers und dem C-Terminus keine Spaltung stattfindet (Abb. 3.3). Die Spaltung spielt sich N-terminal ab. Die bioinformatischen Analysen zeigten, dass eine Schnittstelle für Trombin an der Aminosäure 167 von Enok vorhergesagt ist (http://web.expasy.org/cgi-bin/peptide_cutter/peptidecutter.pl). Das *Drosophila* Homolog von Trombin ist unter der Genbezeichnung CG7829 bekannt. Dieses Gen ist ebenfalls wie Enok sehr stark im zentralen Nervensystem exprimiert. Die Expression beider Proteine im selben Zelltyp, würde die Hypothese der Spaltung an der Aminosäure 167 bestärken. Zusätzlich wurde durch die Experimente mit dem getaggtten Enok Konstrukt eine Spaltung am N-Terminus bestätigt (Abb. 3.3). Interessanterweise wird durch diese Spaltung in Enok kein Transport aus dem Kern ins Zytoplasma verursacht, wie es lange Zeit vermutet wurde. Dabei würde Enok nach der Spaltung seine Funktion als Acetyltransferase im Zytoplasma weiterhin ausüben können (Yang, 2004). Jedoch gab es keinerlei Hinweise auf eine zytoplasmatische Lokalisation von Enok (Abb. 3.4), obwohl sowohl Kernlokalisations- als auch Kernexportsequenzen identifiziert wurden (Schmitz, 2011). Diese Signalsequenzen scheinen eher eine Rolle bei der Zellteilung zu spielen, durch welche Enok immer wieder nach der Teilung der Zellen in den Kern transportiert wird. Die Analyse der Lokalisation des getaggtten Konstrukts zeigte jedoch, dass nach der Teilung der pluripotenten Neuroblastenzelle, die sowohl das N-, als auch das C-terminale Signal aufwies, die Ganglion-Mutterzellen und die daraus entstehenden Neurone nur noch das N-terminale Signal im Kern zeigten. Da in diesen Zellgruppen Enok weder mit dem α -Enok Antikörper, noch mit dem Antikörper, welcher gegen den C-terminale Tag gerichtet wurde, detektiert werden konnte, sprechen diese Ergebnisse für eine Degradation dieser gesamten Region (Abb. 4.1A). In diesem Fall würde die Funktion der Acetyltransferase nicht mehr vorhanden sein, doch die Histonbindung würde weiterhin existieren, da die H15-Linkerdomäne und der PHD-Zink-Finger noch funktionsfähig wären. Dadurch würde das abgespaltene Stück eine andere Aufgabe in den Tochterzellen übernehmen. Man könnte in diesem Fall spekulieren, dass dieser Bereich von Enok für die Bindung an das Histon sorgt und ein anderer epigenetischer Komplex gebildet wird. Durch diese Spaltung würde sich der Organismus nicht nur die Transkription und Translation eines neuen Proteins einsparen, sondern auch eine mögliche Signalkaskade. Durch die bereits vorhandene und notwendige Teilung der Neuroblasten zur Gehirnentwicklung könnte der Organismus durch die Spaltung den Funktionsbereich von Enok in der neuen Zellgruppe parallel steuern. Zur Bestätigung dieser Hypothese müssten weitere Experimente mit den getaggtten Konstrukten durchgeführt werden. Weiterhin könnten Deletions- oder Substitutionsmutationskonstrukte generiert werden, um die genaue Spaltungsstelle analysieren zu können. Auch wäre interessant zu erfahren, ob bei einer Abwesenheit der Spaltung die Tochterzellen (GMZ) den pluripotenten Charakter bewahren würden und eine

Überproliferation stattfinden würde, so dass entartetes Gewebe und möglicherweise Tumore entstehen würde. In diesem Fall würde die Spaltung eine Art Proliferationskontrolle darstellen. Zur Bestätigung der Hypothese müssten zuerst mittels Western Blot Analysen die Spaltprodukte verifiziert werden, um ihre genaue Größe bestimmen zu können.

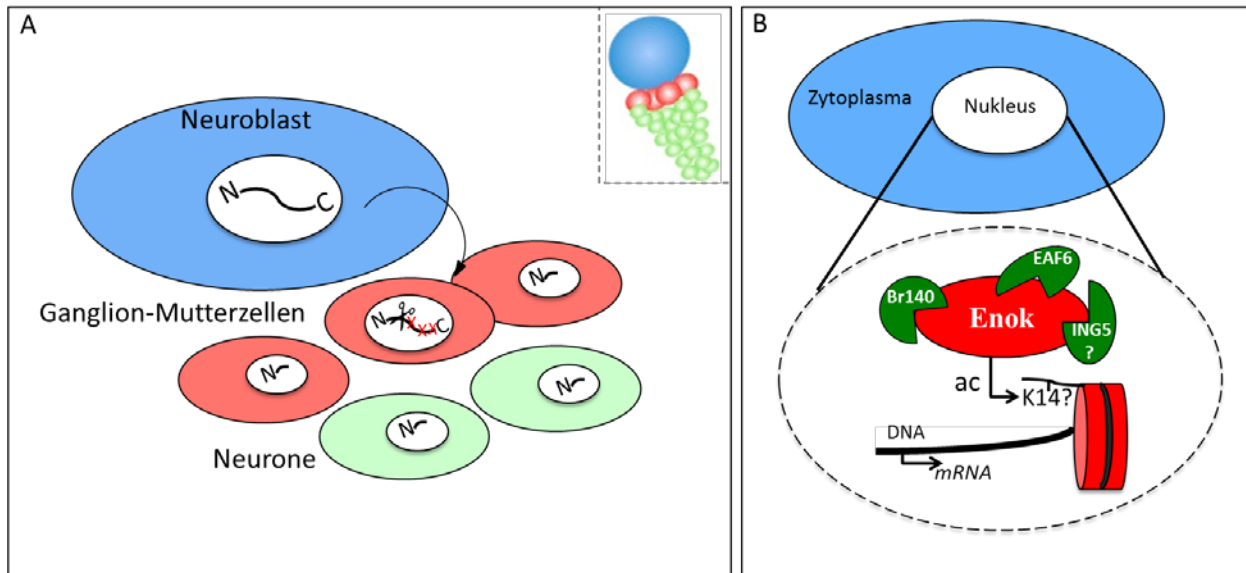


Abbildung 4.1: Posttranslationale Modifikationen von Enok.

(A) Schematische Darstellung der putativen Spaltung von Enok. Die Übersicht in der rechten oberen Ecke zeigt den Zellverband der Neuroblastenteilung. Nach der asymmetrischen Teilung des Neuroblasts (blau) zu Neuroblast und der Ganglion-Mutterzelle (rot) teilt sich die Ganglion-Mutterzelle anschließend nur noch einmal. Bei dieser Teilung entstehen Neurone (grün). Während des ersten Teilungsvorgangs scheint die posttranslationale Spaltung stattzufinden. Die Ganglion-Mutterzellen enthalten nur noch den N-Terminus von Enok, der C-terminale Rest des Proteins wird möglicherweise degradiert. (B) Multiprotein-Komplex von Enok. Der Komplex ist im Kern lokalisiert und sorgt für die Auflockerung des Chromatins nach der spezifischen Acetylierung am K14. Die Subeinheiten des Komplexes und Interaktionspartner von Enok sind in grün dargestellt. Mit Fragezeichen markiert, sind die bisher unbekanntesten Bestandteile des Modells. ac, acetyliert; BRPF, bromodomain plant homeodomain (PHD) finger; EAF6, homolog of Esa1-associated factor 6; ING5, inhibitor of growth; K14, Lysin14

Die Acetylierung von Lysinen als reversible posttranslationale Modifikation, welche die positiv-geladenen Aminosäuren neutralisiert, sorgt für eine Veränderung der Proteinfunktion auf verschiedene Art und Weisen (Kouzarides, 2000). Die wichtigste Rolle spielt die Acetylierung bei der Transkriptionsregulation, indem Histon-Acetyltransferasen Acetylreste von Acetyl-CoA auf Lysine an bestimmten Histonschwänzen übertragen werden. Dadurch wird das Chromatin auflockert und damit eine erhöhte transkriptionelle Aktivität gefördert (Choudhary et al., 2009). Neben dieser globalen Funktion der Acetylierung wurden viele individuelle Artikel veröffentlicht, welche Acetylierungsstellen von Proteinen beschreiben, die durch diese Modifikation in viele biologische Prozesse involviert sind und damit die Lysin-Acetylierung als eine umfassende regulatorische Instanz beschrieben. Im Fall von Enok wird ein Protein beschrieben, das möglicherweise sowohl selbst acetyliert wird, als auch eine wichtige Rolle in der Histon-Acetylierung spielt und die Transkription bestimmter Zielgene steuert. Dass Enok einen Einfluss auf das Acetylom ausübt, konnte durch die Überexpression und die damit verbundene Verringerung der globalen Acetylierung gezeigt werden (Abb. 3.7, Abb. 7.6).

Die Hypothese der Selbstacetylierung, die aufgrund der bioinformatischen Analysen aufgestellt wurde, bedarf weiterer biochemischer Untersuchungen. Wenn eine Selbstacetylierung von Enok vorliegen würde, könnte es möglicherweise seine eigene Aktivität regulieren. Dass Enok aber neben der Selbstacetylierung auch eine Funktion als eine putative Histon-Acetyltransferase übernimmt und die Transkription bestimmter Gene unmittelbar steuert, konnte bis jetzt nur indirekt gezeigt werden. Erstens konnte eine Reduktion in der Acetylierung eines möglichen Histons gezeigt werden (Abb. 3.7C), jedoch muss das acetylierte Lysin noch verifiziert werden. Zweitens wird mit großer Wahrscheinlichkeit das Acetylierungsziel von Enok dem humanen und murinen Homolog entsprechen und das Lysin 14 am Histon 3 darstellen (Sapountzi und Côté, 2011). Drittens kann Enok anhand seiner Domänenstruktur (Zinke, 2003) und seiner Homologie zu anderen Spezies (Yang, 2004; Yang und Ullah, 2007) nur zur Familie der HAT gehören, da es einen sehr starken Einfluss auf die Transkriptionsregulation hat (Abb. 3.14B; 3.15D-F) und selbst kein Transkriptionsfaktor ist. Dies lässt vermuten, dass die Kontrolle auf epigenetischer Ebene stattfindet. Der nächste Schritt würde sein, biochemisch mittels Co-Immunpräzipitation oder immunfluoreszent mittels Fluoreszenz-Cofärbungen die genaue Acetylierungsstelle anhand dieser Hypothese zu identifizieren. Dazu könnte der aufgereinigte und verifizierte α -Enok Antikörper benutzt werden. Durch einen Histon-Acetyltransferase Assay könnte nach dem Ort der Acetylierung anschließend die Funktionalität von Enok untersucht werden. In diesem Kontext kann dann nicht nur die endogene Funktion von Enok analysiert werden, sondern auch was im Fall einer Mutation oder Überexpression stattfindet. Die Frage, ob und wie stark die Acetylierunglevel am Histon variieren, könnte ähnlich wie bei Kraft et al., (2011) durch den HAT-Assay durchgeführt und dadurch beantwortet werden.

Damit die Acetylierung durch eine Histon-Acetyltransferase stattfinden kann, ist die HAT selbst auf mehrere Interaktionspartnern angewiesen. Der Aufbau eines Multiproteinkomplexes ist für die einwandfreie Funktion notwendig. Durch diese posttranslationale Modifikation wird die Histon-Acetylierung gesteuert (Champagne et al., 2008; Ali et al., 2012). Durch die Komplexbildung wird das Chromatin aufgelockert und die Transkription aktiviert. Zu den bereits bestätigten Interaktionspartner von Enok gehören die Proteine EAF6 und CG1845/Br140, das BRPF *Drosophila* Homolog (Strübbe et al., 2011). Sie sind ebenfalls Teile des humanen MOZ/MORF Komplexes (Ullah et al., 2008; Ali et al., 2012; Lalonde et al., 2013). Ob das dritte Mitglied des Komplexes ING5 auch ein *Drosophila* Homolog besitzt, muss noch untersucht werden (Abb. 4.1B). Zu diesem Zweck könnte das getaggte Enok-Konstrukt verwendet werden, um Immunpräzipitation und anschließend Massenspektrometrie-Analysen durchzuführen. Dadurch könnten die bereits bekannten Interaktionspartner bestätigt und neue identifiziert werden. Dass die Bildung eines Komplexes mit Enok essentiell für die Transkriptionskontrolle ist, kann man daran erkennen, dass sowohl bei einer Deletion als auch bei einer Überexpression von Enok derselbe Phänotyp entsteht (Abb. 3.14B, 3.15D-F). Aufgrund dieser Ergebnisse wurde die Hypothese der Übersättigung, beziehungsweise der Balance aufgestellt und auf die Richtigkeit untersucht (Abb. 1.2). In *S. cerevisiae* wurde dieses

Phänomen der dosisabhängigen Komplexfunktion bereits beschrieben (Papp et al., 2003; Steinmetz et al., 2002). In diesen Studien wurde gezeigt, dass eine Balance zwischen allen Bestandteilen des Komplexes herrschen muss. Denn sowohl eine Deletion, als auch eine Duplikation des selben Gens führt zum Funktionsverlust (loss-of-function). Sie postulieren, dass die Stöchiometrie der Untereinheiten des Multiprotein-Komplexes erhalten bleiben muss, damit die biologische Funktion erfüllt wird (Schuster-Böckler et al., 2010). Um diese Balance erhalten zu können, wird sogar die Expression der einzelnen Interaktionspartner untereinander sehr stark koordiniert (Jansen et al., 2002). Im Fall von Enok scheint die Hypothese der Balance ebenfalls zuzutreffen, denn durch eine starke Überexpression von Enok wird derselbe Phänotyp hervorgerufen. Wenn also einer der putativen Interaktionspartner tatsächlich eine Untereinheit des Komplexes sein sollte, sollte bei seiner Reduktion durch RNAi oder einer Überexpression dieses Partners ein ähnlicher Phänotyp beobachtet werden. In Zebrafisch konnte bereits gezeigt werden, dass *brpf1*, welches homolog zu dem *Drosophila* Gen *br140* und ein Bestandteil des MOZ/MORF Komplexes ist, einen ähnlichen Phänotyp verursacht (Laue et al., 2008). Es wurde ein Defekt in der Muskuloskelettalen-Organisation und in der neuronalen Entwicklung beobachtet, ähnlich dem, welcher in Maus durch die Mutation in der Histon-Acetyltransferase *querkopf* erzeugt wurde (Thomas et al., 2000).

Zusammenfassend kann die Hypothese aufgestellt werden, dass Enok nach der Translation noch weiteren Modifikationen ausgesetzt ist, die dessen Lokalisation, Aktivität und Funktion regulieren, um möglicherweise eine gewebe-, zeit- oder komplexspezifische Kontrolle der Transkription bestimmter Zielgene zu erreichen (Abb. 4.1B).

4.2 Expressions- und Funktionshomologie von Enok

Durch die ausführliche Studie des Expressionsmusters von Enok, welches sowohl durch Promotorstudien, als auch durch den Einsatz des spezifischen α -Enok Antikörpers verifiziert wurde, konnten einige Fragen beantwortet werden. Während der Embryonalentwicklung und des ersten Larvalstadiums wird das Enok Protein ubiquitär exprimiert. Im zweiten Larvalstadium ändert sich die Expression dramatisch. Enok wird ab diesem Stadium im zentralen Nervensystem und in den Oozyten exprimiert. Die genaue zellspezifische Analyse der Expression im ZNS ergab, dass zu den Enok-exprimierenden Zellen die Neuroblasten und die Glia Zellen gehören. Neben der Funktion scheint auch die Expression der KAT6B Familie durch die Evolution sehr stark konserviert zu sein. Das murine Enok Homolog Querkopf weist in der Embryonalentwicklung ein ähnlich breites Expressionsspektrum auf (Abb. 4.2).

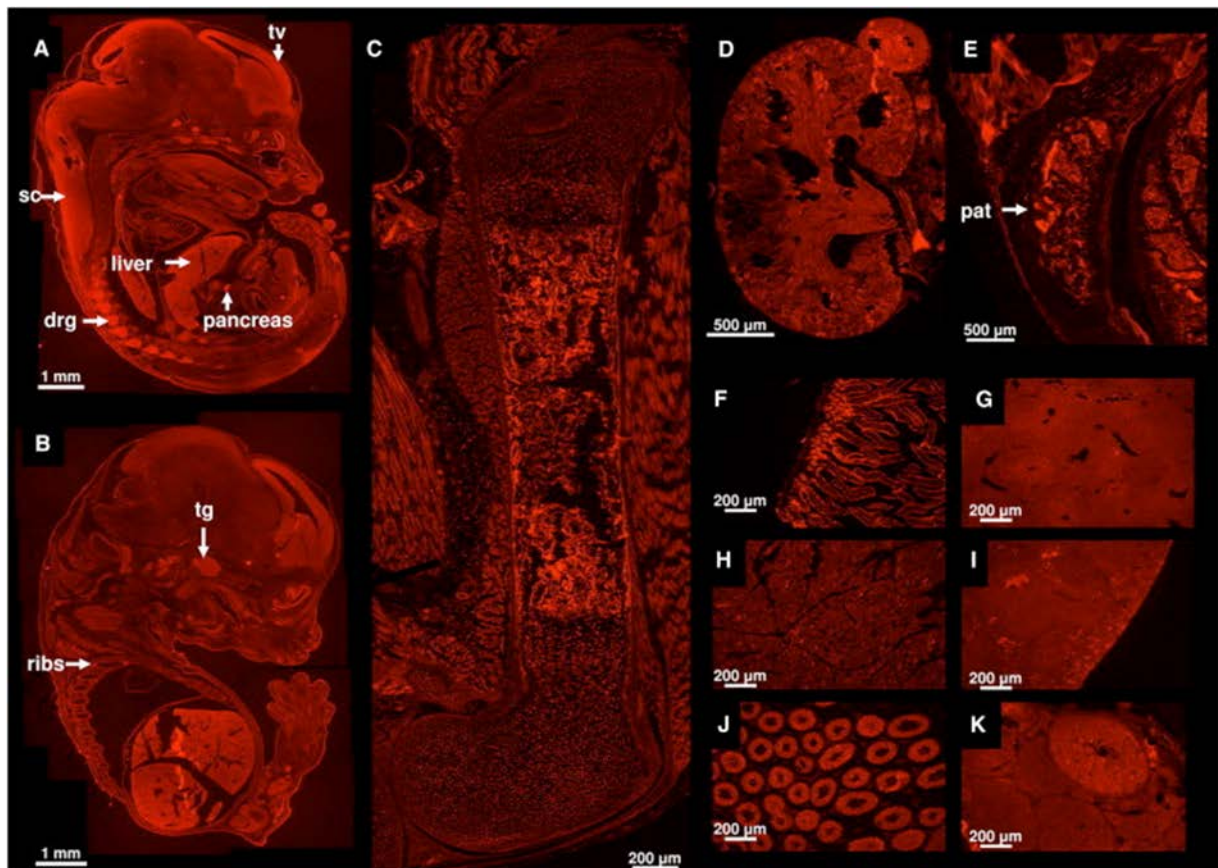


Abbildung 4.2: Querkopf Expression in der Wildtypmaus.

Expressionsanalyse des murinen Homologs von Enok, Querkopf, im Embryonalgewebe. Die gezeigten Gewebe sind (A) und (B) ganzer Embryo (Tag 15,5), (C) Oberschenkelknochen und (D) Niere einen Tag nach der Geburt. Die übrigen Gewebe stammen von acht Wochen alten Tieren: (E) Patella, (F) Duodenum, (G) Leber, (H) Pankreas, (I) Milz, (J) Testes und (K) Ovarien. Die Pfeile deuten auf Telencephalische Vesikel (tv), Rückenmark (spinal cord=sc), Leber (liver), Pankreas (pancreas), Spinalganglion (dorsal root ganglia=drg), Ganglion Gasseri (trigeminal ganglion=tg), Rippen (ribs), und Patella (pat). (übernommen von Campeau et al., 2012).

Neben der bereits beschriebenen Expression im Telencephalon, Rückenmark (Thomas et al., 2000) und im sich entwickelnden Skelett (Kraft et al., 2011) wurde Querkopf in der Niere, im Duodenum, in der Leber, im Pankreas, in der Milz, in den Testis und Ovarien detektiert (Campeau et al., 2012). In der späteren Entwicklung wird Querkopf vor allem in den neuronalen Stammzellen (NSZ) der Subventrikulären Zone (SVZ) detektiert und ist dort für die lebenslange Produktion von Neuronen verantwortlich (Rietze et al., 2001; Merson et al., 2006; Sheikh et al., 2012). Neben dieser starken Übereinstimmung in der Expression der beiden Proteine ist auch der Phänotyp, welcher durch die Dysregulation verursacht wird, ähnlich. Bei Erkrankungen, welche mit einem Defekt in KAT6B assoziiert werden, wie zum Beispiel das Noonan-like Syndrom, Genitopatellar Syndrom, Say-Barber-Blesecker Variante des Ohdo Syndroms oder das Rubinstein Taybi Syndrom, werden Symptome und Anomalien beschrieben, die dem der Enok/Querkopf Mutante ähneln (Campeau et al., 2012).

Tabelle 4.1: Phänotypische Gemeinsamkeiten zwischen Mensch, Maus und Fruchtfliege.

In der Tabelle sind die Phänotypen zusammengefasst. Spalte eins zeigt die Phänotypen, die im Zusammenhang mit KAT6B assoziierten Mutationen beschrieben werden. In der zweiten Spalte ist der Phänotyp der *querkopf* Mutante beschrieben. In der dritten Spalte ist der *enok*-Missexpressionsphänotyp zusammengefasst. {1} Campeau et al., 2012, {2} Thomas et al., 2000

KAT6B assoziierte Erkrankungen {1}	<i>querkopf</i> Mutante {1,2}	<i>enok</i> Misregulation
neuronale Anomalie/ intellektuelle Beeinträchtigung	Beeinträchtigung des Gehirnvolumens/ verminderte Zahl der neuronalen Stammzellen	Defekt der Neuroblastenproliferation
Augendefekte		Beeinträchtigung der Augenentwicklung
Muskuloskelettaler Defekt	Muskuloskelettaler Defekt	
Nahrungsaufnahme Defekt	Nahrungsaufnahme Defekt	Nahrungsaufnahme Defekt
postnataler Wachstumsdefekt	Gedeihstörung/ Wachstumsdefekt	Wachstumsarrest nach der Embryonalentwicklung
Defekte im respiratorischen System		Defekt in der Abdichtung des respiratorischen Systems

In der Tabelle 4.1 wurden die Phänotypen von Mensch, Maus und Fruchtfliege zusammengefasst. Sowohl die starke Überlappung in der Expression, als auch in der Funktionalität bestätigen die Vermutung, dass Enok das *Drosophila* Homolog sowohl zu Querkopf, als auch zu MORF/KAT6B ist. Die Beeinträchtigung der Gehirnentwicklung wurde in allen drei Organismen beobachtet. Immer war die Anzahl der proliferierenden Zellen, der Neuronalen Stammzellen beeinflusst (Abb. 3.14A,B). Dass Enok, wie auch Querkopf selbst in diesen Zellen exprimiert wird, konnte durch eine Co-Färbung mit Neuroblasten-Markern gezeigt werden (Abb. 3.12D). Ebenso evolutionär erhalten blieb die Expression von Enok in den Glia Zellen. In der Maus wurde Querkopf ebenfalls in den Glia Zellen (Astrozyten) gefunden (Sheikh et al., 2012). Wie jedoch die neuronalen Anomalien bei Abwesenheit von Enok, Querkopf und KAT6B zu Stande kommen, konnte bis jetzt noch nicht beantwortet werden. Hier würde sich *Drosophila* sehr gut als Modellorganismus eignen, um die Funktion von Enok in der Neuroblastenproliferation zu untersuchen und dann auf höhere Modellorganismen zu übertragen. Die Beeinträchtigung der Augenentwicklung, welche im Menschen zu Defekten führt, könnte ebenfalls in der Fliege untersucht werden, da die Missexpression von *enok* einen sehr starken Augenphänotyp verursacht (Zinke, 2003; Moderau, 2009). Es könnte nach Hinweisen in der Funktion von Enok in der Augenentwicklung gesucht und auf den Menschen übertragen werden.

Weitere Symptome, welche durch KAT6B Mutationen verursacht wurden, wie der Nahrungsaufnahme- und Wachstumsdefekt sowie Defekte im respiratorischen System wurden in Maus und in *Drosophila* ebenfalls beobachtet (Abb. 3.13; Abb. 3.21). Durch die Analyse dieser phänotypischen Auswirkungen, welche durch die Dysregulation von Enok verursacht wurden, konnte gezeigt werden, dass Enok eine zentrale Rolle in der Regulation der Wachstums und Entwicklung zu haben scheint. Auch der Defekt im respiratorischen System, welcher durch das Fehlen des funktionierenden Enok-Komplexes entsteht, konnte aufgeklärt werden. In den folgenden Kapiteln wird ausführlich auf die einzelnen Effekte und Funktionen von Enok eingegangen. Zusammenfassend kann man jedoch sagen, dass Enok sich anhand der Expressions- und Funktionshomologie sehr gut als ein Modell für die KAT6B assoziierten Erkrankungen eignet.

4.3 Enok reguliert Lipidmetabolismus auf transkriptioneller Ebene

Die Aufgabe einer Histon-Acetyltransferase besteht darin das Chromatin aufzulockern und damit den Transkriptionsfaktoren zu ermöglichen besser an ihre Zielgene zu gelangen. Dadurch wird die Transkription dieser Gene erhöht (Abb. 1.1). Im Falle der Dysfunktion der Histon-Acetyltransferase bleibt die Transkription gehemmt. Die quantitative Analyse des Transkriptomts mittels der RealTime PCR ergab, dass Enok einen besonders starken Einfluss auf die Transkription der Gene nimmt, die am Lipidmetabolismus beteiligt sind. Die Prozesse der Lipolyse, β -Oxidation und in bestimmten Geweben der Fettsäuresynthese werden durch Enok kontrolliert. Die Abwesenheit von Enok beeinflusst diese Vorgänge negativ. Das heißt, dass sobald durch äußere Umstände die Expression der Lipidmetabolismusgene benötigt wird, die Expression von Enok induziert wird, es zur Auflockerung des Chromatins an diesen Genen kommt und dadurch ihre Transkriptmenge gesteigert wird (Abb. 4.3). Die Expression von Enok selbst wird durch Nahrungssignale gesteuert. Während einer Nährstoffrestriktion oder eines kompletten Nahrungsentzugs wird die Transkription von *enok* induziert (Zinke, 2003). Eine ähnliche Regulation findet auch in murinen Fibroblasten statt. Hier wurden die mRNA-Level von *Myst4/Querkopf* nach einer Insulin-Stimulation und einer Nachahmung von Hyperglykämie untersucht. Die Studie zeigte, dass bei niedrigem Glukosespiegel die Expression von *Myst4/Querkopf* anstieg und bei Hyperglukämie stark reduziert wurde (Gupta et al., 2012). Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass sowohl in Invertebraten, als auch in Vertebraten die Expression von KAT6B Familienmitgliedern durch nahrungsabhängige Signale gesteuert wird. Weitere Untersuchungen, zum Beispiel in humanen Zelllinien, sollten diese Hypothese bekräftigen. Im Fall von Enok können die gezeigten Ergebnisse folgendermaßen interpretiert werden: sobald ein Nährstoffmangel detektiert wird und das darauffolgende Signal in die Zielzelle gelangt, wird eine bis jetzt unbekannte Signalkaskade aktiviert, welche daraufhin die Acetylierung durch Enok initialisiert. Es könnte vermutet werden, dass diese Initialisierung durch nukleäre Rezeptoren (Palanker et al., 2006), welche als Transkriptionsfaktoren fungieren

und auf Nahrungssignale reagieren, statt findet. Einer dieser Rezeptoren, hepatocyte nuclear factor 4 (HNF4), wurde bereits mit der Kontrolle von Wachstum und insbesondere der β -Oxidation in Verbindung gebracht (Palanker et al., 2009). Ein weiterer membrangebundener Transkriptionsfaktor, sterol regulatory element binding protein (SREBP in *Drosophila* auch bekannt als HLH106), könnte ebenfalls die Rolle der Signaltransduktion übernehmen (Theopold et al., 1996), da er die Lipidhomöostase, insbesondere die Fettsäuresynthese steuert (Seegmiller et al., 2002; Rawson, 2003; Jeon und Osborne, 2012). Die nähere Untersuchung einer möglichen Interaktion dieser Transkriptionsfaktoren mit Enok wäre hier von Interesse. Auch könnte einer dieser Transkriptionsfaktoren die Transkription von Enok direkt initialisieren. Um dies zu untersuchen, könnten der Promotorbereich von Enok in einen Luciferase-Reporter Vektor kloniert und mit den Transkriptionsfaktoren in Zellen co-transfiziert werden. Die Luciferase-Aktivität würde der Transkriptionsfaktoraffinität zum Enok-Promoter entsprechen.

Nach der nährstoffabhängigen Induktion der Enok Expression und seiner Komplexbildung findet die Histon-Acetylierung statt. Die Acetylierung der spezifischen Lysinreste der Histone durch Enok würde anschließend die Transkription der Zielgene unter Nahrungsmangel induzieren. Im Fall von Enok wären es Gene der Lipolyse und der β -Oxidation, die dafür sorgen, dass Energie in Form von ATP und energiereiche Verbindungen wie Acetyl-CoA dem Organismus zum Überleben zur Verfügung stehen. Dadurch würde Enok unter anderem die Herstellung seines eigenes Substrats, des Acetyl-CoA, steuern (Abb. 4.3). Hier könnte man weiterführend vermuten, dass sobald genügend freies Acetyl-CoA in der Zelle konzentriert ist, dies automatisch zu einer Hemmung der Histon-Acetyltransferase-Aktivität führt. Eine mögliche Erklärung für die Inaktivierung könnte die Selbstacetylierung von Enok sein, durch welche eine mögliche Konformationsänderung und damit ein Funktionsverlust ausgelöst werden. Diese Art der Selbstkontrolle müsste durch weitere biochemische Untersuchungen bestätigt werden. Zuerst müsste der genaue Ort der Acetylierung festgestellt werden und anschließend die Histon-Acetyltransferase-Aktivität unter verschiedenen Acetylierungsmodifikation mittels HAT-Assays gemessen werden.

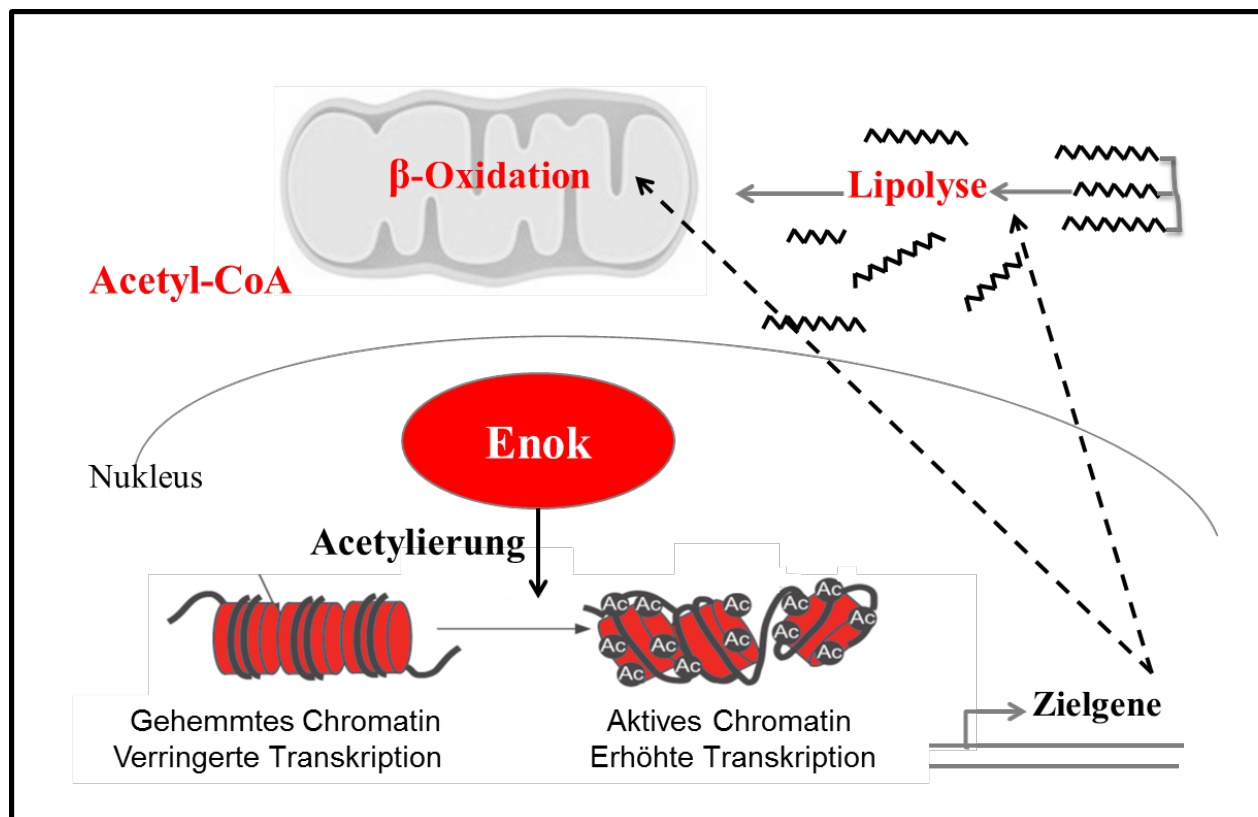


Abbildung 4.3: Modell der transkriptionellen Regulation der Enok Zielgene.

Enok kontrolliert die Transkription der Lipidmetabolismusgene möglicherweise direkt über die epigenetische Modifikation am Histonschwanz. Eine genauere Beschreibung ist im Text enthalten.

Ob die Regulation der putativen Zielgene durch Enok direkt oder indirekt durch eine mögliche Regulationskaskade stattfindet, muss noch untersucht werden. Dazu muss eine Chromatin-Immunpräzipitation (CHIP) durchgeführt werden, um die genauen Bindungsstellen des Enok-Multiprotein Komplexes zu identifizieren. Auf diese Weise kann die Frage beantwortet werden, ob die durch die qPCR identifizierten Zielgene unmittelbar durch die epigenetische Einwirkung von Enok reguliert werden. Als ein wichtiges Werkzeug in diesem Experiment wird in Zukunft der α -Enok Antikörper dienen. Die ersten Vorversuche haben bereits gezeigt, dass der Antikörper die Epitope des Enok Proteins im nativen und im denaturierten Zustand erkennt. Dies erhöht den Erfolg der CHIP, da die spezifische Immunpräzipitation der entscheidende Schritt in diesem biochemischen Verfahren ist. Er entscheidet auch über die Qualität der Ergebnisse. Ebenfalls bereits erfolgreich wurde die Isolation der Kerne mit einer sehr hohen Reinheit aus einem sehr geringen Gewebepolumen von etwa 1000 L1 Larven durchgeführt. Dies ermöglicht es die *enok* Mutante, welche das erste Larvalstadium nicht überschreitet, als geeignete Negativkontrolle zu benutzen und sowohl mit dem Wildtyp als auch mit den Überexpressionstieren zu vergleichen. Weiterhin wäre es möglich mit diesem geringen Einsatz von Gewebe gewebespezifische Untersuchungen zu machen, um mögliche Unterschiede in der Transkriptionskontrolle zu identifizieren. Als Alternative zu der CHIP könnte eine neue Technik der Expressionsanalyse angewandt werden, welche nicht nur ein Organ- sondern sogar ein

Zelltyp-spezifisches Profil der chromatinbindenden Proteine ermöglicht, ohne jegliche Isolation von Zellen, Fixierung oder Affinitätsaufreinigung. Mit der TaDa-Technik (Targeted DamID (DNA adenine methyltransferase identification)) wurde eine robuste Methode zur zelltyp- oder sogar zeitspezifischen Expressionsanalyse auf Chromatinebenen eingeführt (Southall et al., 2013).

4.4 Zellautonome und systemische Regulation des Lipidmetabolismus durch Enok

Die klonalen Analysen der *enok* Überexpression zeigten, dass durch die Fehlfunktion von Enok nicht nur das zellautonome Wachstum reduziert wurde, sondern auch der Lipidmetabolismus betroffen war. Auffällig war, dass *enok* Überexpressionszellen keine Lipidtröpfchen enthielten (Abb. 3.28E). Auch durch eine Stimulation durch proteinreiche Nahrung konnte keine Akkumulation von Lipidtröpfchen im Fettkörper beobachtet werden, wenn gleichzeitig Enok in diesen Zellen überexprimiert wurde (Abb. 7.37C). Ebenfalls konnte eine Reduktion der Transkriptlevel der Lipidmetabolismusgene in den *enok* überexprimierenden Gehirnen beobachtet werden. Dieser Effekt in diesem Gewebe, das natürlicherweise Enok positiv ist und Lipide ab dem dritten Larvalstadium speichert, könnte zu vielen Missregulationen innerhalb des zentralen Nervensystems und in der Peripherie führen. Dies spricht für einen zellautonomen Effekt von Enok, welcher sowohl die Lipidsynthese, den Lipidtransport, als auch den Lipidabbau reguliert. Bei einer Missexpression von Enok bleibt der komplette Lipidmetabolismus aus, was durch die transkriptionellen Analysen bestätigt wurde.

Neben diesem zellautonomen Effekt wurde auch untersucht, welchen Einfluss Enok auf den Lipidmetabolismus in den Enok-exprimierenden Geweben hat. Zu diesen Geweben gehörte der Fettkörper, die Oenozysten und die Cortex Glia (Abb. 4.4).

4.4.1 Enok reguliert den Lipidtransport

Der Fettkörper, welcher während des Embryonal- und des ersten Larvalstadiums Enok exprimiert, ist ein wichtiger Bestandteil der Organ-zu-Organ Kommunikation und damit der Wachstumskontrolle des Organismus (Geminard et al., 2009; Chell und Brand, 2010 und Sousa-Nunes et al., 2011). Bei der Überexpression von *enok* im Fettkörper wurde ein systemischer Effekt festgestellt. Die Expression der Lipoproteine wird von Enok auf der Transkriptebene reguliert, so dass bei einem Funktionsverlust von Enok keine Lipoproteine mehr exprimiert werden und der Lipidtransport komplett unterbrochen wird (Palm et al., 2012). Dadurch werden die Neutrallipide im Darm gespeichert und nicht zum Zielgewebe transportiert. Im Fall des Nahrungsentzugs kann dementsprechend auch kein Transport zu den Oenozysten stattfinden, um dort Lipide schnell und effizient zu Energie umzuwandeln. Als Folge sterben die Tiere, da zusätzlich zum Lipidtransport auch die Fettsäuresynthese durch das

Fehlen von Enok negativ beeinflusst wird. Dass Enok tatsächlich die Regulation von Lipoproteinen im Fettkörper übernimmt, wurde durch die Gal80ts-Experimentreihe gezeigt (Abb. 19E,F). Bei einer Aktivierung der Überexpression mit dem *enok*-Promotor während des dritten Larvalstadiums wurde kein negativer Effekt auf die Lipoproteinexpression mehr festgestellt, da der *enok*-Promotor in diesem Stadium im Fettkörper nicht mehr aktiv ist. Damit konnte in dieser Arbeit Enok als transkriptioneller Regulator der Lipoproteine identifiziert werden. Als Nächstes wäre es interessant zu sehen, ob in Säugetieren ebenfalls diese regulatorische Funktion besteht oder nicht. Das Fettkörperäquivalent in Säugern ist neben dem Fettgewebe die Leber. Sie ist ebenfalls der Ort der Synthese der very low-density lipoproteine (VLDL), dem Homolog zu den *Drosophila* Lipoproteinen. Wie in der Abbildung 4.2G gezeigt, wird das Enok Homolog Querkopf in der Mausembryoleber stark exprimiert. Möglicherweise könnte auch hier durch einen gewebespezifischen Knock Out von *querkopf* ein ähnlicher Einfluss der HAT auf den Lipidtransport gefunden werden.

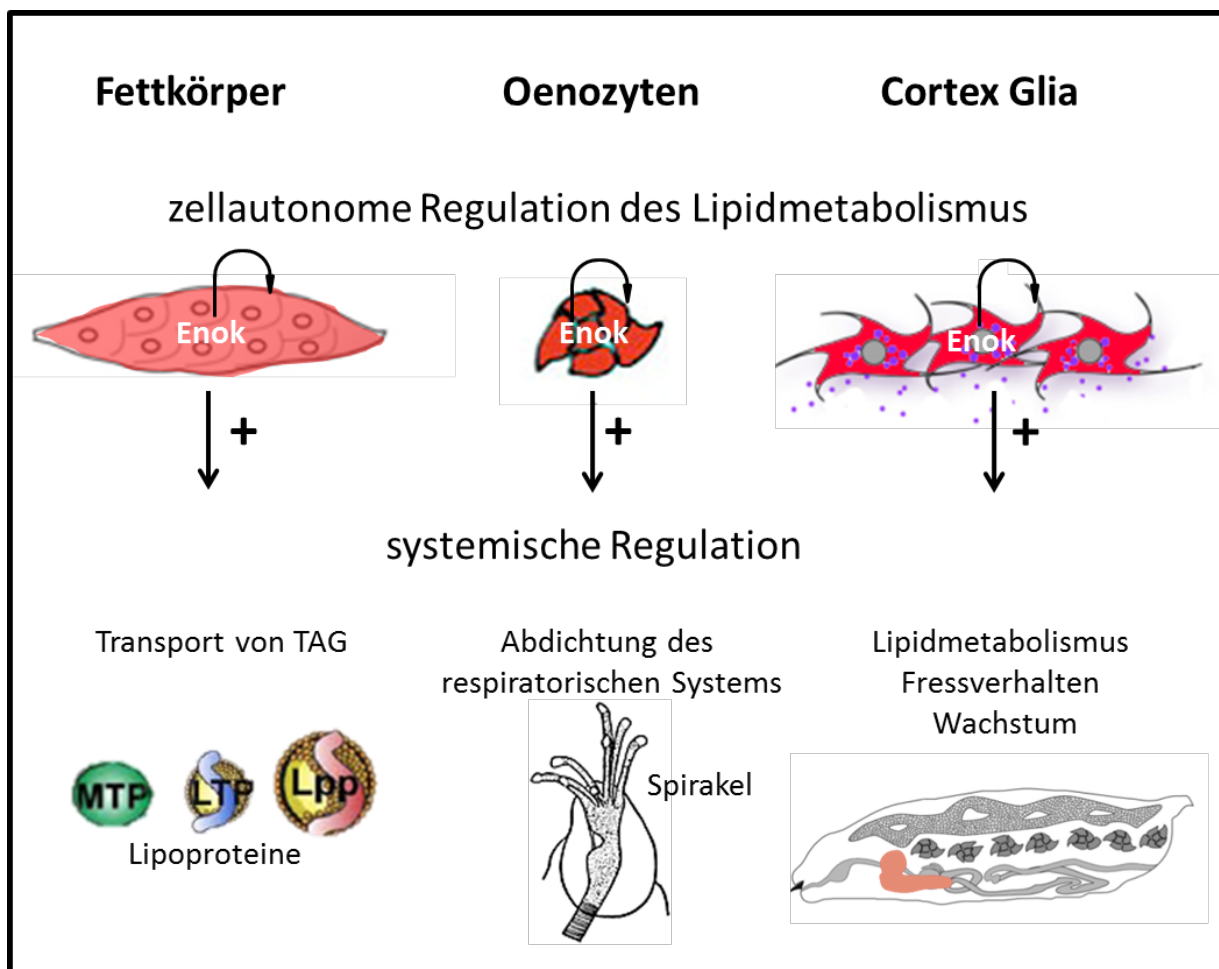


Abbildung 4.4.: Zusammenfassung der Enok-gesteuerten Prozesse.

Funktion von Enok ist in den drei Geweben, dem Fettkörper, den Oenozyten und der Cortex Glia, für lipidmetabolismusabhängige Prozesse essenziell. Auf der zellulären Eben wird die zellautonome Regulation des Lipidmetabolismus von Enok gesteuert (durch gebogenen Pfeil angedeutet). Die systemische Regulation von Enok ist gewebespezifisch. Enok reguliert positiv (+) den fettkörperabhängigen Lipidtransport, in den Oenozyten die Abdichtung des respiratorischen Systems und in der Cortex Glia den globalen Lipidmetabolismus, das Wachstum und das Fressverhalten. TAG, Triglyceride.

4.4.2 Enok ist verantwortlich für die Abdichtung des respiratorischen Systems

Eine weitere systemische Funktion von Enok wurde bei der Missexpression in den Oenozyten entdeckt. Die Oenozyten werden als hepatozyten-ähnliche Zellen beschrieben, welche unter Hunger verstärkt Neutrallipide akkumulieren, um diese anschließend schnell zu energiereichen Verbindungen, wie den Ketokörpern, umwandeln (Schlegel und Stainier, 2007). Der Phänotyp der *enok*-Überexpression zeigte eine nährstoffunabhängige Akkumulation der Neutrallipide in den Oenozyten und zeigte eine transkriptionell erhöhte Metabolismusrate. Dies hätte jedoch nicht zum Wachstumsstopp und Tod führen müssen. Diese Anomalie führte zu einer anderen Erklärung und dadurch zu einer neuen Funktion der Oenozyten. Diese Funktion besteht darin, dass die Oenozyten für die Produktion der *very long chain fatty acid* (VLCFA) verantwortlich sind, welche ihrerseits fernlenkend die Abdichtung des respiratorischen Systems fördert (Parvy et al., 2012). Für die Herstellung dieser VLCFA sind Enzyme der Fettsäuresynthese verantwortlich. Das Fehlen dieser Enzyme führt zum Wasserabdichtungsdefekt. Dabei werden die Öffnungen der Spirakel nicht abgedichtet und Flüssigkeit kann in die Tracheen eindringen. Dies führt dann zum Ersticken des Tieres. Es konnte gezeigt werden, dass Enok für die Transkription dieser Gene verantwortlich ist (Abb. 3.21D) und der Wasserabdichtungsdefekt durch die Abwesenheit von Enok sogar ein Stadium früher auftritt, als bisher beschrieben. Die Erklärung könnte sein, dass Enok auf transkriptioneller Ebene mehr als nur ein Gen reguliert, wie die qPCR zeigte, und dadurch der Effekt verstärkt wird. Das Ersticken, welches durch die Induktion von *scylla* als Hypoxiegen markiert wird (Reiling und Hafen, 2004), liefert als Folge dieser Regulation ebenfalls eine Erklärung für das vorzeitige Wanderverhalten der Tiere. Die Tiere meiden in diesem Fall das Futter und wandern an den Rand des Gefäßes, um dem Erstickungstod zu entkommen. Enok kontrolliert durch seine Funktion in den Oenozyten nicht nur die Abdichtung des respiratorischen Systems, sondern gibt damit auch die Erklärung für das Wanderverhalten. Die Patienten, welche unter den KAT6B assoziierten Erkrankungen Genitopatellar Syndrom und Rubinstein Taybi Syndrom leiden, weisen als Symptom oft Atmungsschwierigkeiten auf (Tab. 4.1). Möglicherweise führen Mutationen von KAT6B/MORF zu einer ähnlichen transkriptionellen Hemmung und fördern dadurch die respiratorischen Defekte.

4.4.3 Zentrale Regulation des Lipidmetabolismus durch Cortex Glia

Immer mehr in den Vordergrund rückt die Funktion einer Zellgruppe, die zunächst eher nicht mit Wachstumskontrolle und Metabolismus in Verbindung gebracht wurde, nämlich der Glia Zellen. Diese Zellpopulation besteht aus mehreren Subtypen, welche jeweils eine spezifische Funktion und Morphologie aufweisen (Hartenstein, 2011; Coutinho-Budd und Freeman, 2013). Bei der Untersuchung der Enok Funktion hat sich vor allem die Cortex Glia als der Schlüsselzelltyp für Lipidmetabolismus im Gehirn und als systemischer, zentraler Regulator im gesamten Organismus herausgestellt. Dass Neutrallipide im larvalen Gehirn akkumuliert werden, wurde von R. Kühnlein bereits gezeigt (Kühnlein, 2011), jedoch wurde nichts über den

Ort, den Zeitpunkt oder die mögliche Aufgabe der Lipide im Gehirn geschrieben. Im Laufe dieser Arbeit wurden diese Aspekte im Zusammenhang mit Enok Funktion untersucht. Die Cortex Glia hat sich als der Ort der Speicherung rausgestellt (Abb. 3.29B). Diese Lipidspeicherung beginnt im Laufe der Entwicklung -nach der Häutung zum dritten Larvalstadium- mit der Akkumulation der Neutrallipide. Vor diesem Zeitpunkt konnte keine Akkumulation im Gehirn festgestellt werden. Dies lässt vermuten, dass die Neutrallipide im Gehirn keine kritische Rolle bei der Entwicklung spielen, da sie erst nach dem Zeitpunkt gespeichert werden, wenn das Tier das Minimalgewicht für die Metamorphose (critical weight theory) erreicht hat (Ruiz-Dubreuil et al., 1996; Mirth et al., 2005; Mirth und Riddiford, 2007; Tennessen und Thummel, 2011). Der Ort und der Zeitpunkt der Speicherung lassen vermuten, dass die Lipide möglicherweise als eine Reserve zur Energielieferung für die letzte neuronale Entwicklung dienen sollen, oder dass sie für die Periode der Verpuppung gespeichert werden. Hier könnte diese zusätzliche Energie in Form von Lipiden zur Versorgung der Neurone dienen, die während der Metamorphose eine energieverzehrende Neuverknüpfung durchmachen. In Säugetieren ist ein ähnliches Phänomen als metabolische Neuron-Glia Verknüpfung und Plastizität bekannt (Magistretti, 2011). Die Frage, ob der Lipidgehalt von der kritischen Masse und dem Nahrungszustand nach diesem Zeitpunkt abhängt oder nicht, muss noch geklärt werden. Durch eine zeitspezifische Überexpression von *enok* konnte die Lipidakkumulation im Gehirn verhindert werden. Wie in jedem anderen Gewebe scheint Enok für die Kontrolle des Fettauf- und Abbaus verantwortlich zu sein. Dass dieser Prozess nicht von Lipoproteinen abhängt, wurde von Palm und Kollegen (2012) bestätigt, da das Gehirn nicht auf Lipide aus dem Darm angewiesen ist. Das bedeutet, dass Enok zellautonom für den Lipidgehalt in den Glia Zellen verantwortlich ist. Welche Auswirkungen die fehlende Speicherung bei einer Enok Dysfunktion auf die Gehirnentwicklung hat, muss noch gezeigt werden. Neben dieser zellautonomen Lipidmetabolismusfunktion übernimmt Enok auch eine systemische Regulation beim Lipidmetabolismus des gesamten Organismus.

Wie der Phänotyp -insbesondere die fehlende Nahrungsaufnahme-, welcher durch Cortex Glia spezifische *enok*-Überexpression entstanden ist, vermuten ließ, wurde die Nährstoffwahrnehmung hier nicht richtig gesteuert. Denn zusätzlich dazu verminderten die Tiere ihr Wachstum und starben nach einiger Zeit, ohne dass sie das dritte Larvenstadium erreichten. Trotz der fehlenden Nahrungsaufnahme und des Wachstums, passten die Tiere ihr Verhalten nicht an und vermieden weiterhin die Nahrungsquelle. Die Erklärung für dieses Verhalten bot die Lipidgehalt-Analyse mittels der Oil Red O Färbungen. Es wurde sichtbar, dass die Tiere sogar unter Mangelbedingungen ihre Lipidreserven nicht angriffen, um Energie zu gewinnen. Das Transkriptionsprofil zeigte, warum diese Regulation nicht erfolgte. Die Lipidmetabolismusgene wurden nicht aktiviert (Abb. 3.27). Aufgrund dieser Ergebnisse kann die Hypothese aufgestellt werden, dass Enok in der Cortex Glia nicht nur zellautonom den Lipidmetabolismus steuert sondern auch die Peripherie beeinflusst. Enok beeinflusst zentral vom Gehirn aus den Lipidgehalt des gesamten Körpers. Der nächste Schritt wäre nun auf

zellulärer Ebene zu untersuchen, welches potentielle Signalmolekül oder welche Kombination von Signalen den Lipidmetabolismus fernlenkend steuert. Die Funktion von Enok in der Cortex Glia bestünde darin unter Mangelbedingungen die Transkription dieser Signalmoleküle zu aktivieren und den Lipidabbau zentral zu steuern. Dabei ist die Funktion der Cortex Glia entscheidend, da dieser Zelltyp auf Nährstoffsignale reagiert und ihnen entsprechend die Gehirnentwicklung und die Neuroblastenproliferation mittels Ausschüttung von Dilp6 steuert (Chell und Brand, 2010; Sousa-Nunes et al., 2011). Dass Enok auch eine sehr wichtige Funktion in der Neuroblastenproliferation hat, wurde bereits von Scott und Kollegen (2001) gezeigt. Enok scheint aufgrund dieser Tatsachen die Verbindung zwischen der Peripherie und dem Gehirn herzustellen. Durch seine epigenetische Funktion könnte Enok je nach Nährstoffsignal die Transkription der speziellen Signalmoleküle aktivieren. Bei seinem Fehlen bleiben die Neuroblastenproliferation und die Lipidmetabolismusaktivität aus. Die Frage nach den Signalmolekülen muss jedoch noch beantwortet werden.

4.5 Enok spielt eine Rolle in der Wachstumskontrolle und der Organ zu Organ Kommunikation

Drosophila vervielfacht ihre Masse um das 200fache während der Larvalstadien (Robertson, 1966). Hier müssen die Nährstoffsignale von außen und die interne Homöostase akkurat miteinander koordiniert werden, um Wachstum zu ermöglichen und das Überleben der Larve zu sichern. Wachstum wird nahrungsabhängig reguliert, denn bei einer Restriktion von Proteinen wird das Wachstum verlangsamt und während eines Nahrungsentzugs komplett gestoppt (Britton und Edgar, 1998). Die Verarbeitung und Weiterleitung des Nährstoffsignals ist essentiell. Wie die Organe dann untereinander diese Information weitergeben, um das Wachstum zu koordinieren, ist bis jetzt eine der großen Fragen, welche die Wissenschaft beschäftigt. Eine der gängigsten Theorien ist die Organ-zu-Organ Kommunikation. Hier werden nach der Aminosäureaufnahme humorale Signale aus dem Fettkörper sezerniert. Daraufhin findet als Antwort eine Sekretion der Dilps aus dem Gehirn statt, welche wiederum das Wachstum der Peripherie beeinflussen (Britton und Edgar, 1998; Geminard et al., 2009; Chell und Brand, 2010 und Sousa-Nunes et al., 2011) (Abb. 4.4). Die Dilps, welche in der Hämolymphe zirkulieren, leiten das Wachstum ein indem sie an den Insulinrezeptor binden und den PI3K/AKT-Signalweg aktivieren (Teleman, 2009).

Sowohl bei der *enok*-Mutante als auch bei der Überexpression von *enok* ist ein eindeutiger Wachstumsdefekt zu sehen. Die Larven sind signifikant kleiner als die entsprechende Kontrolle und stellen die Nahrungsaufnahme ein. Paradoxerweise zeigen sie eine erhöhte Hungerresistenz, und keine transkriptionelle Hungerantwort. Der Hunger-Marker *lip3* wird in den Tieren nicht aktiviert, gleichzeitig bleibt auch die Induktion der β -Oxidations-Gene aus. Dadurch sind die Tiere nicht in der Lage ihre Fettreserven zu mobilisieren. Es kommt zu einer erhöhten Hungerresistenz bei Nahrungsentzug. Da die Tiere jedoch eine längere Zeit leben

ohne sich weiter zu entwickeln, muss ein anderer Mechanismus das Überleben sichern und für Energiezulieferung sorgen. Eine mögliche Erklärung ist die Aktivierung der Autophagie unter Hunger. Dieser Prozess wird normalerweise durch den TOR-Signalweg gehemmt, bei Hunger jedoch wird die Autophagie im Fettkörper aktiviert. Dadurch wird eine andere Quelle für Nährstoffe angegriffen. Durch Autophagie werden langlebige Proteine, Zellorganellen und andere Komponenten des Zytoplasmas angegriffen und wiederverwertet. Dadurch schafft es die Zelle sich eine Nährstoffreserve aufzubauen. Während dieses Prozesses ist die Zelle gefüllt mit Vesikeln, die als Autophagosome bezeichnet werden (Scott et al., 2004). Durch eine immunfluoreszente Methode kann man sehr einfach die Lysosome nachweisen und ihre Zahl pro Zelle bestimmen. Diese Methode wäre auch der Versuchsansatz, welcher gewählt werden würde, um nachzuweisen, ob und wie stark die Autophagie in den *enok*-Mutanten und Überexpressionstieren induziert wird.

Zusätzlich zu der fehlenden Hungerantwort auf den Nahrungsentzug bei einer Dysfunktion von Enok wurde der beschriebene Wachstumsdefekt festgestellt. Auch auf transkriptioneller Ebene wurde diese Regulation deutlich, da das Wachstumsarrestgen *4ebp* stark induziert wurde. Die Regulation von *4ebp* wird durch den Insulin- und den TOR-Signalweg kontrolliert. Durch die Induktion von *4ebp* während eines Nahrungsentzugs wird die Translation als eine Art Energiesparprogramm gehemmt (Teleman et al., 2005). Ein weiteres Gen, welches in Verbindung zum Insulinsignalweg steht, ist *ImpL2*. Die Expression von *ImpL2* wird, wie *4ebp*, unter Hunger induziert. Dieses Protein hat eine Funktion in der nahrungsabhängigen Entwicklung und fungiert als ein Antagonist des Insulinsignalweges (Honegger et al., 2008). Bei Mangelernährung wird *ImpL2* aus dem Gehirn in die Hämolymphe abgegeben und bindet das freie Insulin. Dadurch wird der Insulinsignalweg im Zielgewebe unterdrückt.

Das Paradoxe ist, dass trotz des proteinreichen Nahrungsangebots die *enok* Missexpressionstiere das Wachstum einstellen (*4ebp* Induktion) und den Insulinsignalweg blockieren (*ImpL2* Induktion). Aufgrund dieser Beobachtungen kann man die Hypothese aufstellen, dass die Organ-zu-Organ Kommunikation unterbrochen wird und falsche Signale gesendet werden. Damit wäre Enok die regulatorische Instanz, die diese Art der Gewebekommunikation steuert. Wo der Fehler in der Signaltransduktion liegt, kann bis jetzt nur vermutet werden. Dennoch gibt es handfeste Hinweise auf das Gehirn und speziell auch die Cortex Glia als die regulatorische Einheit, die die Signale entgegennimmt, verarbeitet und weiterleitet. Zu diesen Hinweisen gehört unter anderem der direkte oder indirekte Einfluss der Cortex Glia auf die Ausschüttung der Dilps aus den neurosekretorischen Zellen (Abb. 4.5). Dass auch hier Enok die Signalverarbeitung und Weiterleitung steuert, wird aus dem Experiment der Dilp-Sekretion klar (Kapitel 3.7.2). Bei einer Überexpression von *enok* in Cortex Glia Zellen wurden unabhängig von den Nahrungsbedingungen die Dilps in den neurosekretorischen Zellen zurückgehalten. Dies findet normalerweise nur unter Nahrungsentzug statt (Geminard et al., 2009). Diese fehlende Sekretion erklärt auch warum in der Peripherie der Wachstumsarrest durch *4ebp* induziert wird, auch wenn die Tiere

proteinreiche Nahrung zur Verfügung haben. Dies deutet auf eine falsche Signalverarbeitung im Gehirn hin. Durch diese dramatische Einwirkung auf die Ausschüttung von Dilps kann Enok als positiver Wachstumsregulator bezeichnet werden.

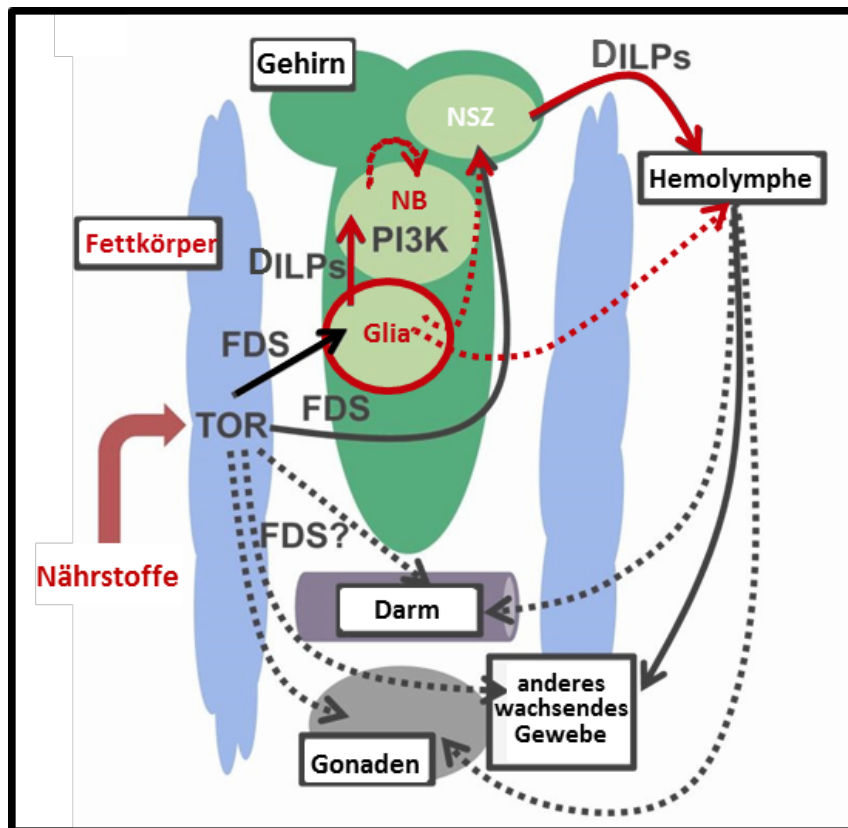


Abbildung 4.5: Einfluss von Enok auf die Interorgan-Kommunikation.

Funktion von Enok als ein neuer Mitspieler in der Interorgan-Kommunikation. In der Larve wird im Fettkörper über die Aktivierung des TOR-Signalweges der Nährstoffzustand wahrgenommen. Anschließend wird über ein bis jetzt unbekanntes aus dem Fettkörper sezerniertes Signal (FDS) die Dilp-Expression in Glia Zellen aktiviert. Diese Dilps kontrollieren die Reaktivierung der benachbarten Neuroblasten über den Insulin/PI3K/TOR-Signalweg. Dasselbe oder ein anderes FDS aktiviert die Ausschüttung der Dilps aus den neurosekretorischen Zellen. Die freien Dilps in der Hämolymphe kontrollieren den Insulin/PI3K/TOR-Signalweg ihrerseits in der Peripherie. Enok als epigenetische regulatorische Einheit, die direkt die Transkription verändert, steuert die Signalverarbeitung und die Ausschüttung der Signalmoleküle. In rot markiert sind die Enok-exprimierenden Gewebe. Glia ist als zentraler Regulator mit einem roten Oval markiert. Rote durchgezogene Pfeile markieren die bestätigte Kontrollfunktion von Enok in den Neuroblasten und in den neurosekretorischen Zellen. Gepunktete Pfeile markieren putative Signaltransduktionswege. Dilps, *Drosophila* insulin-like peptides; FDS, fat body-derived signal, NBs, Neuroblasten; NSZ neurosekretorische Zellen. (übernommen und modifiziert von Ables und Drummond-Barbosa, 2011).

Neben der Ausschüttung von Dilps aus den neurosekretorischen Zellen verursacht die Missexpression von Enok in der Cortex Glia zellautonom die transkriptionelle Reduktion von *dilp6* (Abb. 3.30B). Diese Reduktion im Zusammenhang mit der Induktion von *fmrp* (Abb. 3.30C) würde die Reaktivierung der Neuroblastenteilung verhindern (Chell und Brand, 2010 und Sousa-Nunes et al., 2011; Callan et al., 2012). Dies ist auch der Fall, sowohl in den Mutanten (Scott et al., 2001) als auch bei der Überexpression von *enok* (Abb. 3.25A,B) war die Proliferation der Neuroblasten gehemmt. Neben der zellautonomen Regulation der Zellteilung durch Enok in den Neuroblasten selbst, wird sie zusätzlich noch fernlenkend durch die Aktivität

von Enok in den Glia Zellen gesteuert, indem es die *dilp6* Transkription kontrolliert. Die Lipolyse und die β -Oxidation könnten ebenfalls durch ein Signal aus der Cortex Glia, welches in die Peripherie abgegeben wird, initialisiert werden. Durch diese zentrale Regulation in der Organ-zu-Organ Kommunikation wird Enok zu einem neuen Mitspieler in der Kontrolle des Wachstums, des Lipidmetabolismus und der Neuroblastenproliferation. Neben den bereits bekannten Regulationsmechanismen wäre Enok der erste epigenetische Faktor in *Drosophila*, welcher eine derart spezifische Funktion hätte. Nur noch in der Hefe wurde eine direkte Verbindung zwischen Metabolismus, Histon-Acetyltransferase und Wachstum gezeigt (Cai et al., 2011).

4.6 *enok* Überexpression im Gehirn verursacht eine Hyperphosphorylierung von AKT (und damit möglicherweise einen Nahrungsaufnahmestopp)

Trotz des deutlichen Wachstumsstopps werden die Hungerantwort und das damit verbundene Nahrungsaufnahmeprogramm in *enok*-Missexpressionslarven nicht initialisiert. Die Tiere nehmen keine Nahrung auf und greifen ebenfalls ihre Fettreserven nicht an. Nach außen vermitteln sie den Eindruck der Sättigung. Nur der Wachstumsdefekt liefert einen Hinweis darauf, dass das Verhalten nicht dem metabolischen Zustand entspricht. Der Fehler scheint in der Verarbeitung der ankommenden Signale zu liegen. Wie bereits gezeigt, spielt Enok eine große Rolle im olfaktorischen System und in der Verarbeitung der nahrungsabhängigen Signale (Moderau, 2009). Ein wichtiger Teil des Verarbeitungssystems sind die Pilzkörper und die Pilzkörper Zellen, die Kenyon Zellen, welche für das Lernen und das Erinnerungsvermögen in der Olfaktorik verantwortlich sind (Vosshall und Stocker, 2007). In den *enok*-Mutanten war die Anzahl dieser Zellen stark reduziert (Scott et al., 2001). Es ist wahrscheinlich, dass durch diese Reduktion der Zellen, welche aus den Neuroblasten entstehen, eine Unterbrechung oder Fehlinterpretation des Signals stattfindet. Dieser Phänotyp scheint stark konserviert zu sein, denn in Maus ist eine ähnliche Reduktion der Interneurone des Riechkolbens beobachtet worden (Thomas et al., 2000; Merson et al., 2006). Wie diese Fehlinterpretation des Signals auf zellulärer Ebene zur Verhaltensauffälligkeit führt, die bei den *enok*-Missexpressionstieren beobachtet wurde, kann bis jetzt nicht eindeutig beantwortet werden. Möglicherweise spielt auch hier der PI3K/AKT-Signalweg eine wichtige Rolle. Bei einer Erhöhung der Insulinlevel im Gehirn und damit der Aktivierung des PI3K/AKT-Signalweges kann das hungerbedingte Fressverhalten künstlich unterdrückt werden (Wu et al., 2005).

Im Fall der *enok*-Überexpression wurden im Gehirn trotz der Induktion von *fmrp*, welches den Insulinsignalweg durch pAKT Hemmung negativ beeinflusst (Callan et al., 2012), sehr viel mehr Zellen gefunden, die positiv für pAKT waren als in der gleich alten und gleich behandelten Kontrolle (Abb. 3.30E,F). Die betroffenen Zellen waren, weder Glia Zellen noch Neuroblasten, sondern postmitotische Neurone. Durch den erhöhten Spiegel von pAKT würde den Zellen ein positiver Ernährungszustand suggeriert werden und das Tier würde als Folge

dessen die Nahrungsaufnahme einstellen. Genau dies findet auch in den *enok*-Überexpressionstieren statt. Um diese Hypothese bestätigen zu können, müssen im nächsten Schritt die Zellen, welche die erhöhten pAKT-Level aufweisen, durch Gegenfärbungen identifiziert werden. Die Größe und Position der Zellen im Gehirn gibt jedoch schon einige Hinweise auf ihre mögliche Identität. Die pAKT positiven Zellen gehörten möglicherweise zur Gruppe der Kenyon Zellen, der Projektionsneurone, die zu den Pilzkörpern projizieren und zu den neurosekretorischen Zellen. Durch gezielte Anwendung der Immunfluoreszenz kann die Identität dieser Zellen schnell und sicher bestätigt und ihre Aufgabe in der nahrungsabhängigen Signalverarbeitung in die Hypothese eingebunden werden.

Wie die Hyperphosphorylierung von AKT in den Zellen entsteht, obwohl kein Insulin aus den neurosekretorischen Zellen ausgeschüttet wird, ist die nächste Frage. Hierbei bietet das humane Homolog KAT6B eine mögliche Erklärung. In den Noonan-like-Syndrom Patienten, wurden ebenfalls hohe Level von pAKT festgestellt. Mit Hilfe umfassender CHIP-Analysen am Patientengewebe wurde aufgeklärt, dass die Hyperaktivität des MAPK-Signalweges dafür verantwortlich ist (Kraft et al., 2011). In der Fliege wurde zudem die Verbindung des MAPK-Signalweges und des Insulinsignalweges in der Regulation des Metabolismus beschrieben. Über den MAPK-Signalweg gesteuerten Transkriptionsfaktor Pointed wird die Transkription des Insulin-Rezeptors kontrolliert. Durch diesen Mechanismus wird die Insulinsensitivität an die Nahrungsbedingungen angepasst (Zhang et al., 2011). Tatsächlich war in den *enok*-Überexpressionstieren die Transkription von *pointed* gehemmt. Diese Regulation gibt die ersten Hinweise darauf, dass Enok auch in *Drosophila* für die transkriptionelle Kontrolle einiger Gene des MAPK-Signalweges verantwortlich sein könnte. Wie jedoch die Signalkaskade im Einzelnen aktiviert wird, muss noch untersucht werden. Auch dieser Prozess könnte entweder direkt in Neuronen selbst, oder fernlenkend durch die Cortex Glia reguliert werden. Vielleicht spielt dabei auch die posttranslationale Spaltung von Enok eine Rolle, denn der N-Terminus des Proteins befindet sich in den Neuronen und besitzt dadurch noch die histonbindende Domäne. Es wäre möglich, dass dieses Stück trotz der Spaltung eine epigenetische Funktion besitzt. Diese Eventualität müsste jedoch mit Hilfe der getaggen Konstrukte analysiert werden.

Zusammenfassend kann die Hypothese aufgestellt werden, dass Enok epigenetisch die Transkription von MAPK-Signalwegproteinen und damit auch die Level von pAKT steuert. Als Folge dieser Regulation in speziellen Neuronen wird durch ihren eigenen metabolischen Status das Nahrungsaufnahmeverhalten gesteuert. Bei einer Mutation von *enok* fehlt die regulatorische Einheit. Durch die unkontrollierten Level des pAKT im Gehirn wird der eigentliche metabolische Zustand des gesamten Körpers maskiert und die Neurone kontrollieren eigenmächtig die Nahrungsaufnahme ohne die Signale richtig verarbeitet zu haben. Dadurch wird die Organ-zu-Organ Kommunikation unterbrochen und die Nahrungs- und Wachstumssignale können nicht mehr miteinander koordiniert werden.

4.7 Fazit

In der vorliegenden Dissertation wurde das Protein Enok molekularbiologisch, biochemisch und unter Einsatz von Mikroskopie morphologisch charakterisiert. Zusätzlich wurde verhaltensphysiologisch seine Funktion in der Wachstumskontrolle, im Metabolismus und in der Nahrungsaufnahme untersucht.

Die starke Expressions- und Funktionshomologie zu den andern KAT6B-Familienmitgliedern gibt immer mehr Hinweise auf eine putative Histon-Acetyltransferase Aktivität von Enok. Die biochemischen und fluoreszenten Analysen des Acetyloms und die Kernlokalisation von Enok ausschließlich in der Nähe des aufgelockerten Chromatins unterstützen diese Theorie. Durch quantitative Transkriptionsanalysen wurden putative Zielgene von Enok identifiziert, die eine wichtige Rolle im Lipidmetabolismus spielen. Ebenfalls wurde Enok als ein zentraler Regulator in Glia Zellen beschrieben, der in der Lage ist das Wachstum und die Nahrungsaufnahme zu steuern.

Um Enok endgültig als eine Histon-Acetyltransferase zu bestätigen und seine Funktion in dem Multiprotein-Komplex zu identifizieren, müssen noch weitere Experimente durchgeführt werden. Die Histon-Acetyltransferase Aktivität kann mittels eines HAT-Assays nachgewiesen werden. Ob Enok für diese Aktivität wie seine Säugetier-Homologe einen Komplex benötigt, kann mit Hilfe biochemischer Analysen, wie der Immunpräzipitation und der Massenspektrometrie, untersucht werden. Für diese Versuchsreihe kann der aufgereinigte, polyklonale Antikörper oder die getaggten Konstrukte benutzt werden. In diesem Zusammenhang und mit denselben Werkzeugen können weitere posttranslationale Modifikationen identifiziert werden.

Um die Zielgene eindeutig identifizieren zu können, sollte der bereits gestartete Ansatz der CHIP und der anschließenden Sequenzierung der DNA-Fragmente weiter verfolgt werden. Dabei könnte die wildtypische Bindung von Enok an die Zielgene mit dem Profil der Mutante und der Überexpression verglichen werden. Neben der Verifikation der Zielgene, kann man die Hypothese der Balance überprüfen, indem man untersucht ob durch die Überexpression einer Subeinheit des Komplexes tatsächlich ein loss-of-function Phänotyp entsteht. Ebenfalls könnte untersucht werden, ob Enok in der Fliege, wie KAT6B im Menschen den MAPK-Signalweg reguliert. Mit der bereits erreichten Verkleinerung der eingesetzten Zellmenge werden sogar gewebespezifische Analysen möglich. Für eine zelltypspezifische Analyse sollte dagegen nicht mehr die CHIP, sondern die TaDa-Methode verwendet werden (Southall et al., 2013), um eine bessere Auflösung der Enok Funktion in spezifischen Zelltypen analysieren zu können. Dadurch könnte man nicht nur das Expressionsprofil vom gesamten Gehirn erstellen, sondern die Expressionsprofile der Cortex Glia und der Neuroblasten miteinander vergleichen. Diese Erkenntnisse würden helfen, die zentrale Funktion von Enok in der Verhaltensänderung und in der Wachstumskontrolle besser zu verstehen. Weiterhin könnten die gewonnenen Informationen möglicherweise auch zu der Aufklärung des *querkopf*-Phänotyps und den KAT6B

assoziierten Erkrankungen beitragen.

5. Literaturverzeichnis

Ables ET, Drummond-Barbosa D. Food for thought: neural stem cells on a diet. *Cell Stem Cell*. 2011 Apr 8;8(4):352-4.

Ahima RS, Osei SY. Adipokines in obesity. *Front Horm Res*. 2008;36:182-97.

Ali M, Yan K, Lalonde ME, Degerny C, Rothbart SB, Strahl BD, Côté J, Yang XJ, Kutateladze TG. Tandem PHD fingers of MORF/MOZ acetyltransferases display selectivity for acetylated histone H3 and are required for the association with chromatin. *J Mol Biol*. 2012 Dec 14;424(5):328-38.

Altschul SF, Wootton JC, Gertz EM, Agarwala R, Morgulis A, Schäffer AA, Yu YK. Protein database searches using compositionally adjusted substitution matrices. *FEBS J*. 2005 Oct;272(20):5101-9.

Altschul SF, Madden TL, Schäffer AA, Zhang J, Zhang Z, Miller W, Lipman DJ. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res*. 1997 Sep 1;25(17):3389-402.

Anholt RR, Williams TI. The soluble proteome of the *Drosophila* antenna. *Chem Senses*. 2010 Jan;35(1):21-30.

Armstrong L, Clarke JT. Report of a new case of "genitopatellar" syndrome which challenges the importance of absent patellae as a defining feature. *J Med Genet*. 2002 Dec;39(12):933-4.

Bader R, Sarraf-Zadeh L, Peters M, Moderau N, Stocker H, Köhler K, Pankratz MJ, Hafen E. The IGFBP7 homolog Imp-L2 promotes insulin signaling in distinct neurons of the *Drosophila* brain. *J Cell Sci*. 2013 Jun 15;126(Pt 12):2571-6.

Bai H, Kang P, Tatar M. *Drosophila* insulin-like peptide-6 (*dilp6*) expression from fat body extends lifespan and represses secretion of *Drosophila* insulin-like peptide-2 from the brain. *Aging Cell*. 2012 Dec;11(6):978-85.

Barnes PJ, Adcock IM, Ito K. Histone acetylation and deacetylation: importance in inflammatory lung diseases. *Eur Respir J*. 2005 Mar;25(3):552-63.

Berger J, Senti KA, Senti G, Newsome TP, Asling B, Dickson BJ, Suzuki T. Systematic identification of genes that regulate neuronal wiring in the *Drosophila* visual system. *PLoS Genet*. 2008 May 30;4(5):e1000085.

Bjordal M, Arquier N, Kniazeff J, Pin JP, Léopold P. Sensing of amino acids in a dopaminergic circuitry promotes rejection of an incomplete diet in *Drosophila*. *Cell*. 2014 Jan 30;156(3):510-21.

Brankatschk M, Eaton S. Lipoprotein particles cross the blood-brain barrier in *Drosophila*. *J Neurosci*. 2010 Aug 4;30(31):10441-7.

Brankatschk M, Dunst S, Nemetschke L, Eaton S. Delivery of circulating lipoproteins to specific neurons in the *Drosophila* brain regulates systemic insulin signaling. *Elife*. 2014 Oct 2;3.

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

- Butler AA, Le Roith D. Control of growth by the somatotropic axis: growth hormone and the insulin-like growth factors have related and independent roles. *Annu Rev Physiol.* 2001;63:141-64.
- Bülow MH, Aebersold R, Pankratz MJ, Jünger MA. The *Drosophila* FoxA ortholog Fork head regulates growth and gene expression downstream of Target of rapamycin. *PLoS One.* 2010 Dec 31;5(12):e15171.
- Cai L, Sutter BM, Li B, Tu BP. Acetyl-CoA induces cell growth and proliferation by promoting the acetylation of histones at growth genes. *Mol Cell.* 2011 May 20;42(4):426-37.
- Callan MA, Clements N, Ahrendt N, Zarnescu DC. Fragile X Protein is required for inhibition of insulin signaling and regulates glial-dependent neuroblast reactivation in the developing brain. *Brain Res.* 2012 Jun 26;1462:151-61.
- Campeau PM, Lu JT, Dawson BC, Fokkema IF, Robertson SP, Gibbs RA, Lee BH. The KAT6B-related disorders genitopatellar syndrome and Ohdo/SBBYS syndrome have distinct clinical features reflecting distinct molecular mechanisms. *Hum Mutat.* 2012 Nov;33(11):1520-5.
- Champagne KS, Saksouk N, Peña PV, Johnson K, Ullah M, Yang XJ, Côté J, Kutateladze TG. The crystal structure of the ING5 PHD finger in complex with an H3K4me3 histone peptide. *Proteins.* 2008 Sep;72(4):1371-6.
- Chell JM, Brand AH. Nutrition-responsive glia control exit of neural stem cells from quiescence. *Cell.* 2010 Dec 23;143(7):1161-73.
- Cheng LY, Bailey AP, Leever SJ, Ragan TJ, Driscoll PC, Gould AP. Anaplastic lymphoma kinase spares organ growth during nutrient restriction in *Drosophila*. *Cell.* 2011 Aug 5;146(3):435-47.
- Chia W, Somers WG, Wang H. *Drosophila* neuroblast asymmetric divisions: cell cycle regulators, asymmetric protein localization, and tumorigenesis. *J Cell Biol.* 2008 Jan 28;180(2):267-72.
- Choi S, Kim W, Chung J. *Drosophila* salt-inducible kinase (SIK) regulates starvation resistance through cAMP-response element-binding protein (CREB)-regulated transcription coactivator (CRTC). *J Biol Chem.* 2011 Jan 28;286(4):2658-64.
- Choudhary C, Kumar C, Gnad F, Nielsen ML, Rehman M, Walther TC, Olsen JV, Mann M. Lysine acetylation targets protein complexes and co-regulates major cellular functions. *Science.* 2009 Aug 14;325(5942):834-40.
- Clayton-Smith J, O'Sullivan J, Daly S, Bhaskar S, Day R, Anderson B, Voss AK, Thomas T, Biesecker LG, Smith P, Fryer A, Chandler KE, Kerr B, Tassabehji M, Lynch SA, Krajewska-Walasek M, McKee S, Smith J, Sweeney E, Mansour S, Mohammed S, Donnai D, Black G. Whole-exome-sequencing identifies mutations in histone acetyltransferase gene KAT6B in individuals with the Say-Barber-Biesecker variant of Ohdo syndrome. *Am J Hum Genet.* 2011 Nov 11;89(5):675-81.
- Colombani J, Raisin S, Pantalacci S, Radimerski T, Montagne J, Léopold P. A nutrient sensor mechanism controls *Drosophila* growth. *Cell.* 2003 Sep 19;114(6):739-49.
- Coutinho-Budd J, Freeman MR. Probing the enigma: unraveling glial cell biology in invertebrates. *Curr Opin Neurobiol.* 2013 Dec;23(6):1073-9.
- Davis KT, Shearn A. In vitro growth of imaginal disks from *Drosophila melanogaster*. *Science.* 1977 Apr 22;196(4288):438-40.

- Day R, Beckett B, Donnai D, Fryer A, Heidenblad M, Howard P, Kerr B, Mansour S, Maye U, McKee S, Mohammed S, Sweeney E, Tassabehji M, de Vries BB, Clayton-Smith J. A clinical and genetic study of the Say/Barber/Biesecker/Young-Simpson type of Ohdo syndrome. *Clin Genet.* 2008 Nov; 74(5):434-44.
- Doe CQ. Neural stem cells: balancing self-renewal with differentiation. *Development.* 2008 May; 135(9):1575-87.
- Ferris GF. External morphology of the adult. M. Demerec. *Biology of Drosophila.* 1950. 5: 368-419.
- Fishilevich E, Vosshall LB. Genetic and functional subdivision of the *Drosophila* antennal lobe. *Curr Biol.* 2005 Sep 6; 15(17):1548-53.
- Gaszner M, Felsenfeld G. Insulators: exploiting transcriptional and epigenetic mechanisms. *Nat Rev Genet.* 2006 Sep; 7(9):703-13.
- Gibbons GF, Islam K, Pease RJ. Mobilisation of triacylglycerol stores. *Biochim Biophys Acta.* 2000 Jan 3; 1483(1):37-57.
- Gould AP, Elstob PR, Brodu V. Insect oenocytes: a model system for studying cell-fate specification by Hox genes. *J Anat.* 2001 Jul-Aug; 199(Pt 1-2):25-33.
- Grewal SS. Controlling animal growth and body size - does fruit fly physiology point the way? *F1000 Biol Rep.* 2012; 4:12.
- Grewal SS. Insulin/TOR signaling in growth and homeostasis: a view from the fly world. *Int J Biochem Cell Biol.* 2009 May; 41(5):1006-10.
- Gupta J, Kumar S, Li J, Krishna Murthy Karuturi R, Tikoo K. Histone H3 lysine 4 monomethylation (H3K4me1) and H3 lysine 9 monomethylation (H3K9me1): distribution and their association in regulating gene expression under hyperglycaemic/hyperinsulinemic conditions in 3T3 cells. *Biochimie.* 2012 Dec; 94(12):2656-64.
- Gutierrez E, Wiggins D, Fielding B, Gould AP. Specialized hepatocyte-like cells regulate *Drosophila* lipid metabolism. *Nature.* 2007 Jan 18; 445(7125):275-80.
- Géminard C, Rulifson EJ, Léopold P. Remote control of insulin secretion by fat cells in *Drosophila*. *Cell Metab.* 2009 Sep; 10(3):199-207.
- Halder G, Johnson RL. Hippo signaling: growth control and beyond. *Development.* 2011 Jan; 138(1):9-22.
- Hartenstein V. Morphological diversity and development of glia in *Drosophila*. *Glia.* 2011 Sep; 59(9):1237-52.
- Hietakangas V, Cohen SM. Regulation of tissue growth through nutrient sensing. *Annu Rev Genet.* 2009; 43:389-410.
- Homem CC, Knoblich JA. *Drosophila* neuroblasts: a model for stem cell biology. *Development.* 2012 Dec 1; 139(23):4297-310.
- Honegger B, Galic M, Köhler K, Wittwer F, Brogiolo W, Hafen E, Stocker H. Imp-L2, a putative homolog of vertebrate IGF-binding protein 7, counteracts insulin signaling in *Drosophila* and is essential for starvation resistance. *J Biol.* 2008; 7(3):10.
- Hong SH, Lee KS, Kwak SJ, Kim AK, Bai H, Jung MS, Kwon OY, Song WJ, Tatar M, Yu K. Minibrain/Dyrk1a regulates food intake through the Sir2-FOXO-sNPF/NPY pathway in *Drosophila* and mammals. *PLoS Genet.* 2012; 8(8):e1002857.

Houten SM, Wanders RJ. A general introduction to the biochemistry of mitochondrial fatty acid β -oxidation. *J Inher Metab Dis*. 2010 Oct;33(5):469-77.

Jansen R, Greenbaum D, Gerstein M. Relating whole-genome expression data with protein-protein interactions. *Genome Res*. 2002 Jan;12(1):37-46.

Jeon TI, Osborne TF. SREBPs: metabolic integrators in physiology and metabolism. *Trends Endocrinol Metab*. 2012 Feb;23(2):65-72.

Kannan K, Fridell YW. Functional implications of *Drosophila* insulin-like peptides in metabolism, aging, and dietary restriction. *Front Physiol*. 2013 Oct 16;4:288.

Killip LE, Grewal SS. DREF is required for cell and organismal growth in *Drosophila* and functions downstream of the nutrition/TOR pathway. *Dev Biol*. 2012 Nov 15;371(2):191-202.

Klämbt C. The *Drosophila* gene pointed encodes two ETS-like proteins which are involved in the development of the midline glial cells. *Development*. 1993 Jan;117(1):163-76.

Klein BJ, Lalonde ME, Côté J, Yang XJ, Kutateladze TG. Crosstalk between epigenetic readers regulates the MOZ/MORF HAT complexes. *Epigenetics*. 2014 Feb 1;9(2):186-93.

Knoblich JA. Mechanisms of asymmetric stem cell division. *Cell*. 2008 Feb 22;132(4):583-97.

Kornberg RD, Lorch Y. Twenty-five years of the nucleosome, fundamental particle of the eukaryote chromosome. *Cell*. 1999 Aug 6;98(3):285-94.

Kouzarides T. Acetylation: a regulatory modification to rival phosphorylation? *EMBO J*. 2000 Mar 15;19(6):1176-9.

Kraft M, Cirstea IC, Voss AK, Thomas T, Goehring I, Sheikh BN, Gordon L, Scott H, Smyth GK, Ahmadian MR, Trautmann U, Zenker M, Tartaglia M, Ekici A, Reis A, Dörr HG, Rauch A, Thiel CT. Disruption of the histone acetyltransferase MYST4 leads to a Noonan syndrome-like phenotype and hyperactivated MAPK signaling in humans and mice. *J Clin Invest*. 2011 Sep;121(9):3479-91.

Kurtovic A, Widmer A, Dickson BJ. A single class of olfactory neurons mediates behavioural responses to a *Drosophila* sex pheromone. *Nature*. 2007 Mar 29;446(7135):542-6.

Kwak SJ, Hong SH, Bajracharya R, Yang SY, Lee KS, Yu K. *Drosophila* adiponectin receptor in insulin producing cells regulates glucose and lipid metabolism by controlling insulin secretion. *PLoS One*. 2013 Jul 12;8(7):e68641.

Kühnlein RP. The contribution of the *Drosophila* model to lipid droplet research. *Prog Lipid Res*. 2011 Oct;50(4):348-56.

Lalonde ME, Avvakumov N, Glass KC, Joncas FH, Saksouk N, Holliday M, Paquet E, Yan K, Tong Q, Klein BJ, Tan S, Yang XJ, Kutateladze TG, Côté J. Exchange of associated factors directs a switch in HBO1 acetyltransferase histone tail specificity. *Genes Dev*. 2013 Sep 15;27(18):2009-24.

Laue K, Daujat S, Crump JG, Plaster N, Roehl HH; Tübingen 2000 Screen Consortium, Kimmel CB, Schneider R, Hammerschmidt M. The multidomain protein Brpf1 binds histones and is required for Hox gene expression and segmental identity. *Development*. 2008 Jun;135(11):1935-46.

Lee CH, Olson P, Evans RM. Minireview: lipid metabolism, metabolic diseases, and peroxisome proliferator-activated receptors. *Endocrinology*. 2003 Jun;144(6):2201-7.

- Lee S, Son H, Lee J, Min K, Choi GJ, Kim JC, Lee YW. Functional analyses of two acetyl coenzyme A synthetases in the ascomycete *Gibberella zeae*. *Eukaryot Cell*. 2011 Aug;10(8):1043-52.
- Lehninger AL, Nelson DL, Cox MM. Principles of biochemistry. Worth Publishers. 1993.
- Liu L, Zhang K, Sandoval H, Yamamoto S, Jaiswal M, Sanz E, Li Z, Hui J, Graham BH, Quintana A, Bellen HJ. Glial lipid droplets and ROS induced by mitochondrial defects promote neurodegeneration. *Cell*. 2015 Jan 15;160(1-2):177-90.
- Liu Y, Lehmann M. A genomic response to the yeast transcription factor GAL4 in *Drosophila*. *Fly (Austin)*. 2008 Mar-Apr;2(2):92-8.
- Luo L, Lee T, Tsai L, Tang G, Jan LY, Jan YN. Genghis Khan (Gek) as a putative effector for *Drosophila* Cdc42 and regulator of actin polymerization. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1997 Nov 25;94(24):12963-8.
- MacDonald VE, Howe LJ. Histone acetylation: where to go and how to get there. *Epigenetics*. 2009 Apr 1;4(3):139-43.
- Magistretti PJ. Neuron-glia metabolic coupling and plasticity. *Exp Physiol*. 2011 Apr;96(4):407-10.
- McNabb SL, Baker JD, Agapite J, Steller H, Riddiford LM, Truman JW. Disruption of a behavioral sequence by targeted death of peptidergic neurons in *Drosophila*. *Neuron*. 1997 Oct;19(4):813-23.
- Merson TD, Dixon MP, Collin C, Rietze RL, Bartlett PF, Thomas T, Voss AK. The transcriptional coactivator Querkopf controls adult neurogenesis. *J Neurosci*. 2006 Nov 1;26(44):11359-70.
- Miller A. The internal anatomy and histology of the imago of *Drosophila melanogaster*. M. Demerec. *Biology of Drosophila*. 1950. 6: 420-534.
- Mirth C, Truman JW, Riddiford LM. The role of the prothoracic gland in determining critical weight for metamorphosis in *Drosophila melanogaster*. *Curr Biol*. 2005 Oct 25;15(20):1796-807.
- Mirth CK, Riddiford LM. Size assessment and growth control: how adult size is determined in insects. *Bioessays*. 2007 Apr;29(4):344-55.
- Moderau N. Untersuchung des rotkehlchen-Phänotyps durch gewebespezifische Missexpression von *enoki mushroom (enok)* in *Drosophila melanogaster*. Diplomarbeit. 2009.
- Nässel DR, Kubrak OI, Liu Y, Luo J, Lushchak OV. Factors that regulate insulin producing cells and their output in *Drosophila*. *Front Physiol*. 2013 Sep 17;4:252.
- Okamoto N, Nakamori R, Murai T, Yamauchi Y, Masuda A, Nishimura T. A secreted decoy of InR antagonizes insulin/IGF signaling to restrict body growth in *Drosophila*. *Genes Dev*. 2013 Jan 1;27(1):87-97.
- Oldham S, Montagne J, Radimerski T, Thomas G, Hafen E. Genetic and biochemical characterization of dTOR, the *Drosophila* homolog of the target of rapamycin. *Genes Dev*. 2000 Nov 1;14(21):2689-94.
- Paine PL, Moore LC, Horowitz SB. Nuclear envelope permeability. *Nature*. 1975 Mar 13;254(5496):109-14.
- Palanker L, Tennessen JM, Lam G, Thummel CS. *Drosophila* HNF4 regulates lipid mobilization and beta-oxidation. *Cell Metab*. 2009 Mar;9(3):228-39.

- Palanker L, Necakov AS, Sampson HM, Ni R, Hu C, Thummel CS, Krause HM. Dynamic regulation of *Drosophila* nuclear receptor activity in vivo. *Development*. 2006 Sep;133(18):3549-62.
- Palm W, Sampaio JL, Brankatschk M, Carvalho M, Mahmoud A, Shevchenko A, Eaton S. Lipoproteins in *Drosophila melanogaster*--assembly, function, and influence on tissue lipid composition. *PLoS Genet*. 2012;8(7):e1002828.
- Papp B, Pál C, Hurst LD. Dosage sensitivity and the evolution of gene families in yeast. *Nature*. 2003 Jul 10;424(6945):194-7.
- Parisi F, Riccardo S, Zola S, Lora C, Grifoni D, Brown LM, Bellosta P. dMyc expression in the fat body affects DILP2 release and increases the expression of the fat desaturase Desat1 resulting in organismal growth. *Dev Biol*. 2013 Jul 1;379(1):64-75.
- Parvy JP, Napal L, Rubin T, Poidevin M, Perrin L, Wicker-Thomas C, Montagne J. *Drosophila melanogaster* Acetyl-CoA-carboxylase sustains a fatty acid-dependent remote signal to waterproof the respiratory system. *PLoS Genet*. 2012;8(8):e1002925.
- Perrimon N, Lanjuin A, Arnold C, Noll E. Zygotic lethal mutations with maternal effect phenotypes in *Drosophila melanogaster*. II. Loci on the second and third chromosomes identified by P-element-induced mutations. *Genetics*. 1996 Dec;144(4):1681-92.
- Qin S, Jin L, Zhang J, Liu L, Ji P, Wu M, Wu J, Shi Y. Recognition of unmodified histone H3 by the first PHD finger of bromodomain-PHD finger protein 2 provides insights into the regulation of histone acetyltransferases monocytic leukemic zinc-finger protein (MOZ) and MOZ-related factor (MORF). *J Biol Chem*. 2011 Oct 21;286(42):36944-55.
- Rajan A, Perrimon N. *Drosophila* cytokine unpaired 2 regulates physiological homeostasis by remotely controlling insulin secretion. *Cell*. 2012 Sep 28;151(1):123-37.
- Rawson RB. The SREBP pathway--insights from Insigs and insects. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2003 Aug;4(8):631-40.
- Reiling JH, Hafen E. The hypoxia-induced paralogs Scylla and Charybdis inhibit growth by down-regulating S6K activity upstream of TSC in *Drosophila*. *Genes Dev*. 2004 Dec 1;18(23):2879-92.
- Richgels PK, Rollmann SM. Genetic variation in odorant receptors contributes to variation in olfactory behavior in a natural population of *Drosophila melanogaster*. *Chem Senses*. 2012 Mar;37(3):229-40.
- Rietze RL, Valcanis H, Brooker GF, Thomas T, Voss AK, Bartlett PF. Purification of a pluripotent neural stem cell from the adult mouse brain. *Nature*. 2001 Aug 16;412(6848):736-9.
- Robertson FW. The ecological genetics of growth in *Drosophila*. 8. Adaptation to a new diet. *Genet Res*. 1966 Oct;8(2):165-79.
- Rodrigues V, Hummel T. Development of the *Drosophila* olfactory system. *Adv Exp Med Biol*. 2008;628:82-101.
- Ruiz-Dubreuil G, Burnet B, Connolly K, Furness P. Larval foraging behaviour and competition in *Drosophila melanogaster*. *Heredity (Edinb)*. 1996 Jan;76 (Pt 1):55-64.
- Sapountzi V, Côté J. MYST-family histone acetyltransferases: beyond chromatin. *Cell Mol Life Sci*. 2011 Apr;68(7):1147-56.

- Schlegel A, Stainier DY. Lessons from "lower" organisms: what worms, flies, and zebrafish can teach us about human energy metabolism. *PLoS Genet.* 2007 Nov; 3(11):e199.
- Schmidt I, Thomas S, Kain P, Risse B, Naffin E, Klämbt C. Kinesin heavy chain function in *Drosophila* glial cells controls neuronal activity. *J Neurosci.* 2012 May 30; 32(22): 7466-76.
- Schmitz F. Klonierung von Flag- und HA-markierten Expressionskonstrukten der putativen Histon Acetyltransferase *enoki mushroom* in *Drosophila melanogaster*. Bachelorarbeit. 2011.
- Scholz H, Deatrick J, Klaes A, Klämbt C. Genetic dissection of *pointed*, a *Drosophila* gene encoding two ETS-related proteins. *Genetics.* 1993 Oct; 135(2): 455-68.
- Schuster-Böckler B, Conrad D, Bateman A. Dosage sensitivity shapes the evolution of copy-number varied regions. *PLoS One.* 2010 Mar 10; 5(3):e9474.
- Scott EK, Lee T, Luo L. *enok* encodes a *Drosophila* putative histone acetyltransferase required for mushroom body neuroblast proliferation. *Curr Biol.* 2001 Jan 23; 11(2): 99-104.
- Scott RC, Schuldiner O, Neufeld TP. Role and regulation of starvation-induced autophagy in the *Drosophila* fat body. *Dev Cell.* 2004 Aug; 7(2): 167-78.
- Seegmiller AC, Dobrosotskaya I, Goldstein JL, Ho YK, Brown MS, Rawson RB. The SREBP pathway in *Drosophila*: regulation by palmitate, not sterols. *Dev Cell.* 2002 Feb; 2(2): 229-38.
- Sheikh BN, Dixon MP, Thomas T, Voss AK. Querkopf is a key marker of self-renewal and multipotency of adult neural stem cells. *J Cell Sci.* 2012 Jan 15; 125(Pt 2): 295-309.
- Shi SP, Qiu JD, Sun XY, Suo SB, Huang SY, Liang RP. PLMLA: prediction of lysine methylation and lysine acetylation by combining multiple features. *Mol Biosyst.* 2012 Apr; 8(5): 1520-7.
- Shin SC, Kim SH, You H, Kim B, Kim AC, Lee KA, Yoon JH, Ryu JH, Lee WJ. *Drosophila* microbiome modulates host developmental and metabolic homeostasis via insulin signaling. *Science.* 2011 Nov 4; 334(6056): 670-4.
- Simpson MA, Deshpande C, Dafou D, Vissers LE, Woollard WJ, Holder SE, Gillessen-Kaesbach G, Derks R, White SM, Cohen-Snuijf R, Kant SG, Hoefsloot LH, Reardon W, Brunner HG, Bongers EM, Trembath RC. De novo mutations of the gene encoding the histone acetyltransferase *KAT6B* cause Genitopatellar syndrome. *Am J Hum Genet.* 2012 Feb 10; 90(2): 290-4.
- Smolenaars MM, Madsen O, Rodenburg KW, Van der Horst DJ. Molecular diversity and evolution of the large lipid transfer protein superfamily. *J Lipid Res.* 2007 Mar; 48(3): 489-502.
- Son H, Lee J, Park AR, Lee YW. ATP citrate lyase is required for normal sexual and asexual development in *Gibberella zeae*. *Fungal Genet Biol.* 2011 Apr; 48(4): 408-17.
- Sousa-Nunes R, Yee LL, Gould AP. Fat cells reactivate quiescent neuroblasts via TOR and glial insulin relays in *Drosophila*. *Nature.* 2011 Mar 24; 471(7339): 508-12.
- Sousa-Nunes R, Cheng LY, Gould AP. Regulating neural proliferation in the *Drosophila* CNS. *Curr Opin Neurobiol.* 2010 Feb; 20(1): 50-7.
- Southall TD, Gold KS, Egger B, Davidson CM, Caygill EE, Marshall OJ, Brand AH. Cell-type-specific profiling of gene expression and chromatin binding without cell isolation: assaying RNA Pol II occupancy in neural stem cells. *Dev Cell.* 2013 Jul 15; 26(1): 101-12.
- Stanger BZ. Organ size determination and the limits of regulation. *Cell Cycle.* 2008 Feb 1; 7(3): 318-24.

- Steinmetz LM, Scharfe C, Deutschbauer AM, Mokranjac D, Herman ZS, Jones T, Chu AM, Giaever G, Prokisch H, Oefner PJ, Davis RW. Systematic screen for human disease genes in yeast. *Nat Genet.* 2002 Aug; 31(4):400-4.
- Storelli G, Defaye A, Erkosar B, Hols P, Royet J, Leulier F. *Lactobacillus plantarum* promotes *Drosophila* systemic growth by modulating hormonal signals through TOR-dependent nutrient sensing. *Cell Metab.* 2011 Sep 7; 14(3):403-14.
- Stork T, Engelen D, Krudewig A, Silies M, Bainton RJ, Klämbt C. Organization and function of the blood-brain barrier in *Drosophila*. *J Neurosci.* 2008 Jan 16; 28(3):587-97.
- Strübbe G, Popp C, Schmidt A, Pauli A, Ringrose L, Beisel C, Paro R. Polycomb purification by in vivo biotinylation tagging reveals cohesin and Trithorax group proteins as interaction partners. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2011 Apr 5; 108(14):5572-7.
- Takahashi H, McCaffery JM, Irizarry RA, Boeke JD. Nucleocytosolic acetyl-coenzyme a synthetase is required for histone acetylation and global transcription. *Mol Cell.* 2006 Jul 21; 23(2):207-17.
- Tasdemir-Yilmaz OE, Freeman MR. Astrocytes engage unique molecular programs to engulf pruned neuronal debris from distinct subsets of neurons. *Genes Dev.* 2014 Jan 1; 28(1):20-33.
- Teleman AA. Privileged signaling for brain growth. *Cell.* 2011 Aug 5; 146(3):346-7.
- Teleman AA. Molecular mechanisms of metabolic regulation by insulin in *Drosophila*. *Biochem J.* 2009 Dec 14; 425(1):13-26.
- Teleman AA, Chen YW, Cohen SM. 4E-BP functions as a metabolic brake used under stress conditions but not during normal growth. *Genes Dev.* 2005 Aug 15; 19(16):1844-8.
- Tennessen JM, Thummel CS. Coordinating growth and maturation - insights from *Drosophila*. *Curr Biol.* 2011 Sep 27; 21(18):R750-7.
- Theopold U, Ekengren S, Hultmark D. HLH106, a *Drosophila* transcription factor with similarity to the vertebrate sterol responsive element binding protein. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1996 Feb 6; 93(3):1195-9.
- Thomas T, Voss AK, Chowdhury K, Gruss P. Querkopf, a MYST family histone acetyltransferase, is required for normal cerebral cortex development. *Development.* 2000 Jun; 127(12):2537-48.
- Ullah M, Pelletier N, Xiao L, Zhao SP, Wang K, Degerny C, Tahmasebi S, Cayrou C, Doyon Y, Goh SL, Champagne N, Côté J, Yang XJ. Molecular architecture of quartet MOZ/MORF histone acetyltransferase complexes. *Mol Cell Biol.* 2008 Nov; 28(22):6828-43.
- Voie, A M, and S Cohen. Germ-Line Transformation of *Drosophila Melanogaster*. *Cell biology. A laboratory handbook.* 2nd ed. 3 1998. 510–517.
- Vosshall LB, Stocker RF. Molecular architecture of smell and taste in *Drosophila*. *Annu Rev Neurosci.* 2007; 30:505-33.
- Wang J, Rao S, Chu J, Shen X, Levasseur DN, Theunissen TW, Orkin SH. A protein interaction network for pluripotency of embryonic stem cells. *Nature.* 2006 Nov 16; 444(7117):364-8.
- Wang L, Anderson DJ. Identification of an aggression-promoting pheromone and its receptor neurons in *Drosophila*. *Nature.* 2010 Jan 14; 463(7278):227-31.

- Wellen KE, Hatzivassiliou G, Sachdeva UM, Bui TV, Cross JR, Thompson CB. ATP-citrate lyase links cellular metabolism to histone acetylation. *Science*. 2009 May 22; 324(5930):1076-80.
- Wu Q, Zhao Z, Shen P. Regulation of aversion to noxious food by *Drosophila* neuropeptide Y- and insulin-like systems. *Nat Neurosci*. 2005 Oct; 8(10):1350-5.
- Xin T, Xuan T, Tan J, Li M, Zhao G, Li M. The *Drosophila* putative histone acetyltransferase Enok maintains female germline stem cells through regulating Bruno and the niche. *Dev Biol*. 2013 Dec 1; 384(1):1-12.
- Yang C, Wu J, Sinha SH, Neveu JM, Zheng YG. Autoacetylation of the MYST lysine acetyltransferase MOF protein. *J Biol Chem*. 2012 Oct 12; 287(42):34917-26.
- Yang XJ, Ullah M. MOZ and MORF, two large MYSTic HATs in normal and cancer stem cells. *Oncogene*. 2007 Aug 13; 26(37):5408-19.
- Yang XJ. The diverse superfamily of lysine acetyltransferases and their roles in leukemia and other diseases. *Nucleic Acids Res*. 2004 Feb 11; 32(3):959-76. Print 2004.
- Yu S, Rao S, Reddy JK. Peroxisome proliferator-activated receptors, fatty acid oxidation, steatohepatitis and hepatocarcinogenesis. *Curr Mol Med*. 2003 Sep; 3(6):561-72.
- Zhang H, Stallock JP, Ng JC, Reinhard C, Neufeld TP. Regulation of cellular growth by the *Drosophila* target of rapamycin dTOR. *Genes Dev*. 2000 Nov 1; 14(21):2712-24.
- Zhang W, Thompson BJ, Hietakangas V, Cohen SM. MAPK/ERK signaling regulates insulin sensitivity to control glucose metabolism in *Drosophila*. *PLoS Genet*. 2011 Dec; 7(12):e1002429.
- Zhang Y, Proenca R, Maffei M, Barone M, Leopold L, Friedman JM. Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature*. 1994 Dec 1; 372(6505):425-32.
- Zhao B, Tumaneng K, Guan KL. The Hippo pathway in organ size control, tissue regeneration and stem cell self-renewal. *Nat Cell Biol*. 2011 Aug 1; 13(8):877-83.
- Zhao S, Xu W, Jiang W, Yu W, Lin Y, Zhang T, Yao J, Zhou L, Zeng Y, Li H, Li Y, Shi J, An W, Hancock SM, He F, Qin L, Chin J, Yang P, Chen X, Lei Q, Xiong Y, Guan KL. Regulation of cellular metabolism by protein lysine acetylation. *Science*. 2010 Feb 19; 327(5968):1000-4.
- Zinke I, Schütz CS, Katzenberger JD, Bauer M, Pankratz MJ. Nutrient control of gene expression in *Drosophila*: microarray analysis of starvation and sugar-dependent response. *EMBO J*. 2002 Nov 15; 21(22):6162-73.
- Zinke I. enoki mushroom, ein Histon-Acetyltransferase-Homolog, ist an der Regulation der Nahrungsaufnahme und Wachstum in *Drosophila melanogaster* (Meigen) beteiligt. Dissertation. 2003.

6. Abkürzungsverzeichnis

4ebp	eukaryotischer Initiationsfaktor 4E-Bindeprotein
Abb	Abbildung
ac	actetyliert
AcCoAs	Acetyl-CoA Synthetase
AK	Antikörper
Amp	Ampicillin
ApoLPP	Apolipophorin
AS	Aminosäure
ATPCL	ATP-Citrat-Lyase
B	Blindschläuche des Magens
bmm	Brummer
BRPF	bromodomain plant homeodomain (PHD) finger
C	Grad Celsius
c	Konzentration
cad	caudal
cDNA	complimentary DNA
CDS	coding sequence
CNBr	Cyanogenbromid
CPTI	Acyl-Carnitin/Carnitin-Antiporter
DAPI	4',6-Diamidino-2-Phenylindol
Dilp	Drosophila insulin-like peptide
dl	dorsal
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
dsRNA	doppelsträngige RNA
EAF6	homolog of Esa1-associated factor 6
EcR	Ecdysonrezeptoren
egm	enigma
enok	enoki mushroom
et al	et alii
eYFP	enhanced Yellow Fluorescent Protein
F	Fettkörper
FMRP	Fragile X Mental Retardation 1 Protein
g	Gramm
gek	genghis khan
GFP	green fluorescent protein
GL	Glomeruli
GMZ	Ganglion-Mutterzellen
H	Hemisphäre
h	Stunde (hour)
HA	Hemagglutinin

HAT	Histon-Acetyltransferase
hs	Hitzeschock
IGF	insulin-like growth factors
ImpL2	imaginal morphogenesis-protein-late 2
ING5	inhibitor of growth 5
InR	Insulin Rezeptor
IPZ	Insulin-produzierende Zelle
IS	Insulinsignalweg
JAK	Janus Kinase
K	Lysin
KAT6B	Lysin/K-Acetyltransferase6B
KZ	Kenyon-Zellen
l	Liter
L1	erstes Larvalstadium
L2	zweites Larvalstadium
L3	drittes Larvalstadium
LAL	larvalen Antennalloben
LB	Luria-Bertani-Medium
LDL	Lipoprotein low-density lipoprotein
LH	laterals Horn
Lip3	Lipase3
Lip4	Lipase4
LPP	Lipophorin
LpR	Lipoprotein Rezeptor
M	Molar (mol/l)
Med	Medea
Mh	Mundhaken
mitoGFP	mitochondriellen-GFPs
ml	Milliliter
MORF	monocytic leukemia zinc-finger protein (MOZ)-related factor
<u>MOZ</u>	monocytic leukaemia zinc finger protein
mRNA	Boten-RNA
Mtp α	Mitochondrial trifunctional protein α subunit
MYST	MOZ, YBF2/SAS3, TIP60
n	Nano
nE	nach Eiablage
NEMM	<u>N</u> -terminale Region in <u>E</u> nok, <u>MOZ</u> oder <u>MORF</u>
NLS	Nuclear localisation sequenses
NSZ	neuronalen Stammzellen
ORN	olfaktorischen Rezeptorneurone
p	phosphoryliert
PCR	Polymerase-Ketten-Reaktion
PFA	Paraformaldehyd

pH	Negativ dekadischer Logarithmus der Wasserstoffkonzentration
PHD	plant homeodomain
PI3K	Phosphoinositol 3 Kinase
Pk	Pilzkörper
PN	Projektionsneuron
pnurps	putative nutrition reservoir proteins
Qkf	Querkopf
qPCR	quantitativen PCR
Repo	reverse polarity
RNA	Ribonukleinsäure
RNAi	RNA Interferenz
S	Serin
S6K	S6 Kinase
SAGA	Apt-Ada-Gcn5-Acetyltransferase
SAS3	something about silencing
SDR	secreted decoy of InR
sens	sensless
SOG	suboesophageales Ganglion
STAT	Signal Transductor and Activator of Transcription
sug	sugerbabe
SVZ	der Subventrikularen Zone
TAG	Triglycerid
Th	Tyrosinhydroxylase
TIP60	tat-interactive protein, 60 kDa
TOR	Target of Rapamycin
twi	Twist
UAS	upstream activating sequence
Upd2	Unpaired 2
UTR	Untranslated Region
VDRC	Vienna Drosophila RNAi Center
VLCFA	very long chain fatty acid
VNS	ventrale Nervensystem
whd	withered
ZNS	zentrales Nervensystem
μ	Mikro

7. Anhang

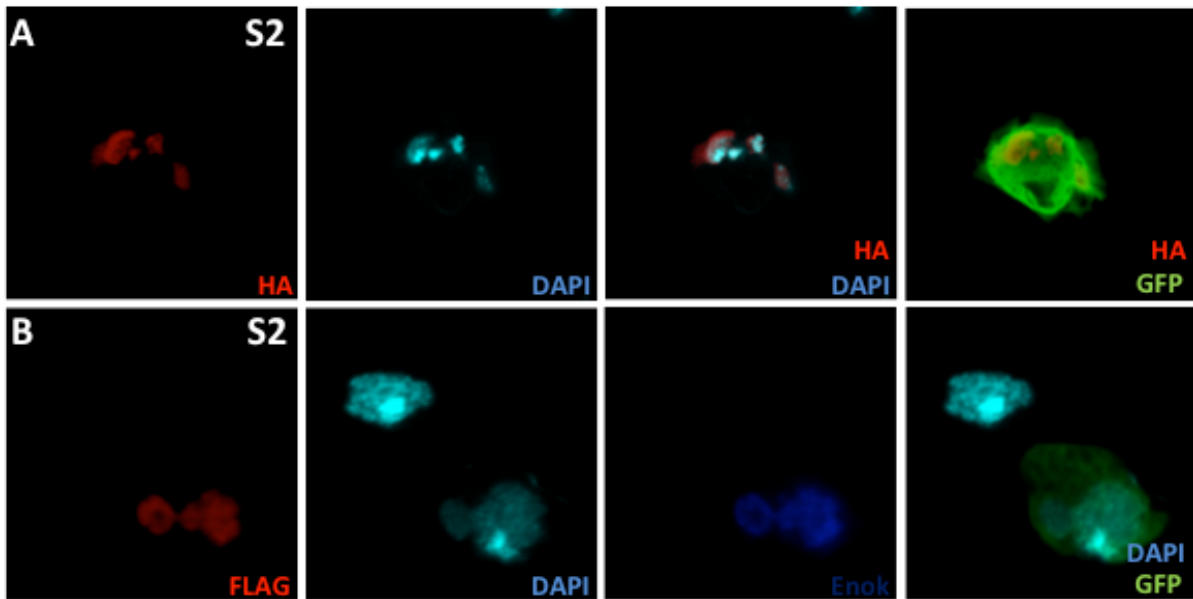


Abbildung 7.1: Analyse des pUAST-attB-HA-Enok-FLAG Konstruktes in S2 Zellen.

UAS-Ne.GFP (grün) wurde als Kontrolle für die Transfektionseffizienz genutzt. DAPI (cyan) ist ein Kernlokalisationsmarker. (A) Die spezifische Färbung gegen den HA-Tag (rot) zeigt eine Kernlokalisierung. (B) Die spezifische Färbung gegen den FLAG-Tag (rot) sowie gegen Enok (blau) zeigt eine Kernlokalisierung. Primäre Antikörper: (A) rat α -HA; chicken α -GFP (B) mouse α -FLAG; rat α -Enok; chicken α -GFP

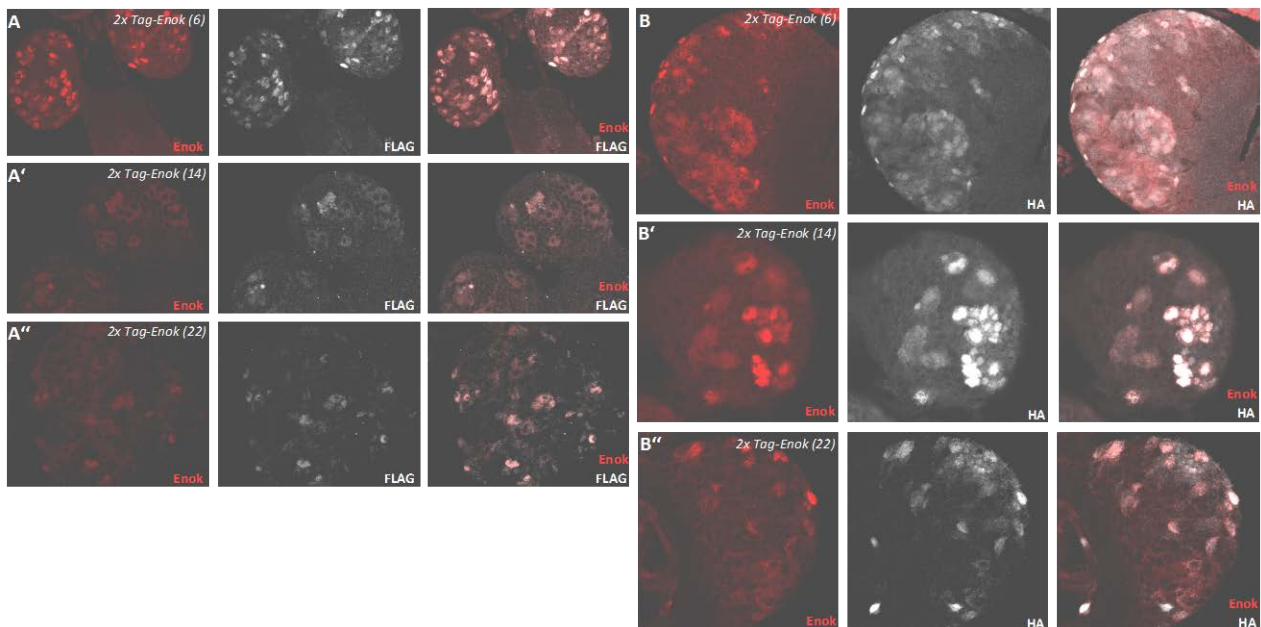


Abbildung 7.2: Expression des getaggtten Enok-Konstrukts in Gewebe.

(A-A'') und (B-B'') α -Enok Antikörper (rot) zeigen das überexprimierte Enok Signal in verschiedenen unabhängigen transgenen Fliegenlinien. Die Nummer in der Klammer bezeichnet die Nummer der transgenen Linie. (A-A'') zeigt α -Enok Antikörper (rot) und die vollständige Überlagerung des α -FLAG Antikörper (weiß). (B-B'') α -Enok Antikörper zeigt das Enok Signal. Überlagerung mit HA-Signal (weiß) ist nur in der Mutterzelle zu sehen. Die Tochterzellen zeigen nur das HA-Signal. Primäre Antikörper: (A-A'') rat α -Enok; mouse α -FLAG; (B-B'') rat α -Enok; rabbit α -HA.

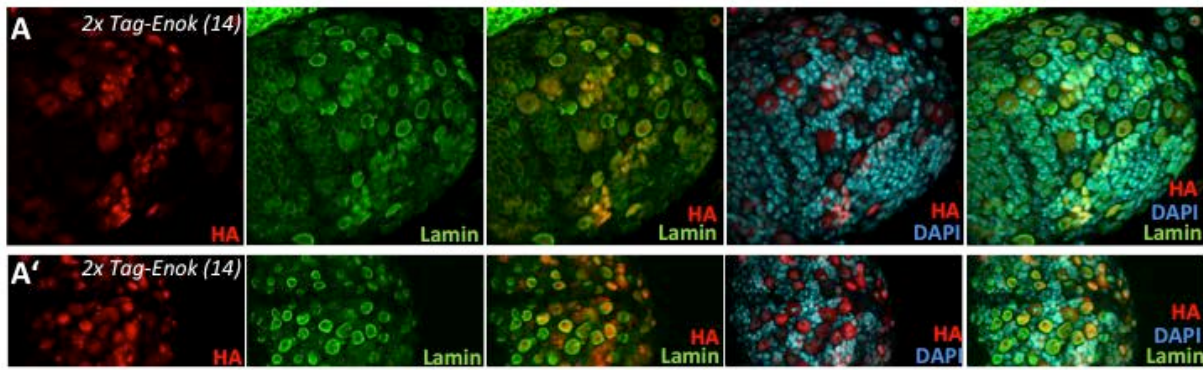


Abbildung 7.3: Detektion der Lokalisation des getaggtten Enok-Proteins im Gewebe.

(A,A') zeigen zwei zusätzliche Färbungen mit α -HA Antikörper (rot) und damit die Expression des Konstrukts pUAST-attB-HA-Enok-FLAG./2xTag-Enok (14). α -Lamin Antikörper (grün) detektiert die Kernhülle und trennt das Zytoplasma von dem Kerninneren. 2xTag-Enok wird im Kerninneren exprimiert. Das Signal ist nur zu sehen, wo das Chromatin aufgelockert ist und sich nicht mit DAPI (cyan) überlagert. Primäre Antikörper: rabbit α -HA; mouse α -Lamin

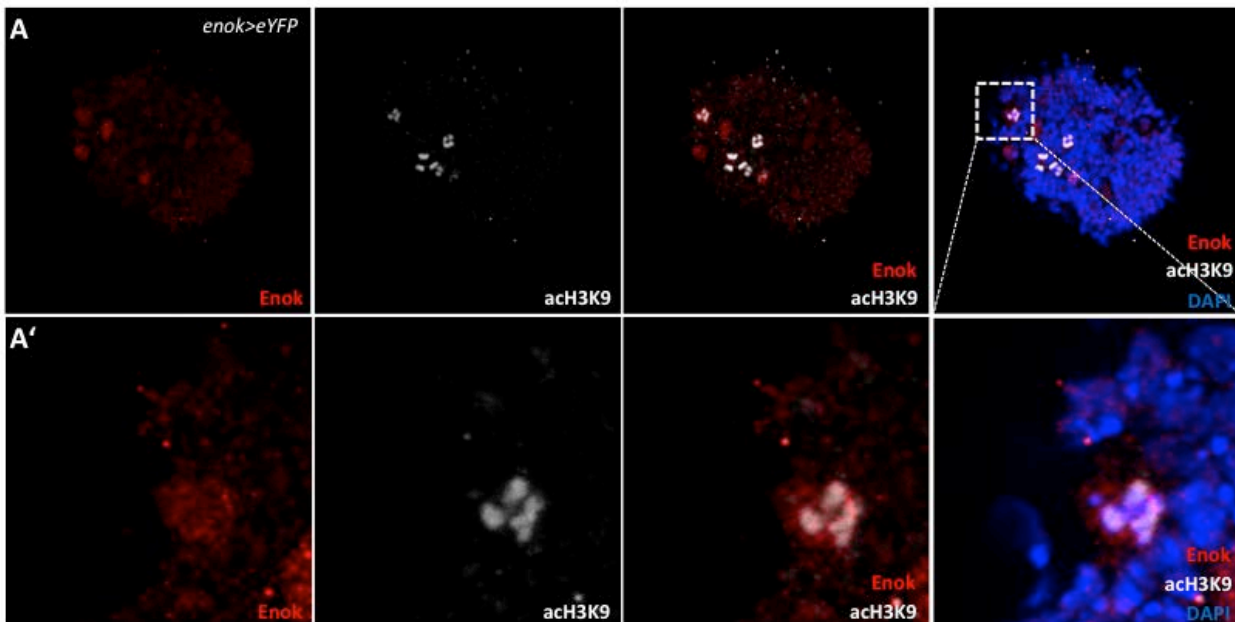


Abbildung 7.4: Kolokalisation von Enok mit einem Histon Marker.

Genetischer Hintergrund *enok>eYFP*. (A) Kolokalisation von Enok (rot) mit acetyliertem Histon3 Lysin9 (acH3K9) (weiß). Geringe Kolokalisation ist in den Neuroblasten zu sehen. (A') Detailabbildung einer positiven Zelle für Enok und acH3K9. Chromatin ist mit DAPI (blau) gefärbt und ist kondensiert, keine transkriptionelle Aktivität. Primäre Antikörper: (A-A') rat α -Enok; mouse α -acH3K9.

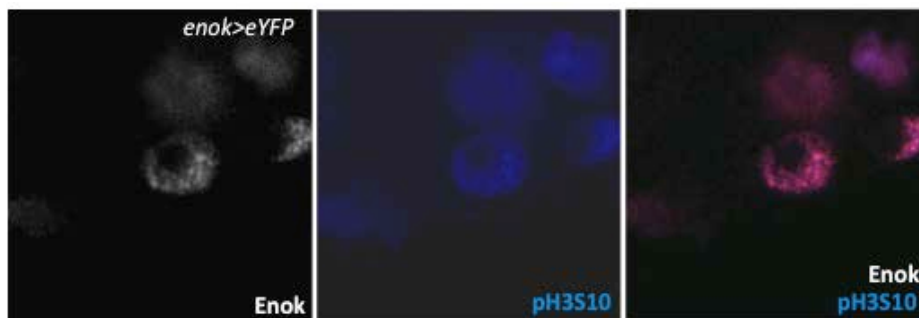


Abbildung 7.5: Kolokalisation von Enok mit transkriptionellem und mitotischem Marker.

Genetischer Hintergrund *enok>eYFP*. Hochauflösende Aufnahme mit einem STED Mikroskop. Enok (weiß) ist kolokalisiert mit phosphoHiston3Serin10 (pH3S10) (blau). Die Doppelfärbung ist in Neuroblasten zu sehen. rat α -Enok; rabbit α -pH3S10

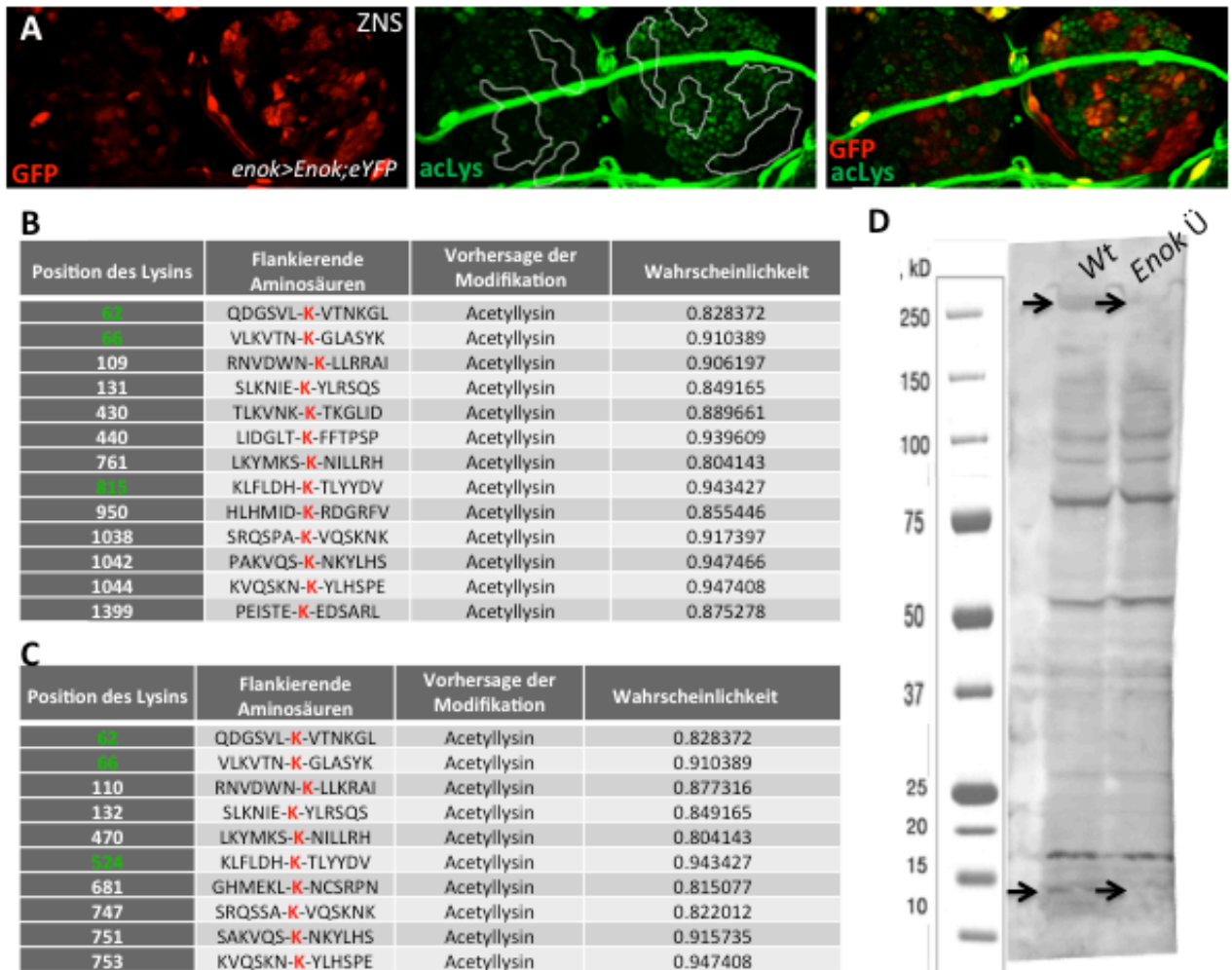


Abbildung 7.6: Acetylierungsaktivität und Konservierung der putativen Autoacetylierungsstellen von Enok

(A) Analysen der Überexpression von Enok im zentralen Nervensystem mit der Überexpressions-Linie *UAS-Enok; eYFP* unter der Kontrolle des Enok-Promotors. Die globale Acetylierung wird mit dem α -acLysin Antikörper (grün) detektiert. Enok-Überexpressionsbereiche werden durch GFP (rot) markiert. Die Bereiche, die Enok überexprimieren, zeigen ein schwächeres α -acLysin Signal.

(B,C) Die putativen Selbstacetylierungsstellen des MORF Proteins (B) und Querkopf Proteins (C). *In silico* Analyse wurde mit dem PLMLA-Vorhersageprogramm durchgeführt. Es sagt die Lysinmethylierungs- und Lysinacetylierungs-Stellen vorher (Shi et al., 2012). Die grün markierten Stellen sind konserviert von Mensch bis *Drosophila*. (D) Western Blot Analyse der Acetylierung des gesamten Proteoms wurde mit dem α -acLys Antikörper durchgeführt. Primäre Antikörper: (A,D) rabbit α -acLys; (A) rat α -Enok. *ZNS*, zentrales Nervensystem; *Ü*, Überexpression; *Wt*, Wildtyp

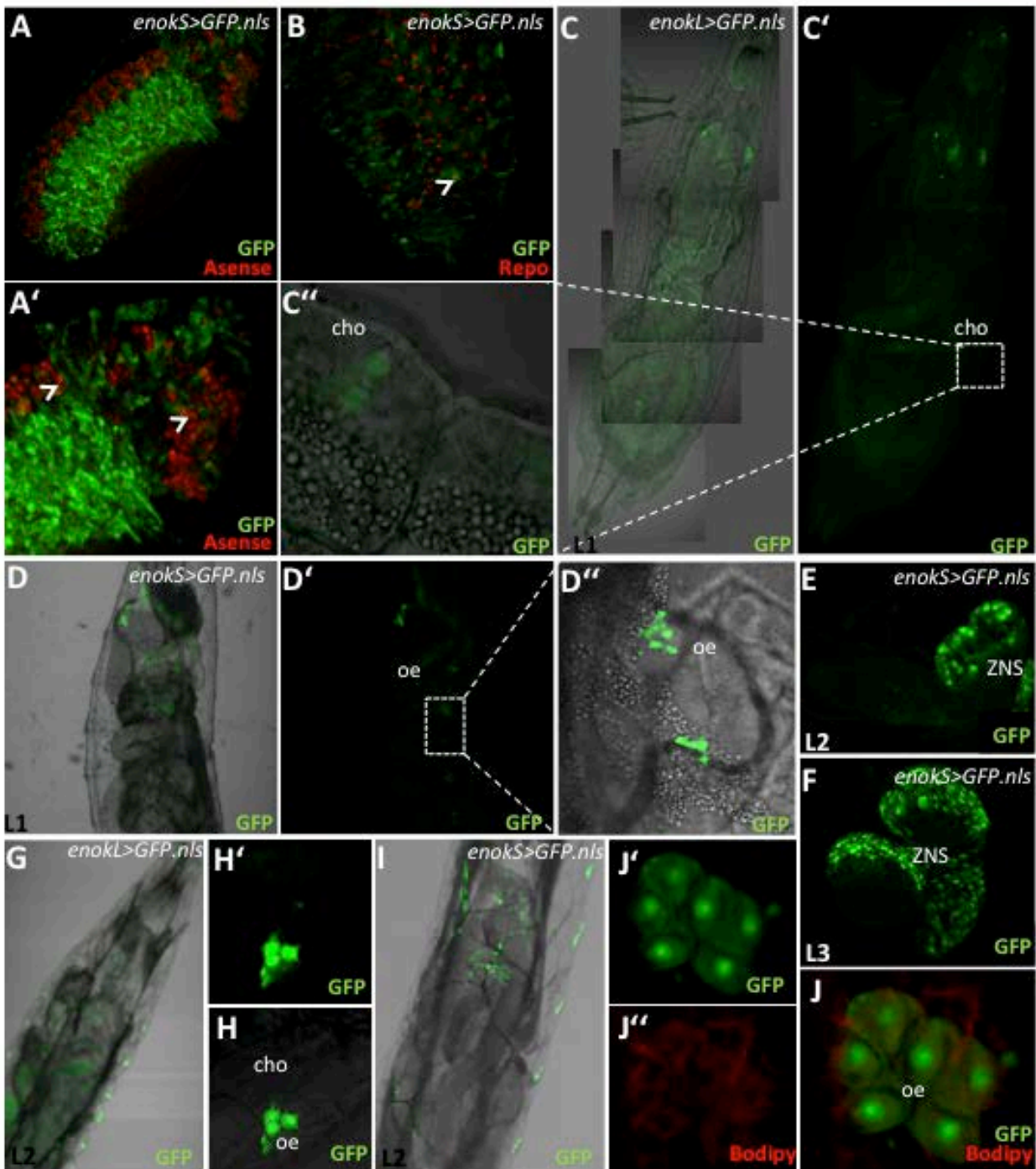


Abbildung 7.7: *enok*-Promotoranalysen in Embryonen und Larven.

In der Promotorstudie wurde die Expression mit Hilfe des GFP-Responders *UAS-GFP.nls* analysiert, welcher entweder unter der Kontrolle des *enokL*-Promotors (C-C', G, H-H') oder des *enokS*-Promotors (A-B', D-F, I-J') stand. Beide Konstrukte zeigen eine ubiquitäre Expression (grün) im Embryo (A, A', B,). Panglia-Marker Repo (rot) zeigt eine Überlagerung im zentralen Nervensystem mit GFP-Färbung des *enokS*-Promotors (B: Pfeilspitzen). Neuroblastmarker Asense (rot) zeigte eine Überlappung mit dem GFP-Signal unter der Kontrolle des *enokS*-Promotors (A': Pfeilspitzen). (C-C') Expressionsmuster der *enokL-Gal4* der L1 (erstes Larvalstadium) Larven *in vivo*. GFP-Signal ist im Fettkörper, im Darm, im zentralen Nervensystem (ZNS) und im Chordotonalorgan (cho) zu sehen. (D-D') Expressionsmuster der *enokS-Gal4* der L1 Larven *in vivo*. GFP-Signal ist im Fettkörper, im Darm, im ZNS und in den Oenozyten (oe) zu sehen. Ab L2 (zweites Larvalstadium) findet eine Reduktion des Expressionsmuster statt (*in vivo*). (E, F, I-J') Expression von GFP durch *enokS-Gal4* im ZNS in L2 (E) und L3 (F) und in den Oenozyten (I-J'). Oenozyten wurden mit einer Bodipy Färbung (rot) verifiziert. (G-H') Expression der *enokL-Gal4* im Chordotonalorgan und in den Oenozyten. Primäre Antikörper: (A-B') rat α -Enok; (B) mouse α -Repo; (A-A') rabbit α -Asense.

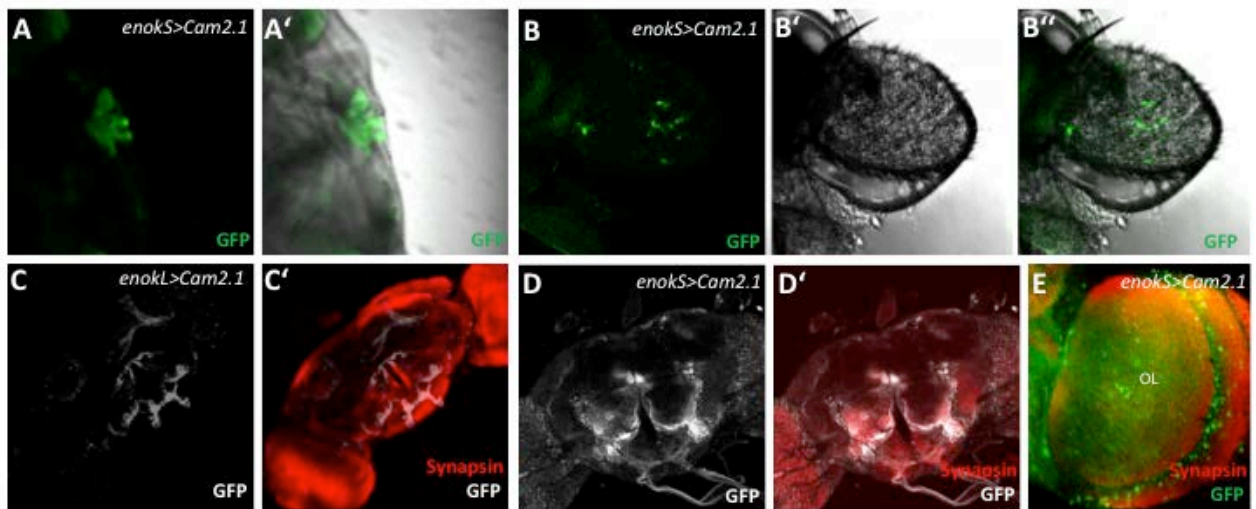


Abbildung 7.8: *enok*-Promotoranalysen in adulten Tieren.

In den adulten Tieren wurde das Expressionsmuster mit Hilfe des GFP-Responders *UAS-Cam2.1* unter der Kontrolle des *enokL*-oder des *enokS*-Promotors untersucht. *In vivo* Aufnahmen des Abdomens zeigt, dass der *enokS*-Promotor dort nur in den Oenozyten aktiv ist. (A-A'). (B-B'') *In vivo* Aufnahme der Antenne. Das dritte Segment zeigt eine Expression von GFP unter der Kontrolle des *enokS*-Promotors. (C,C',D,D') Beide Gal4-Linien zeigen das gleiche Expressionsmuster im adulten ZNS. Zur Hilfe der Lokalisation wurde Synapsin als Hintergrundmarker angefärbt (rot). (E) Expression im visuellen System. In Zellkörpern der Medulla des optischen Lobus (OL) wurde GFP-Signal detektiert. Primäre Antikörper: (C-F) chicken α -GFP; (C',D',F) mouse α -Synapsin.



Abbildung 7.9: *gek*-Promotoranalysen.

Das Expressionsmuster der *gek-Gal4* Linie wurde mit dem Responder *UAS-Cam2.1* sichtbar gemacht. Das GFP-Signal wurde *in vivo* untersucht. (A-A') Im ZNS waren nur postmitotische, Elav-positive Zellen (rot) GFP-positiv. Keine Übereinstimmung mit dem *enok-Gal4* Expressionsmuster. (B-B') Das GFP-Signal in der Körperwand wurde nur in den Muskeln detektiert und war weder in den Oenozyten noch in dem Chordotonalorgan sichtbar. Primäre Antikörper: (C-C') chicken α -GFP; (C') mouse α -Elav.

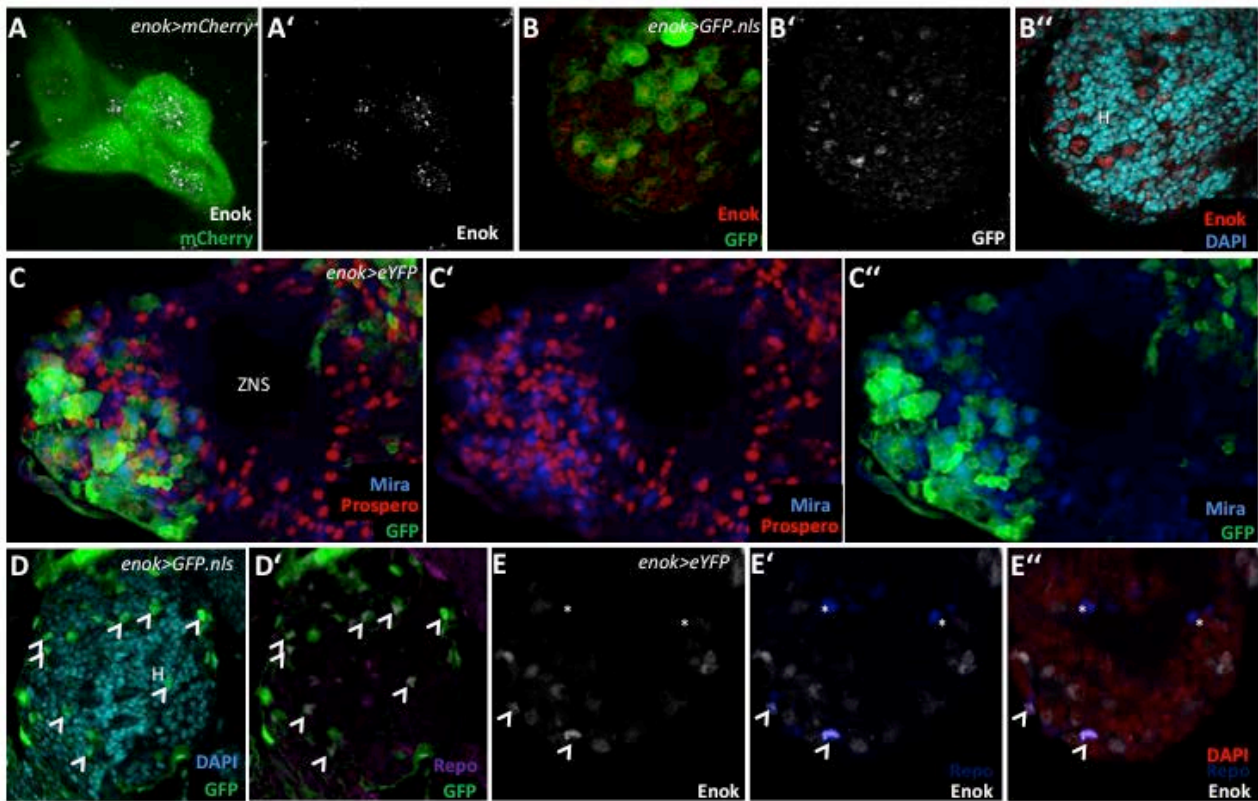
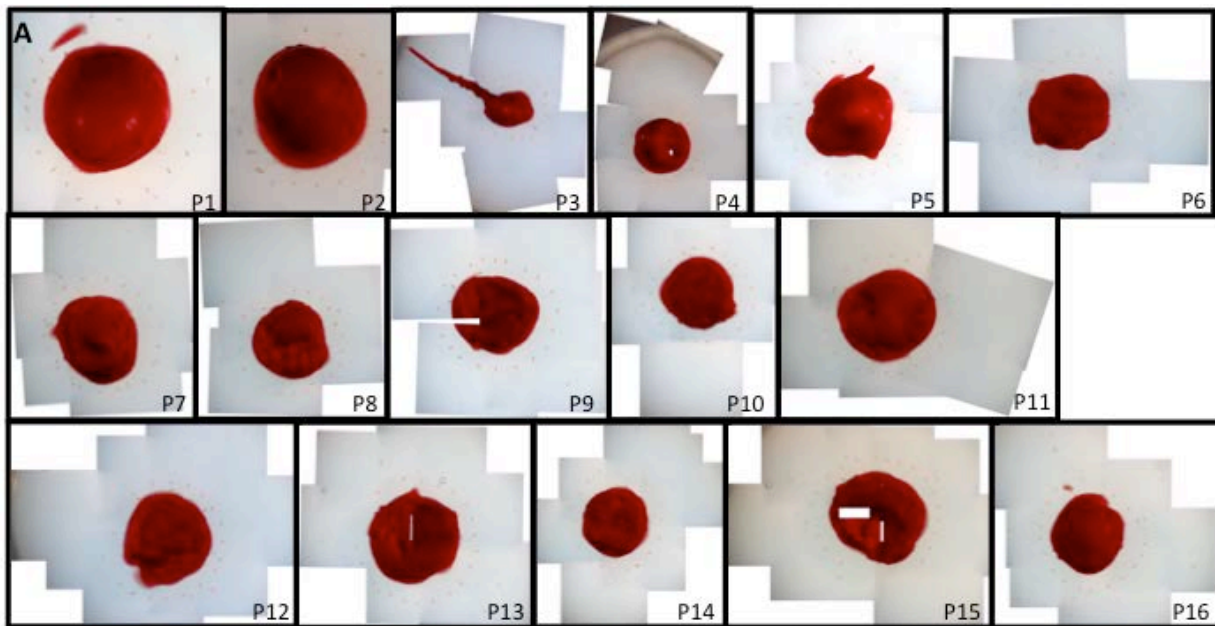


Abbildung 7.10: Verifizierung und Charakterisierung des *enok-Gal4* Expressionsmusters.

(A-A') Enok Proteinsignal (weiß) in den Oenozyten stimmt mit dem *enok*-Promotorsignal (mCherry, grün) überein. (B-B') In ZNS überlagert sich das Signal des *enok*-Promotors (GFP, grün) ebenfalls mit dem Signal des α -Enok Antikörpers (B': weiß, B'': rot). (B'') Zudem wurden mit Hilfe von DAPI (cyan) die Lokalisation des endogenen Enok Proteins im Kern bestätigt, und die Enok-positiven Zellen wurden als Neuroblasten identifiziert. (C-C') Gegenfärbungen mit Markerproteinen bestätigten diese Annahme. Miranda (Mira, blau) als Neuroblastenmarker zeigte eine Überlagerung mit dem GFP-Signal (grün) in den Neuroblasten. Die Ganglion-Mutterzellen, die durch Prospero markiert wurden (rot) zeigten keine Co-Färbung mit dem GFP-Signal. (D-D') Neben den Neuroblasten wurde das GFP-Signal (grün) in Repo-positiven Zellen (D', magenta), den Glia Zellen, detektiert. (E-E') Nicht alle Repo-positiven Zellen (blau) waren Enok-positiv (weiß). Mit Pfeilspitzen markierte Zellen zeigten beide Signale. Mit einem Stern markierte Zellen waren nur Repo-positiv. Enok-positive Glia Zelle gehören einer Subpopulation an. Primäre Antikörper: (A,A', B-B'', E-E'') rat α -Enok; (B,C,C'', D,D') chicken α -GFP; (C-C') mouse α -Prospero; (C-C'') rabbit α -Mira; (D', E',E'') mouse α -Repo. H, Hemisphäre; ZNS, zentrales Nervensystem.



Berechnung des Wanderverhaltens

geschlüpft	Kontakt zur Hefe	ausserhalb der Hefe	Wanderverhalten %	Median	SD	Student's t-Test
14	11	8	72,73	72,73	20,39	1,51745E-06
16	14	7	50,00			
18	11	11	100,00			
18	13	11	84,62			
18	12	10	83,33			
19	14	9	64,29			
16	12	10	83,33			
19	14	9	64,29			
19	15	7	46,67			
18	13	9	69,23			
16	13	7	53,85			
18	11	11	100,00			
18	14	4	28,57			
20	15	11	73,33			
18	11	11	100,00			
14	11	8	72,73			

Berechnung des enok Phänotyps

geschlüpft	Kontakt zur Hefe	Phänotyp	Phänotyp in %	Median	SD	Student's t-Test
14	11	9	81,8	75,96	11,36	1,52289E-06
16	14	11	78,6			
18	11	9	81,8			
18	13	7	53,8			
18	12	9	75,0			
19	14	10	71,4			
16	12	7	58,3			
19	14	11	78,6			
19	15	13	86,7			
18	13	10	76,9			
16	13	8	61,5			
18	11	8	72,7			
18	14	10	71,4			
20	15	10	66,7			
18	11	11	100,0			
14	11	9	81,8			

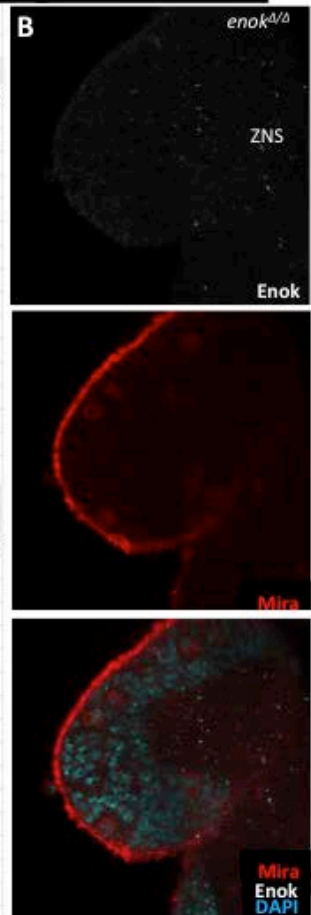
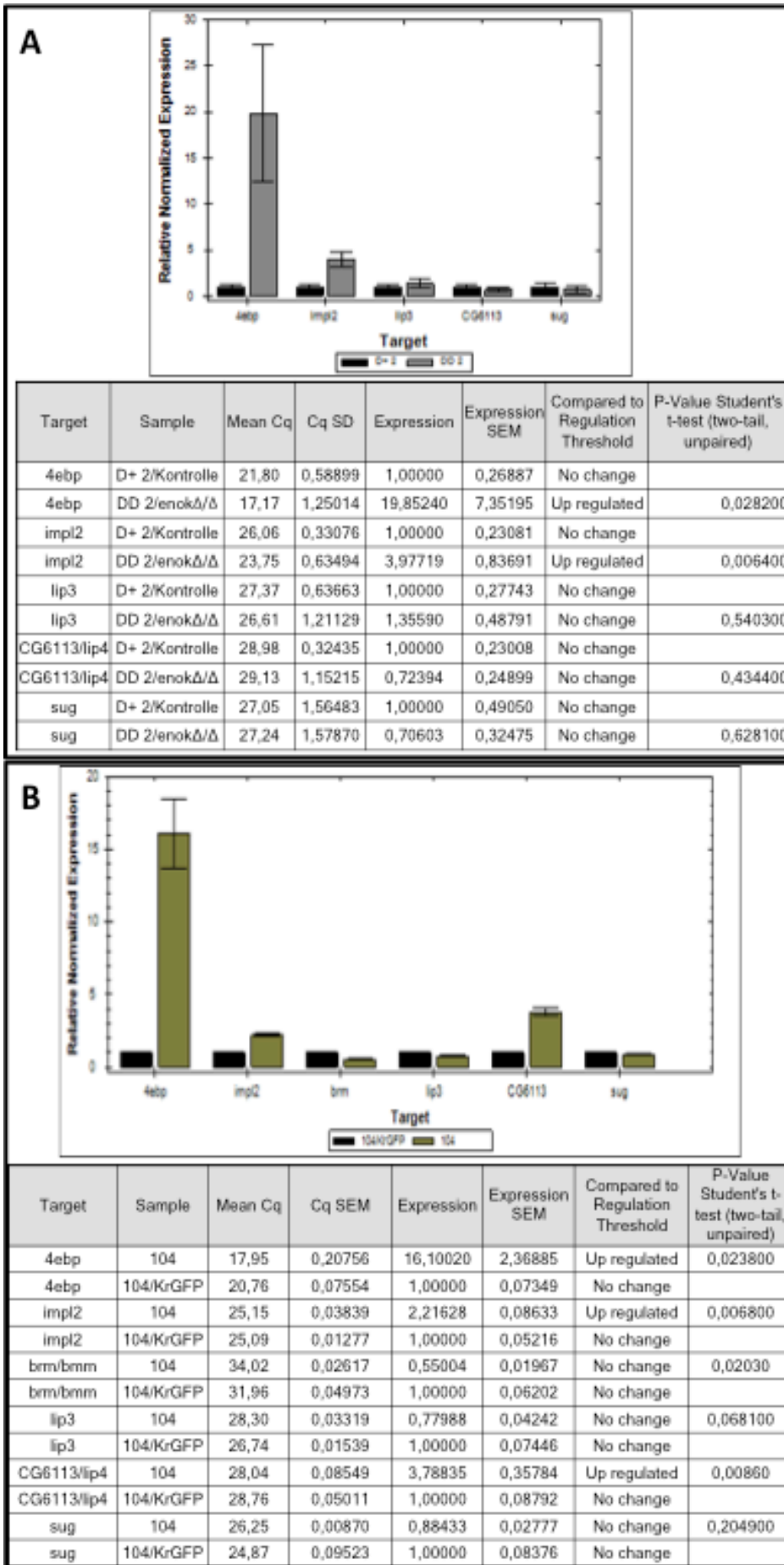


Abbildung 7.11: Phänotypische Beschreibung der Mutanten $enok^{\Delta/\Delta}$ und $enok^{104}$.

(A) 16 unabhängige Experimente zeigen 16 Platte, die eine Momentaufnahme der Larvenaufenthaltsorte (Punkte) außerhalb der Hefe (rot) auf der Apfelsaftagarplatte nach 28h nE zeigen. In den Tabellen ist die jeweilige statistische Auswertung des Wanderverhaltens der $enok^{\Delta/\Delta}$ -Mutante oder des enok-Phänotypen zusammengefasst. Das Balkendiagramm ist in der Abbildung 3.13B dargestellt. (B) Die $enok^{104}$ -Mutante zeigt kein Enok Protein Signal (weiß) mehr im ZNS. Enok konnte nicht mehr in Neuroblasten (Mira-positiven Zellen) detektiert werden. Primäre Antikörper: (B) rat α -Enok; rabbit α -Mira. ZNS, zentrales Nervensystem.

Abbildung 7.12:
Transkriptionelle
Analyse der
Mutanten *enok*^{Δ/Δ}
und *enok*¹⁰⁴.

(A,B) Transkriptionelle Analyse des Wachstumsarrests und der Hungermarker in *enok*^{Δ/Δ}-Mutanten (A) und *enok*¹⁰⁴-Mutanten (B) im Vergleich zu der entsprechenden heterozygoten Kontrolle. Die transkriptionelle Analyse wurde 7h nE durchgeführt. Die Balkendiagramme sind die Originaldiagramme (Rohdaten), die von der Bio Rad Software abgebildet wurden. Die Genotypene und die Gennamen wurden in den statistischen Auswertungen angeglichen. Die Tabellen enthalten jeweils die entsprechenden Level der Expression. Die Signifikanz wurde mittels des Student's T-Test bestimmt. Fehlerbalken repräsentieren standard error of the mean (SEM). n=4. *4ebp*, eukaryotischer Initiationsfaktor 4E-Bindeprotein; *bmm*, *brm*, Brummer; *ImpL2*, *Imaginal morphogenesis protein-Late 2*; *Lip3*, *Lipase3*; *Lip4/CG6113*, *Lipase4*; *sug*, *sugarbabe*.



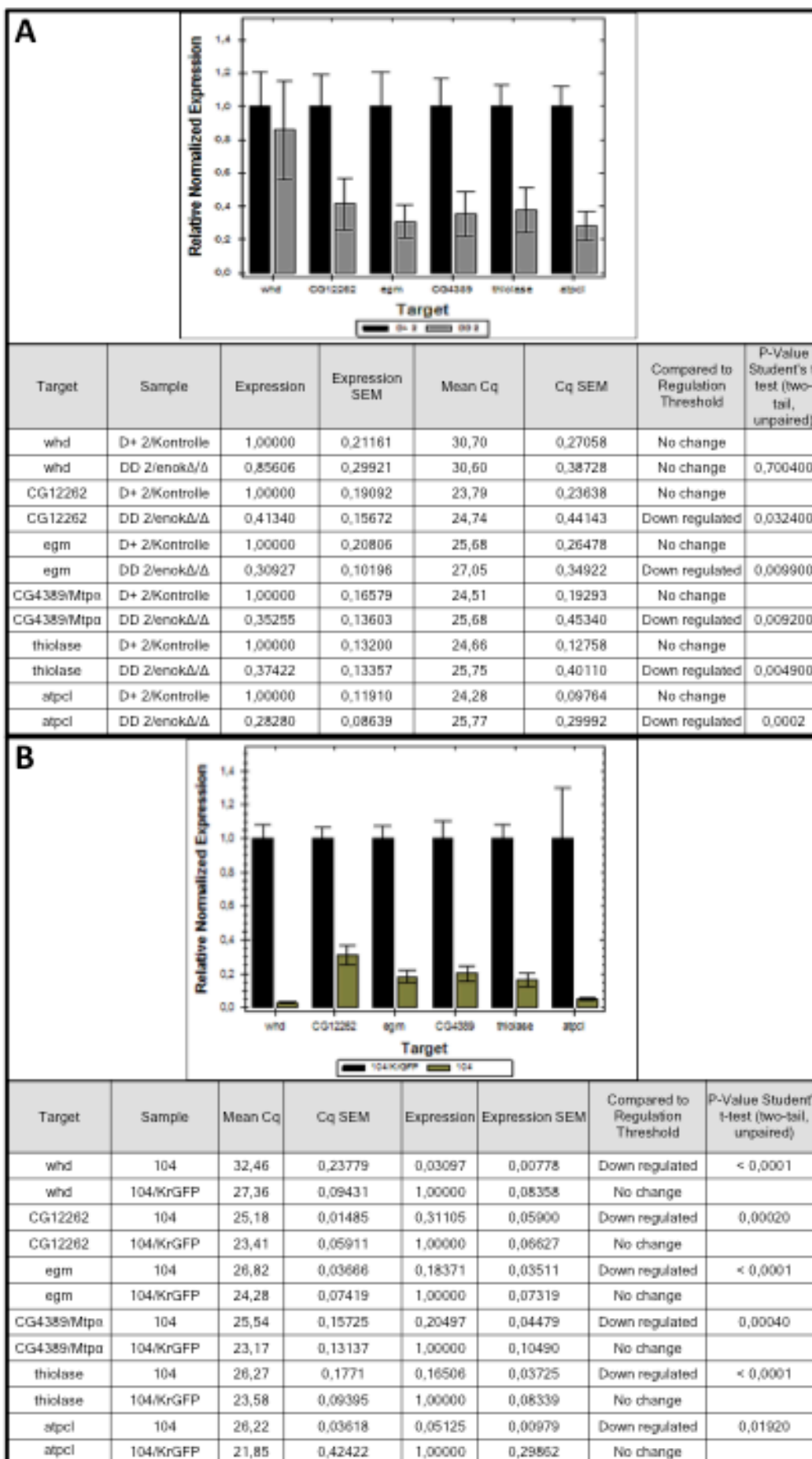


Abbildung 7.13: Transkriptionsanalyse der β -Oxidationsgene in den Mutanten $enok^{A/A}$ und $enok^{104}$.

(A,B) Transkriptionelle Analyse der Gene, die an der β -Oxidation beteiligt sind. Das Expressionsprofil beider $enok$ -Mutanten im Vergleich zu der entsprechenden heterozygoten Kontrolle zeigt eine starke Beeinträchtigung der β -Oxidation auf transkriptioneller Ebene. Die Balkendiagramme zeigen die relative Expression und sind die Originaldiagramme (Rohdaten), die von der Bio Rad Software abgebildet wurden. Die Genotypene und die Gennamen wurden in den statistischen Auswertungen angeglichen. Die Tabellen enthalten jeweils die entsprechenden Level der Expression. Die Signifikanz wurde mittels des Student's T-Test bestimmt. Die Fehlerbalken repräsentieren standard error of the mean (SEM). n=4. *ATPCL*, *ATP-Citrat Lyase*; *bmm*, *Brummer*; *egm*, *enigma*; *Lip3*, *Lipase3*; *Lip4*, *Lipase4*; *Mtpa/CG4389*, *Mitochondrial trifunctional protein a subunit*; *whd*, *withered*.

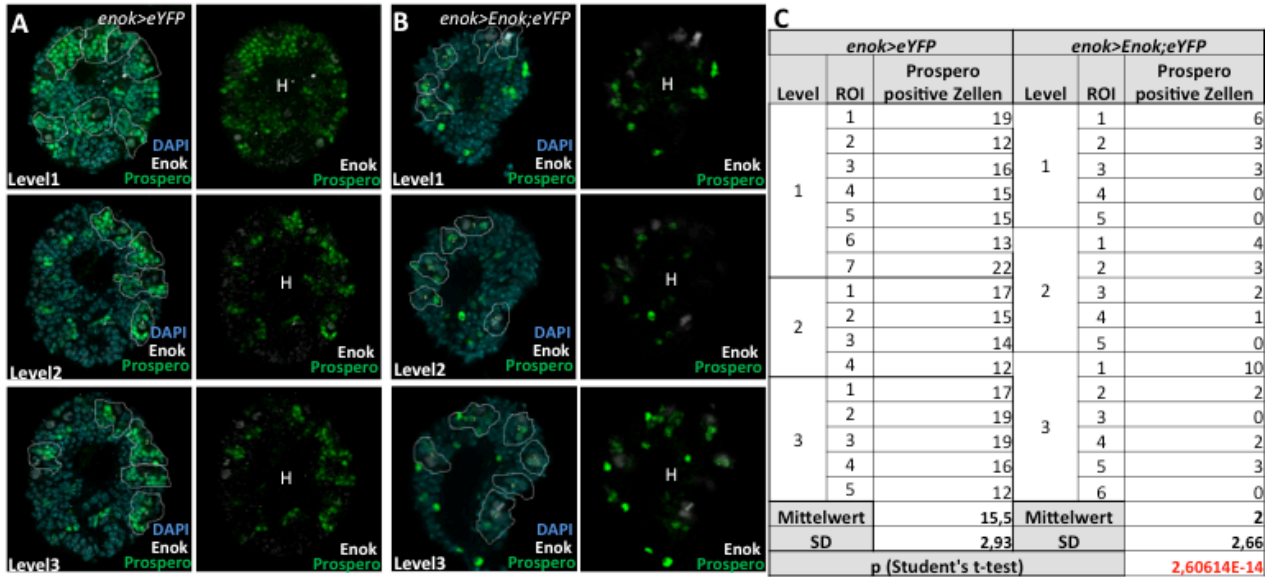


Abbildung 7.14: Beeinträchtigung der Neuroblastenproliferation durch die $enok$ -Überexpression unter der Kontrolle des $enok$ -Promotors.

(A-B) $enok$ -Überexpression im Gehirn verursacht einen Proliferationsdefekt in den Neuroblasten. Die Proliferationsrate wurde semiquantitativ durch eine Färbung mit α -Prospero bestimmt. Die Zahl der Prospero-positiven Ganglion-Mutterzellen (grün) korreliert mit der Anzahl der Zellteilungen des Neuroblasts. Die genaue Anzahl der Ganglion-Mutterzellen wurde in der Tabelle (C) festgehalten. Enok-positive Zellen (weiß) markieren die Position des Neuroblasts. Die Schnitte durch die Hemisphäre (H) des jeweiligen Genotyps wurden in denselben Ebenen gemacht. In den Bilder der einzelnen Level sind die jeweiligen ROIs zu sehen, welche um die Neuroblasten und die dazugehörigen Prospero-positiven Zellen gewählt wurden. Die Tiere deren Gehirne verwendet wurden, waren gleich alt und wurden gleich behandelt. (A) zeigt die Kontrollkreuzung $enok>eYFP$. (B) Die Überexpression von $enok$ unter der Kontrolle des $enok$ -Promotors. Die Zahl der Ganglion-Mutterzellen ist in der Überexpression höchst signifikant reduziert (C). Primäre Antikörper: (A,B) rat α -Enok; mouse α -Prospero.

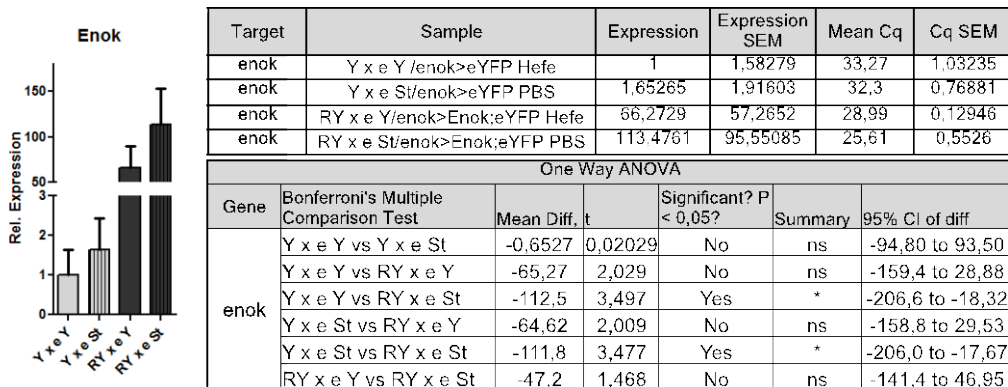


Abbildung 7.15: Transkriptionelle Analyse von Enok bei verschiedenen Nahrungsbedingungen in der Überexpression und in der Kontrolle.

Transkriptionelle Analyse von Enok unter verschiedenen Nahrungsbedingungen. Die Expression in Larven wurde unter Hungerbedingungen (PBS) oder auf proteinreicher Nahrung (Hefe) verglichen. Enok wurde im Falle der Überexpression bei beiden Nahrungsbedingungen sehr stark induziert. Der angewandte stat. Test ist One Way Anova mit einer Multitest Korrektur (Bonferroni). Die Fehlerbalken repräsentieren standard error of the mean (SEM). n=3

Target	Sample	Expression	Expression SEM	Mean Cq	Cq SEM
brm/bmm	Y x e Y /enok>eYFP Hefe	1,00000	0,57135	34,42	0,72173
brm/bmm	Y x e St/enok>eYFP PBS	6,99533	1,44774	31,37	0,13009
brm/bmm	RY x e Y/enok>Enok;eYFP Hefe	1,44346	0,57917	34,76	0,13910
brm/bmm	RY x e St/enok>Enok;eYFP PBS	5,54334	0,95298	31,12	0,13832
lip3	Y x e Y /enok>eYFP Hefe	1,00000	0,35007	23,25	0,31068
lip3	Y x e St/enok>eYFP PBS	18,59951	3,77497	18,80	0,11625
lip3	RY x e Y/enok>Enok;eYFP Hefe	1,55758	0,65189	23,49	0,22102
lip3	RY x e St/enok>Enok;eYFP PBS	2,46535	0,58085	21,12	0,27047
CG6113/lip4	Y x e Y /enok>eYFP Hefe	1,00000	0,29751	30,91	0,16023
CG6113/lip4	Y x e St/enok>eYFP PBS	9,43874	1,77963	27,43	0,04204
CG6113/lip4	RY x e Y/enok>Enok;eYFP Hefe	2,67488	1,18173	30,36	0,30083
CG6113/lip4	RY x e St/enok>Enok;eYFP PBS	4,41723	1,15899	27,94	0,31766
CG6277	Y x e Y /enok>eYFP Hefe	1,00000	0,47866	23,32	0,03506
CG6277	Y x e St/enok>eYFP PBS	4,36424	1,41217	20,95	0,03536
CG6277	RY x e Y/enok>Enok;eYFP Hefe	0,02100	0,01421	29,76	0,07295
CG6277	RY x e St/enok>Enok;eYFP PBS	0,08123	0,02016	26,11	0,03235

One Way ANOVA						
Gene	Bonferroni's Multiple Comparison Test	Mean Diff.	t	Significant? P < 0,05?	Summary	95% CI of diff
brm/bmm	Y x e Y vs Y x e St	-5,995	4,428	Yes	**	-9,958 to -2,032
	Y x e Y vs RY x e Y	-0,4435	0,3275	No	ns	-4,406 to 3,519
	Y x e Y vs RY x e St	-4,543	3,35600	Yes	*	-8,506 to -0,5804
	Y x e St vs RY x e Y	5,552	4,10100	Yes	**	1,589 to 9,515
	Y x e St vs RY x e St	1,452	1,07200	No	ns	-2,511 to 5,415
	RY x e Y vs RY x e St	-4,1	3,02800	Yes	*	-8,063 to -0,1369
lip3	Y x e Y vs Y x e St	-17,6	6,398	Yes	***	-25,65 to -9,547
	Y x e Y vs RY x e Y	-0,5576	0,2027	No	ns	-8,610 to 7,495
	Y x e Y vs RY x e St	-1,465	0,5327	No	ns	-9,518 to 6,587
	Y x e St vs RY x e Y	17,04	6,195	Yes	***	8,990 to 25,09
	Y x e St vs RY x e St	16,13	5,865	Yes	***	8,082 to 24,19
	RY x e Y vs RY x e St	-0,9078	0,33	No	ns	-8,960 to 7,144
CG6113/lip4	Y x e Y vs Y x e St	-8,439	4,874	Yes	***	-13,51 to -3,371
	Y x e Y vs RY x e Y	-1,675	0,9674	No	ns	-6,743 to 3,393
	Y x e Y vs RY x e St	-3,417	1,974	No	ns	-8,485 to 1,651
	Y x e St vs RY x e Y	6,764	3,907	Yes	**	1,696 to 11,83
	Y x e St vs RY x e St	5,022	2,9	No	ns	-0,04640 to 10,09
	RY x e Y vs RY x e St	-1,742	1,006	No	ns	-6,810 to 3,326
CG6277	Y x e Y vs Y x e St	-8,849	3,721	Yes	*	-16,35 to -1,352
	Y x e Y vs RY x e Y	-0,4242	0,1784	No	ns	-7,922 to 7,073
	Y x e Y vs RY x e St	-2,127	0,8943	No	ns	-9,624 to 5,371
	Y x e St vs RY x e Y	8,425	3,543	Yes	*	0,9277 to 15,92
	Y x e St vs RY x e St	6,723	2,827	No	ns	-0,7749 to 14,22
	RY x e Y vs RY x e St	-1,703	0,7159	No	ns	-9,200 to 5,795

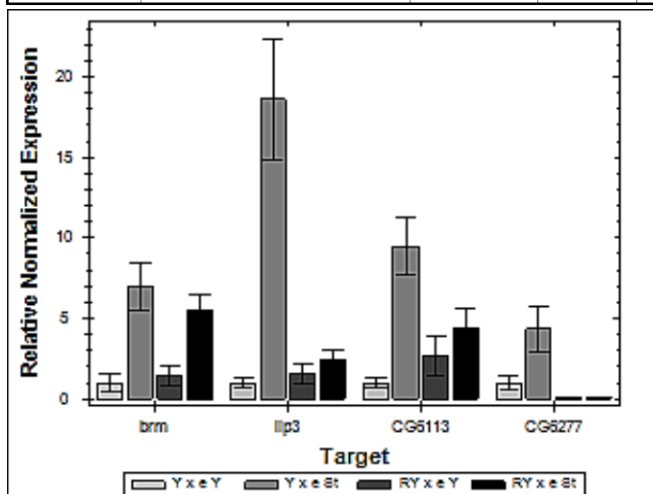


Abbildung 7.16: Effekt der Enok Überexpression auf Lipolyse.

Das Expressionsprofil der Lipidmetabolismusgene wurde unter verschiedenen Nahrungsbedingungen untersucht. Hier wurde die Expression in Larve unter Hungerbedingungen (PBS) oder auf proteinreicher Nahrung (Hefe) verglichen. *enok*-Überexpressionstiere wurden mit Kontrolltieren verglichen. Die Überexpression von Enok zeigte einen negativen Effekt auf die Lipolyse. Der Graph zeigt das Originaldiagramm (Rohdaten), das von der Bio Rad Software abgebildet wurde. Die Tabelle enthält die entsprechenden rel. Expressionslevel. Zur stat. Auswertung wurde One Way Anova mit der Bonferroni Korrektur durchgeführt. Die Fehlerbalken repräsentieren standard error of the mean (SEM). *bmm*, *Brummer*; *Lip3*, *Lipase3*; *Lip4/CG6113*, *Lipase4*.

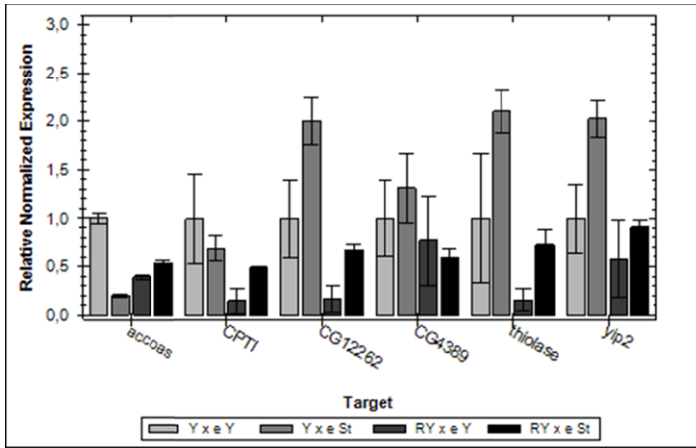


Abbildung 7.17: Effekt der Enok Überexpression auf β -Oxidation.

Das Expressionsprofil der Lipidmetabolismusgene wurde unter verschiedenen Nahrungsbedingungen untersucht. Hungerbedingungen (PBS) oder proteinreicher Nahrung (Hefe). *enok*-Überexpression wurde mit Kontrolltieren verglichen. Die Überexpression von *enok* hatte einen negativen Effekt auf die Induktion der β -Oxidation. Trotz der fehlenden Nahrungsaufnahme, werden die β -Oxidationsgene nicht im selben Maße induziert wie in den gehungerten Kontrolltieren. Der

Graph zeigt das Originaldiagramm (Rohdaten), das von der Bio Rad Software abgebildet wurde. Die Tabelle enthält die entsprechenden rel. Expressionslevel. Zur stat. Auswertung wurde One Way Anova mit der Bonferroni Korrektur durchgeführt. Die Fehlerbalken repräsentieren standard error of the mean (SEM). *AcCoAs*, *Acetyl-CoA Synthetase*; *CPT1*, *Acyl-Carnitin/Carnitin-Antiporter*; *Mtpa/CG4389*, *Mitochondrial trifunctional protein a subunit*; *yip2*, *yippee interacting protein 2*.

Target	Sample	Expression	Expression SEM	Mean Cq	Cq SEM
accoas	YxeY /enok-eYFP Hefe	1,00000	0,05055	28,17	0,07158
accoas	YxeSt/enok-eYFP PBS	0,19421	0,00955	30,29	0,00511
accoas	RYxeY/enok-Enok,eYFP Hefe	0,38678	0,02354	28,71	0,01325
accoas	RYxeSt/enok-Enok,eYFP PBS	0,53721	0,03028	29,34	0,05104
CPT1	YxeY /enok-eYFP Hefe	1,00000	0,46157	25,57	0,10296
CPT1	YxeSt/enok-eYFP PBS	0,68585	0,13081	25,91	0,19719
CPT1	RYxeY/enok-Enok,eYFP Hefe	0,14968	0,12696	30,07	0,11371
CPT1	RYxeSt/enok-Enok,eYFP PBS	0,48886	0,01373	25,90	0,00377
CG12262	YxeY /enok-eYFP Hefe	1,00000	0,40266	23,56	0,34792
CG12262	YxeSt/enok-eYFP PBS	2,00723	0,24772	22,35	0,11527
CG12262	RYxeY/enok-Enok,eYFP Hefe	0,16819	0,13716	27,89	0,80117
CG12262	RYxeSt/enok-Enok,eYFP PBS	0,66812	0,05555	23,44	0,11652
CG4389/Mtpa	YxeY /enok-eYFP Hefe	1,00000	0,38996	24,47	0,31638
CG4389/Mtpa	YxeSt/enok-eYFP PBS	1,31451	0,35216	23,88	0,36189
CG4389/Mtpa	RYxeY/enok-Enok,eYFP Hefe	0,76916	0,46578	26,61	0,14487
CG4389/Mtpa	RYxeSt/enok-Enok,eYFP PBS	0,59118	0,08910	24,53	0,24014
thiolase	YxeY /enok-eYFP Hefe	1,00000	0,66865	25,11	0,84508
thiolase	YxeSt/enok-eYFP PBS	2,10419	0,22457	23,84	0,07275
thiolase	RYxeY/enok-Enok,eYFP Hefe	0,15730	0,11877	29,54	0,66656
thiolase	RYxeSt/enok-Enok,eYFP PBS	0,72431	0,15182	24,88	0,30106
yip2	YxeY /enok-eYFP Hefe	1,00000	0,35920	22,56	0,22831
yip2	YxeSt/enok-eYFP PBS	2,03097	0,19395	21,34	0,02378
yip2	RYxeY/enok-Enok,eYFP Hefe	0,58132	0,40098	25,11	0,02399
yip2	RYxeSt/enok-Enok,eYFP PBS	0,90933	0,08138	22,00	0,12592

One Way ANOVA					
Gene	Bonferroni's Multiple Comparison Test	Mean Diff,	t	Significant? P < 0,05?	Summary 95% CI of diff
accoas	YxeY vs YxeSt	0,8058	17,76	Yes	*** 0,5857 to 1,026
	YxeY vs RYxeY	0,6132	13,51	Yes	** 0,3931 to 0,8333
	YxeY vs RYxeSt	0,4628	10,20000	Yes	** 0,2427 to 0,6829
	YxeSt vs RYxeY	-0,1926	4,24400	No	ns -0,4127 to 0,02755
	YxeSt vs RYxeSt	-0,343	7,55900	Yes	** -0,5631 to -0,1229
	RYxeY vs RYxeSt	-0,1504	3,31500	No	ns -0,3705 to 0,06969
CPT1	YxeY vs YxeSt	0,3142	1,266	No	ns -0,4684 to 1,097
	YxeY vs RYxeY	0,8503	3,426	Yes	* 0,06774 to 1,633
	YxeY vs RYxeSt	0,5111	2,059	No	ns -0,2714 to 1,294
	YxeSt vs RYxeY	0,5362	2,16	No	ns -0,2464 to 1,319
	YxeSt vs RYxeSt	0,197	0,7936	No	ns -0,5856 to 0,9796
	RYxeY vs RYxeSt	-0,3392	1,366	No	ns -1,122 to 0,4434
CG12262	YxeY vs YxeSt	-1,007	2,875	No	ns -2,112 to 0,09711
	YxeY vs RYxeY	0,8318	2,375	No	ns -0,2725 to 1,936
	YxeY vs RYxeSt	0,3319	0,9475	No	ns -0,7725 to 1,436
	YxeSt vs RYxeY	1,839	5,25	Yes	** 0,7347 to 2,943
	YxeSt vs RYxeSt	1,339	3,823	Yes	* 0,2348 to 2,443
	RYxeY vs RYxeSt	-0,4999	1,427	No	ns -1,604 to 0,6044
CG4389/Mtpa	YxeY vs YxeSt	0,3145	0,6272	No	ns -1,895 to 1,266
	YxeY vs RYxeY	0,2308	0,4604	No	ns -1,350 to 1,812
	YxeY vs RYxeSt	0,4088	0,8153	No	ns -1,172 to 1,990
	YxeSt vs RYxeY	0,5454	1,088	No	ns -1,035 to 2,126
	YxeSt vs RYxeSt	0,7233	1,443	No	ns -0,8575 to 2,304
	RYxeY vs RYxeSt	0,178	0,3549	No	ns -1,403 to 1,759
thiolase	YxeY vs YxeSt	-1,104	2,136	No	ns 2,734 to 0,5259
	YxeY vs RYxeY	0,8427	1,63	No	ns -0,7874 to 2,473
	YxeY vs RYxeSt	0,28	0,53320	No	ns -1,354 to 1,906
	YxeSt vs RYxeY	1,95	3,76500	Yes	* 0,3168 to 3,577
	YxeSt vs RYxeSt	1,38	2,66900	No	ns -0,2502 to 3,010
	RYxeY vs RYxeSt	-0,57	1,09700	No	ns 2,197 to 1,063
yip2	YxeY vs YxeSt	-1,031	2,69	No	ns 2,239 to 0,1775
	YxeY vs RYxeY	0,4187	1,092	No	ns -0,7898 to 1,627
	YxeY vs RYxeSt	0,09067	0,2365	No	ns -1,118 to 1,299
	YxeSt vs RYxeY	1,45	3,782	Yes	* 0,2412 to 2,658
	YxeSt vs RYxeSt	1,122	2,926	No	ns -0,08681 to 2,330
	RYxeY vs RYxeSt	0,328	0,8557	No	ns -1,536 to 0,8804

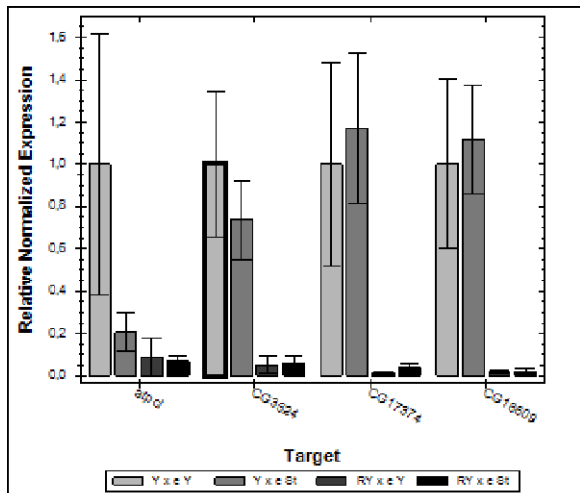


Abbildung 7.18: Effekt der Enok Überexpression auf Fettsäuresynthese.

Das Expressionsprofil der Lipidmetabolismusgene wurde unter verschiedenen Nahrungsbedingungen untersucht. Hungerbedingungen (PBS) oder proteinreicher Nahrung (Hefe). *enok*-Überexpressions-tiere wurden mit Kontrolltieren verglichen. Die Überexpression von *enok* hatte einen negativen Effekt auf die Induktion der Fettsäuresynthesegene. Trotz der fehlenden Nahrungsaufnahme, werden sie nicht induziert wie in den Kontrolltieren. Der Graph zeigt das Originaldiagramm (Rohdaten), das von der Bio Rad Software abgebildet wurde. Die Tabelle enthält die entsprechenden rel. Expressionslevel. Zur stat. Auswertung wurde One Way Anova mit der Bonferroni Korrektur durchgeführt. Die Fehlerbalken repräsentieren standard error of the mean (SEM). *ATPCL*, *ATP-Citrat Lyase*.

Target	Sample	Expression	Expression SEM	Mean Cq	Cq SEM
atpd	Y x e Y / <i>enok</i> >eYFP Hefe	1,00000	0,61746	23,51	0,79687
atpd	Y x e St/ <i>enok</i> >eYFP PBS	0,20792	0,08822	25,54	0,54999
atpd	RY x e Y/ <i>enok</i> >Enok;eYFP Hefe	0,08716	0,09075	27,90	1,39304
atpd	RY x e St/ <i>enok</i> >Enok;eYFP PBS	0,07054	0,02122	26,51	0,38203
CG3524	Y x e Y / <i>enok</i> >eYFP Hefe	1,00000	0,34232	30,91	0,07792
CG3524	Y x e St/ <i>enok</i> >eYFP PBS	0,73542	0,18637	31,12	0,15914
CG3524	RY x e Y/ <i>enok</i> >Enok;eYFP Hefe	0,05121	0,04276	36,07	0,98894
CG3524	RY x e St/ <i>enok</i> >Enok;eYFP PBS	0,06002	0,03189	34,14	0,72379
CG17374	Y x e Y / <i>enok</i> >eYFP Hefe	1,00000	0,47770	29,11	0,48696
CG17374	Y x e St/ <i>enok</i> >eYFP PBS	1,17000	0,35593	28,65	0,29032
CG17374	RY x e Y/ <i>enok</i> >Enok;eYFP Hefe	0,01269	0,00742	36,29	0,28331
CG17374	RY x e St/ <i>enok</i> >Enok;eYFP PBS	0,04060	0,01346	32,91	0,40630
CG18609	Y x e Y / <i>enok</i> >eYFP Hefe	1,00000	0,40164	28,50	0,31293
CG18609	Y x e St/ <i>enok</i> >eYFP PBS	1,11566	0,25647	28,10	0,04071
CG18609	RY x e Y/ <i>enok</i> >Enok;eYFP Hefe	0,01756	0,00889	35,20	0,24418
CG18609	RY x e St/ <i>enok</i> >Enok;eYFP PBS	0,02308	0,01194	33,11	0,70224

One way ANOVA						
Gene	Bonferroni's Multiple Comparison Test	Mean Diff,	t	Significant? P < 0,05?	Summary	95% CI of diff
atpd	Y x e Y vs Y x e St	0,7921	1,776	No	ns	-0,5132 to 2,097
	Y x e Y vs RY x e Y	0,9128	2,047	No	ns	-0,3925 to 2,218
	Y x e Y vs RY x e St	0,9295	2,08400	No	ns	-0,3759 to 2,235
	Y x e St vs RY x e Y	0,1208	0,27080	No	ns	-1,185 to 1,426
	Y x e St vs RY x e St	0,1374	0,30810	No	ns	-1,168 to 1,443
	RY x e Y vs RY x e St	0,01662	0,03727	No	ns	-1,289 to 1,322
CG3524	Y x e Y vs Y x e St	0,2646	1,165	No	ns	-0,4002 to 0,9294
	Y x e Y vs RY x e Y	0,9488	4,177	Yes	**	0,2840 to 1,614
	Y x e Y vs RY x e St	0,94	4,139	Yes	**	0,2752 to 1,605
	Y x e St vs RY x e Y	0,6842	3,012	Yes	*	0,01939 to 1,349
	Y x e St vs RY x e St	0,6754	2,974	Yes	*	0,01058 to 1,340
	RY x e Y vs RY x e St	-0,00881	0,03879	No	ns	-0,6736 to 0,6560
CG17374	Y x e Y vs Y x e St	-0,17	0,4941	No	ns	-1,177 to 0,8370
	Y x e Y vs RY x e Y	0,9873	2,87	No	ns	-0,01974 to 1,994
	Y x e Y vs RY x e St	0,9594	2,789	No	ns	-0,04765 to 1,966
	Y x e St vs RY x e Y	1,157	3,364	Yes	*	0,1503 to 2,164
	Y x e St vs RY x e St	1,129	3,283	Yes	*	0,1224 to 2,136
	RY x e Y vs RY x e St	-0,02791	0,08112	No	ns	-1,035 to 0,9791
CG18609	Y x e Y vs Y x e St	-0,1157	0,4202	No	ns	-0,9214 to 0,6901
	Y x e Y vs RY x e Y	0,9824	3,569	Yes	*	0,1767 to 1,788
	Y x e Y vs RY x e St	0,9769	3,549	Yes	*	0,1712 to 1,783
	Y x e St vs RY x e Y	1,098	3,989	Yes	**	0,2924 to 1,904
	Y x e St vs RY x e St	1,093	3,969	Yes	**	0,2869 to 1,898
	RY x e Y vs RY x e St	-0,00552	0,02005	No	ns	-0,8112 to 0,8002

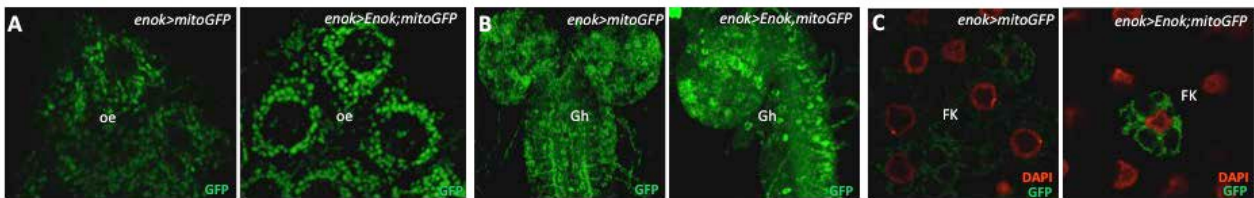


Abbildung 7.19: Effekt der *enok*-Überexpression auf die Mitochondrien.

(A-C) Die Reduktion ist nicht mitochondrien-abhängig. *In vivo* Aufnahmen der Oenozyten (oe), des Gehirns (Gh) und des Fettkörpers (FK) zeigen das mitochondriale GFP-Signal in der Überexpression und in der Kontrolle. Die Mitochondrien werden durch die Überexpression von *enok* weder in ihrer Morphologie, noch in ihrer Anzahl negativ beeinflusst.

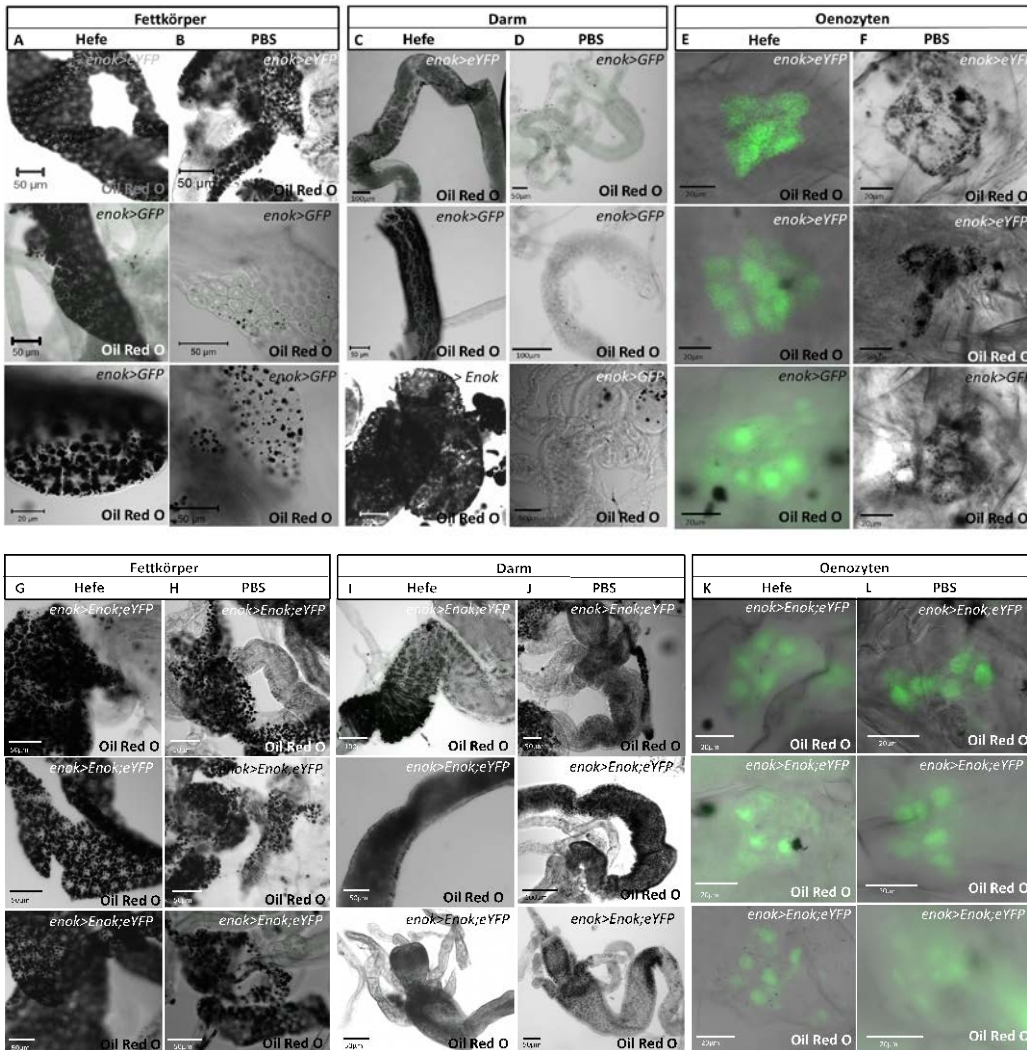


Abbildung 7.20: Lipidmobilisation in der Kontrollsituation und fehlende Lipidmobilisation in *enok*-Überexpressionstieren unter der Kontrolle des *enok*-Promotors.

Oil Red O Färbungen von L2 Larven zeigen die drei Gewebe Darm, Oenozyten und Fettkörper, die Lipide je nach Nahrungsbedingung akkumulieren (A-F). Zwei Nahrungsbedingungen wurden angeschaut: Hefe (proteinreiche Nahrung) oder PBS (Hunger). Die Akkumulation der Lipide in den L2 Kontrolllarven auf Hefe ist in Fettkörper (A) und Darm (C) aber nicht in den Oenozyten (E) zu sehen. Nach 14 Stunden des Hungerns auf PBS beginnt der Fettkörper seine Lipidreserven abzubauen (B). Im Darm sind die Lipide nach 14h beinahe vollständig abgebaut (D). In den Oenozyten dagegen ist eine starke Akkumulation der Lipide zu beobachten (F). (G-L) *enok*-Überexpression unter der Kontrolle des *enok*-Promotors. Oil Red O Färbungen von L2 Larven zeigen die drei Gewebe Darm, Oenozyten und Fettkörper, die Lipide je nach Nahrungsbedingung akkumulieren. Bei der *enok*-Überexpression sah die Verteilung der Lipide auf Hefe aus wie in der Kontrolle. Lipide wurden im Fettkörper (G), im Darm (I) jedoch keine in den Oenozyten (K) detektiert. Nach der Hungerperiode von 14h änderte sich die Verteilung nicht (H, J, L). Die Tiere bauten ihre Fettreserven nicht ab. Die Lipide wurden im Fettkörper (H) und zu großen Mengen im Darm (J) detektiert. Die Akkumulation in den Oenozyten (L) fand nicht statt. Der jeweilige Genotyp und Maßstab ist in den einzelnen Bildern festgehalten.

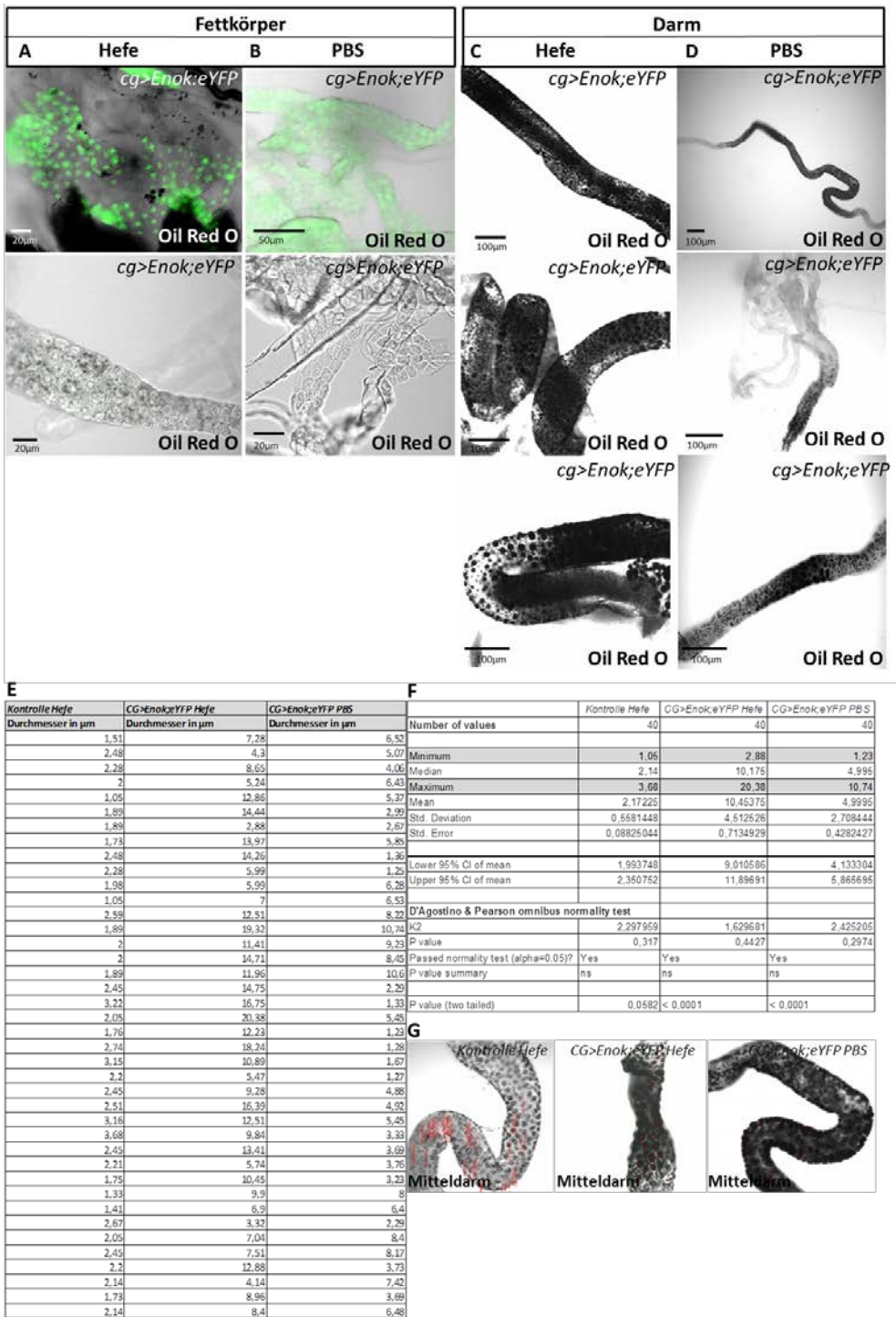
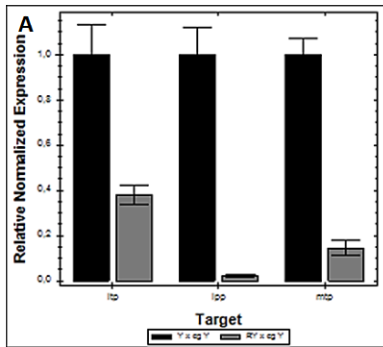
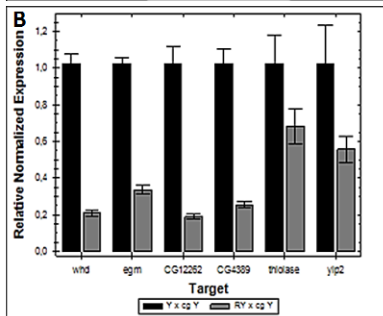


Abbildung 7.21: Überexpression von *enok* im Fettkörper verhindert Lipid-Abtransport.

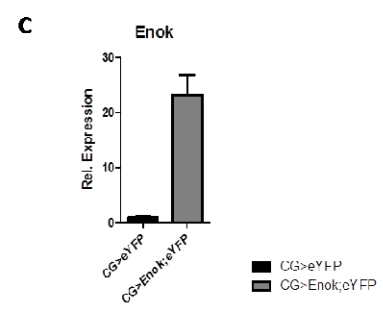
Unter Kontrolle des *CG*-Treibers wurde die Funktion von *Enok* im Fettkörper analysiert. Die Oil Red O Färbung zeigte die Akkumulation von Lipiden unter zwei Nahrungsbedingungen: Hefe (proteinreiche Nahrung) oder PBS (Hunger) (A-D). Die Akkumulation der Lipide bei proteinreicher Nahrung konnte nur im Darm detektiert werden (C) und nichts im Fettkörper (A). Nach 14-stündigem Nahrungsentzug änderte sich die Akkumulation nicht. Es konnten weiterhin keine Lipide im Fettkörper (B) detektiert werden. Im Darm waren immer noch Lipide akkumuliert (D). Die Akkumulation der Lipide im Darm bei beiden Nahrungsbedingungen war ungewöhnlich stark und die Lipidtröpfchen besonders groß (E-F). Die durchschnittliche Tröpfchengröße in der Kontrolle unter Hefe beträgt 1-4µm. Im Mitteldarm der Überexpressionstiere werden unter Hefe sehr große Lipidtröpfchen akkumuliert (2,5-20 µm). Diese werden auch nach einem Nahrungsentzug (PBS) von 14h nur langsam verkleinert (1-11 µm). In (G) sind die in (E) und (F) analysierten Darmabschnitte dargestellt. In (E) sind die Messungen und in (F) die statistische Auswertung zu sehen. Der jeweilige Genotyp und Maßstab ist in den einzelnen Bildern festgehalten.



Target	Sample	Expression	Expression SEM	Mean Cq	Cq SEM	Compared to Regulation Threshold	P-Value Student's t-test (two-tail, unpaired)
whd	RY x cg Y/CG>Enok:eYFP	0,21144	0,01712	33,80	0,07765	Down regulated	< 0,0001
whd	Y x cg Y/CG>eYFP	1,02691	0,05341	31,54	0,07081	No change	
egm	RY x cg Y/CG>Enok:eYFP	0,33651	0,02200	27,05	0,03569	Down regulated	< 0,0001
egm	Y x cg Y/CG>eYFP	1,02691	0,03029	25,46	0,03457	No change	
CG12262	RY x cg Y/CG>Enok:eYFP	0,18998	0,01301	25,70	0,04620	Down regulated	0,00010
CG12262	Y x cg Y/CG>eYFP	1,02691	0,09430	23,28	0,13013	No change	
CG4389/Mtpα	RY x cg Y/CG>Enok:eYFP	0,25398	0,01729	26,12	0,04498	Down regulated	< 0,0001
CG4389/Mtpα	Y x cg Y/CG>eYFP	1,02691	0,07912	24,12	0,10835	No change	
thiolase	RY x cg Y/CG>Enok:eYFP	0,68479	0,09559	25,31	0,18149	No change	0,11070
thiolase	Y x cg Y/CG>eYFP	1,02691	0,15603	24,74	0,21780	No change	
yip2	RY x cg Y/CG>Enok:eYFP	0,55638	0,07461	23,68	0,17266	No change	0,07910
yip2	Y x cg Y/CG>eYFP	1,02691	0,20983	22,82	0,29374	No change	



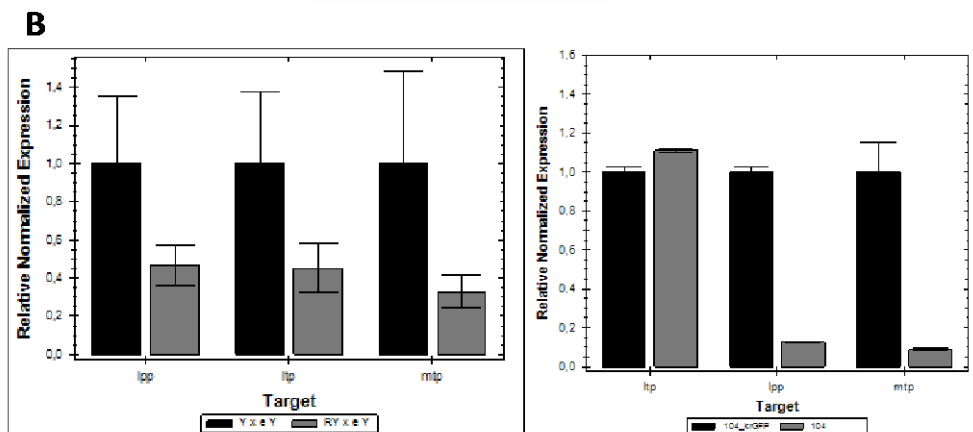
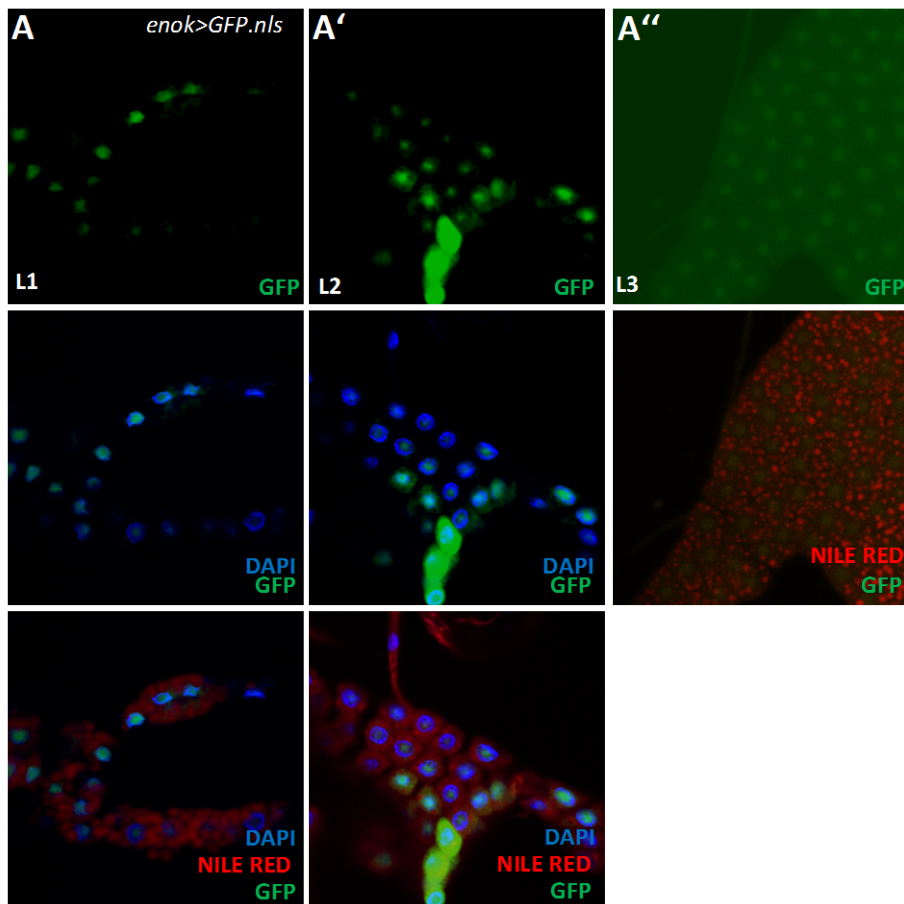
Target	Sample	Expression	Expression SEM	Mean Cq	Cq SEM	Compared to Regulation Threshold	P-Value Student's t-test (two-tail, unpaired)
enok	RY x cg Y/CG>Enok:eYFP	23,29466	3,56766	27,52	0,20298	Up regulated	0,0000
enok	Y x cg Y/CG>eYFP	1,00000	0,16345	32,13000	0,23443	No change	



Target	Sample	Expression	Expression SEM	Mean Cq	Cq SEM	Compared to Regulation Threshold	P-Value Student's t-test (two-tail, unpaired)
enok	RY x cg Y/CG>Enok:eYFP	23,29466	3,56766	27,52	0,20298	Up regulated	0,0000
enok	Y x cg Y/CG>eYFP	1,00000	0,16345	32,13000	0,23443	No change	

Abbildung 7.22: Überexpression von *enok* im Fettkörper verhindert Transkription von Lipoprotein- und β -Oxidations-Genen.

(A) Transkriptionelle Analyse der Lipoprotein Expression zeigte, dass die Transkripte von *Apoltp/LTP*, *Lpp* und *Mtp* in in der Überexpression im Vergleich zur Kontrolle stark reduziert sind. (B) Die Gene der β -Oxidation waren in den Tieren ebenfalls reduziert. Bei einer Überexpression von *enok* im Fettkörper findet kein Lipidtransport zwischen den Geweben statt, zusätzlich sind die Gene der β -Oxidation in ihren Transkriptleveln reduziert. (C) Überexpression von *enok* hat eine 23fachen Induktion des Transkripts. Die jeweiligen Graphen zeigen das Originaldiagramm (Rohdaten), das von der Bio Rad Software abgebildet wurde. Die entsprechenden Tabellen enthalten die entsprechenden rel. Expressionslevel. Fehlerbalken repräsentieren standard error of the mean (SEM). Die Signifikanz wurde mittels des Student's T-Test bestimmt. n=2. *Apoltp/LTP*, Lipid Transfer Protein; *egm*, enigma; *Lpp*, Lipophorin; *Mtpα/CG4389*, Microsomal Triglyceride Transfer Protein; *Mtpα*, Mitochondrial trifunctional protein a subunit; *yip2*, yippee interacting protein 2.



C

Target	Sample	Expression	Expression SEM	Mean Cq	Cq SEM	Compared to Regulation Threshold	P-Value Student's t-test (two-tail, unpaired)
ltp/Apoltp	Y x e Y/enok>eYFP Hefe	1,00000	0,37356	25,34	0,45307	No change	
ltp/Apoltp	RY x e Y/enok>Enok;eYFP Hefe	0,45182	0,12854	26,99	0,25966	No change	0,19540
lpp	Y x e Y/enok>eYFP Hefe	1,00000	0,35622	20,52	0,42301	No change	
lpp	RY x e Y/enok>Enok;eYFP Hefe	0,46690	0,10733	22,12	0,09464	No change	0,18240
mtp	Y x e Y/enok>eYFP Hefe	1,00000	0,48528	25,00	0,63638	No change	
mtp	RY x e Y/enok>Enok;eYFP Hefe	0,32975	0,08479	27,10	0,19128	No change	0,20350

Target	Sample	Expression	Expression SEM	Mean Cq	Cq SEM	Compared to Regulation Threshold	P-Value Student's t-test (two-tail, unpaired)
ltp/Apoltp	104	1,11142	0,00872	24,77	0,00371	No change	0,07390
ltp/Apoltp	104/KrGFP	1,00000	0,03089	25,18	0,00326	No change	
lpp	104	0,12646	0,00436	23,12	0,04855	Down regulated	0,00130
lpp	104/KrGFP	1,00000	0,03166	20,40	0,01054	No change	
mtp	104	0,08689	0,00710	28,14	0,11732	Down regulated	0,02750
mtp	104/KrGFP	1,00000	0,15459	24,88	0,21855	No change	

Abbildung 7.23: Lipoproteinexpression wird nicht während der gesamten Entwicklung von Enok kontrolliert.

(A-A'') Immunfluoreszenz-Färbung des kernlokalisierten GFP-Signals unter der Kontrolle des *enok*-Promotors in der Larve des ersten (A), zweiten (A') und dritten (A'') Larvalstadiums (L1,L2,L3). Die Expression von GFP (grün) ist in den Kernen des Fettkörpers (NILE RED, orange) während des ersten und zweiten Stadiums zu sehen. Die Expression in L2 ist nicht mehr in allen Zellen zu sehen. Im dritten Stadium ist keine Fluoreszenz mehr im Fettkörper zu sehen, auch nicht wenn die Intensität der Aufnahme erhöht wurde. Der Promotor verliert seine ubiquitäre Expression. (B,C) Transkriptionelle Analyse der Lipoproteinexpression in der Überexpression von *enok* kontrolliert durch den *enok*-Promotor und transkriptionelle Analyse der Lipoproteine in *enok*¹⁰⁴-Mutanten. Die Expression der Lipoproteine ist in beiden Genotypen durch die Missexpression von *enok* beeinträchtigt. In (B) sind die Originalgraphen (Rohdaten) zu sehen, die von der Bio Rad Software abgebildet wurden. In (C) sind die entsprechenden Tabellen enthalten. Die stat. Auswertung wurde mittels des Student's T-Test bestimmt. Fehlerbalken repräsentieren standard error of the mean (SEM). Primäre Antikörper: (A) chicken α -GFP. *Apoltp*, Lipid Transfer Protein; *Lpp*, Lipophorin; *Mtp*, Microsomal Triglyceride Transfer Protein.

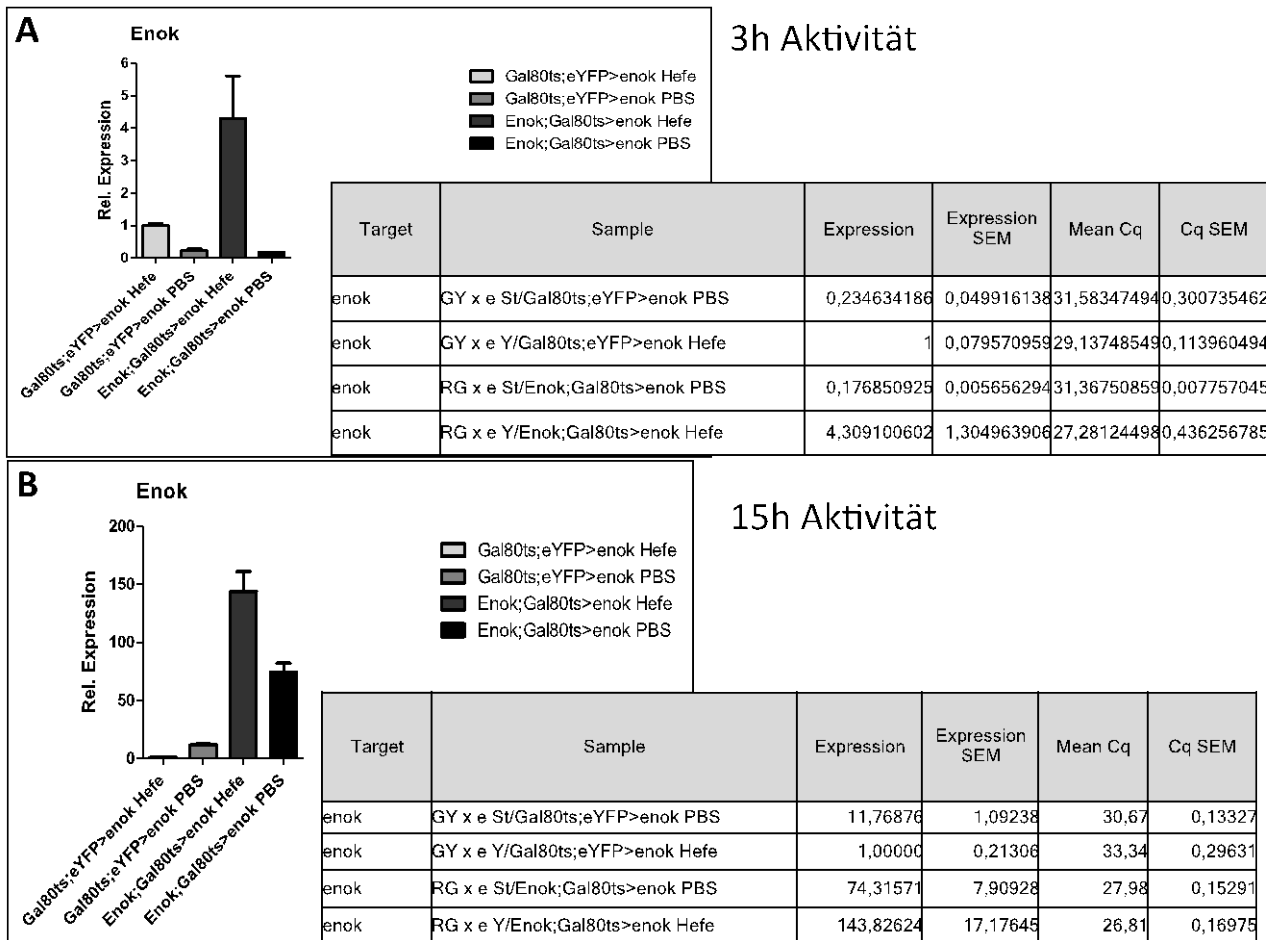
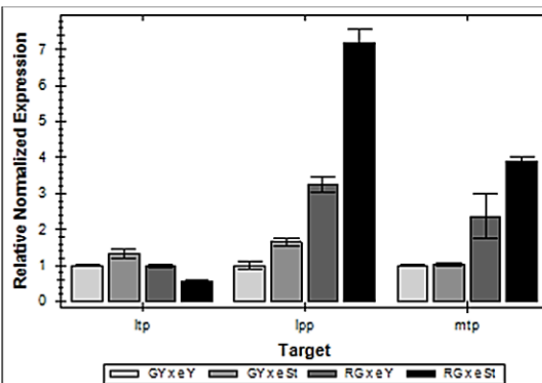


Abbildung 7.24: Enok Überexpression kontrolliert von Gal80ts.

Gal80ts-abhängige Expression von Enok nach 3stündiger (A) oder 15stündiger Aktivität. Nach einer Transfer der Fliegen von 18°C auf 29°C wird das temperatursensitive Gal80ts deaktiviert und das Gal4 kann an UAS binden und die Expression des Reporters aktivieren. Die Aktivität wurde zusätzlich unter verschiedenen Nahrungsbedingungen (Hefe und PBS) untersucht. Die jeweiligen Tabellen zeigen die genauen Expressionswerte. Fehlerbalken repräsentieren standard error of the mean (SEM).

A

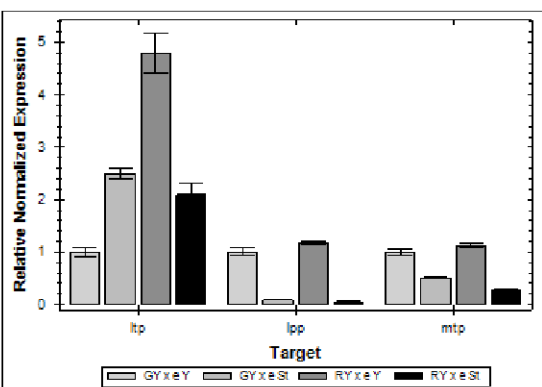
Target	Sample	Expression	Expression SEM	Mean Cq	Cq SEM
Itp/Apoltp	GY x e St/Gal80ts,eYFP>enok PBS	1,33639	0,13239	26,45	0,12910
Itp/Apoltp	GY x e Y/Gal80ts,eYFP>enok Hefe	1,00000	0,01995	26,52	0,02525
Itp/Apoltp	RGx e St/Enok,Gal80ts>enok PBS	0,56167	0,01818	27,08	0,01058
Itp/Apoltp	RGx e Y/Enok,Gal80ts>enok Hefe	0,98074	0,06136	26,80	0,08707
lpp	GY x e St/Gal80ts,eYFP>enok PBS	1,65729	0,10646	22,30	0,06950
lpp	GY x e Y/Gal80ts,eYFP>enok Hefe	1,00000	0,09185	22,68	0,13178
lpp	RGx e St/Enok,Gal80ts>enok PBS	7,20389	0,35676	19,56	0,06510
lpp	RGx e Y/Enok,Gal80ts>enok Hefe	3,24666	0,22190	21,23	0,09569
mtp	GY x e St/Gal80ts,eYFP>enok PBS	1,02702	0,04659	27,63	0,02292
mtp	GY x e Y/Gal80ts,eYFP>enok Hefe	1,00000	0,00983	27,31	0,00314
mtp	RGx e St/Enok,Gal80ts>enok PBS	3,90730	0,12400	25,08	0,00524
mtp	RGx e Y/Enok,Gal80ts>enok Hefe	2,36989	0,61587	26,32	0,37416



Gene	One Way ANOVA					
	Bonferroni's Multiple Comparison Test	Mean Diff,	t	Significant? P < 0,05?	Summary	95% CI of diff
Itp	Gal80ts,eYFP>enok Hefe vs Gal80ts,eYFP>enok PBS	-0,3364	3,206	No	ns	0,8454 to 0,1726
	Gal80ts,eYFP>enok Hefe vs Enok,Gal80ts>enok Hefe	0,01926	0,1836	No	ns	0,4897 to 0,5283
	Gal80ts,eYFP>enok Hefe vs Enok,Gal80ts>enok PBS	0,4383	4,17700	No	ns	0,07068 to 0,9473
	Gal80ts,eYFP>enok PBS vs Enok,Gal80ts>enok Hefe	0,3557	3,38900	No	ns	0,1534 to 0,8647
	Gal80ts,eYFP>enok PBS vs Enok,Gal80ts>enok PBS	0,7747	7,38300	Yes	*	0,2657 to 1,284
	Enok,Gal80ts>enok Hefe vs Enok,Gal80ts>enok PBS	0,4191	3,99400	No	ns	-0,08994 to 0,9281
lpp	Gal80ts,eYFP>enok Hefe vs Gal80ts,eYFP>enok PBS	-0,6573	2,098	No	ns	2,177 to 0,8624
	Gal80ts,eYFP>enok Hefe vs Enok,Gal80ts>enok Hefe	-2,247	7,171	Yes	*	3,766 to -0,7269
	Gal80ts,eYFP>enok Hefe vs Enok,Gal80ts>enok PBS	-6,204	19,8	Yes	***	-7,724 to -4,684
	Gal80ts,eYFP>enok PBS vs Enok,Gal80ts>enok Hefe	-1,589	5,073	Yes	*	3,109 to -0,06963
	Gal80ts,eYFP>enok PBS vs Enok,Gal80ts>enok PBS	-5,547	17,7	Yes	***	-7,066 to -4,027
	Enok,Gal80ts>enok Hefe vs Enok,Gal80ts>enok PBS	-3,957	12,63	Yes	**	5,477 to -2,437
mtp	Gal80ts,eYFP>enok Hefe vs Gal80ts,eYFP>enok PBS	-0,02702	0,06065	No	ns	2,188 to 2,134
	Gal80ts,eYFP>enok Hefe vs Enok,Gal80ts>enok Hefe	-1,37	3,075	No	ns	3,531 to 0,7913
	Gal80ts,eYFP>enok Hefe vs Enok,Gal80ts>enok PBS	-2,907	6,526	Yes	*	5,068 to -0,7461
	Gal80ts,eYFP>enok PBS vs Enok,Gal80ts>enok Hefe	-1,343	3,014	No	ns	3,504 to 0,8183
	Gal80ts,eYFP>enok PBS vs Enok,Gal80ts>enok PBS	-2,88	6,465	Yes	*	5,041 to -0,7191
	Enok,Gal80ts>enok Hefe vs Enok,Gal80ts>enok PBS	-1,537	3,451	No	ns	3,699 to 0,6237

B

Target	Sample	Expression	Expression SEM	Mean Cq	Cq SEM
Itp/Apoltp	GY x e St/Gal80ts,eYFP>enok PBS	2,50158	0,09682	27,45	0,05428
Itp/Apoltp	GY x e Y/Gal80ts,eYFP>enok Hefe	1,00000	0,07594	27,89	0,07294
Itp/Apoltp	RY x e St/Enok,Gal80ts>enok PBS	2,09381	0,22585	27,68	0,15499
Itp/Apoltp	RY x e Y/Enok,Gal80ts>enok Hefe	4,79553	0,37216	26,26	0,10800
lpp	GY x e St/Gal80ts,eYFP>enok PBS	0,08266	0,00352	25,41	0,06007
lpp	GY x e Y/Gal80ts,eYFP>enok Hefe	1,00000	0,07314	20,92	0,06672
lpp	RY x e St/Enok,Gal80ts>enok PBS	0,04905	0,00171	26,13	0,04839
lpp	RY x e Y/Enok,Gal80ts>enok Hefe	1,17557	0,03567	21,33	0,03234
mtp	GY x e St/Gal80ts,eYFP>enok PBS	0,51619	0,00471	27,69	0,00110
mtp	GY x e Y/Gal80ts,eYFP>enok Hefe	1,00000	0,05762	25,84	0,01509
mtp	RY x e St/Enok,Gal80ts>enok PBS	0,28005	0,01649	28,54	0,08378
mtp	RY x e Y/Enok,Gal80ts>enok Hefe	1,12864	0,04093	26,31	0,04320



Gene	Bonferroni's Multiple Comparison Test					
	Mean Diff,	t	Significant? P < 0,05?	Summary	95% CI of diff	
Itp	Gal80ts,eYFP>enok Hefe vs Gal80ts,eYFP>enok PBS	-1,502	4,694	No	ns	-3,053 to 0,05018
	Gal80ts,eYFP>enok Hefe vs Enok,Gal80ts>enok Hefe	-3,796	11,87	Yes	**	-5,347 to -2,244
	Gal80ts,eYFP>enok Hefe vs Enok,Gal80ts>enok PBS	-1,094	3,41900	No	ns	-2,646 to 0,4579
	Gal80ts,eYFP>enok PBS vs Enok,Gal80ts>enok Hefe	-2,294	7,17100	Yes	*	-3,846 to -0,7422
	Gal80ts,eYFP>enok PBS vs Enok,Gal80ts>enok PBS	0,4078	1,27500	No	ns	-1,144 to 1,960
	Enok,Gal80ts>enok Hefe vs Enok,Gal80ts>enok PBS	2,702	8,44600	Yes	**	1,150 to 4,253
lpp	Gal80ts,eYFP>enok Hefe vs Gal80ts,eYFP>enok PBS	0,9173	15,92	Yes	***	0,6379 to 1,197
	Gal80ts,eYFP>enok Hefe vs Enok,Gal80ts>enok Hefe	-0,1756	3,048	No	ns	-0,4550 to 0,1039
	Gal80ts,eYFP>enok Hefe vs Enok,Gal80ts>enok PBS	0,951	16,51	Yes	***	0,6715 to 1,230
	Gal80ts,eYFP>enok PBS vs Enok,Gal80ts>enok Hefe	-1,093	18,97	Yes	***	-1,372 to -0,8135
	Gal80ts,eYFP>enok PBS vs Enok,Gal80ts>enok PBS	0,03361	0,5835	No	ns	-0,2458 to 0,3131
	Enok,Gal80ts>enok Hefe vs Enok,Gal80ts>enok PBS	1,127	19,56	Yes	***	0,8471 to 1,406
mtp	Gal80ts,eYFP>enok Hefe vs Gal80ts,eYFP>enok PBS	0,4838	9,409	Yes	**	0,2344 to 0,7333
	Gal80ts,eYFP>enok Hefe vs Enok,Gal80ts>enok Hefe	-0,1286	2,502	No	ns	-0,3781 to 0,1208
	Gal80ts,eYFP>enok Hefe vs Enok,Gal80ts>enok PBS	0,72	14	Yes	***	0,4705 to 0,9694
	Gal80ts,eYFP>enok PBS vs Enok,Gal80ts>enok Hefe	-0,6125	11,91	Yes	**	-0,8619 to -0,3630
	Gal80ts,eYFP>enok PBS vs Enok,Gal80ts>enok PBS	0,2361	4,592	No	ns	0,01331 to 0,4856
	Enok,Gal80ts>enok Hefe vs Enok,Gal80ts>enok PBS	0,8486	16,5	Yes	***	0,5991 to 1,098

Abbildung 7.25: Lipoproteinexpression wird nicht während der gesamten Entwicklung von Enok kontrolliert.

(A,B) Gal80ts-abhängige Expressionsanalyse der Lipoproteine. Durch das Gal80ts-System wird eine gewebe- und zeitspezifische Überexpression von *enok* unter der Kontrolle des *enok*-Promotor erreicht. (A) Gal80ts-abhängige Expression der Lipoproteine nach einer dreistündigen Überexpression von *enok*. (B) Gal80ts-abhängige Expression der Lipoproteine nach einer 15-stündigen Überexpression von *enok*. Die Aktivität wurde zusätzlich unter verschiedenen Nahrungsbedingungen (Hefe und PBS) untersucht. Die Expression der Lipoproteine hängt im dritten Larvalstadium (nach 96h) nicht mehr von Enok ab. Enok reguliert die Lipoproteine entwicklungsabhängig. (A,B) Die jeweiligen Graphen zeigen das Originaldiagramm (Rohdaten), das von der Bio Rad Software abgebildet wurde. Die entsprechenden Tabellen enthalten die entsprechenden rel. Expressionslevel. Zur stat. Auswertung wurde One Way Anova mit der Bonferroni Korrektur durchgeführt. Fehlerbalken repräsentieren standard error of the mean (SEM) *Apoltp*, Lipid Transfer Protein; *Lpp*, Lipophorin; *Mtp*, Microsomal Triglyceride Transfer Protein.

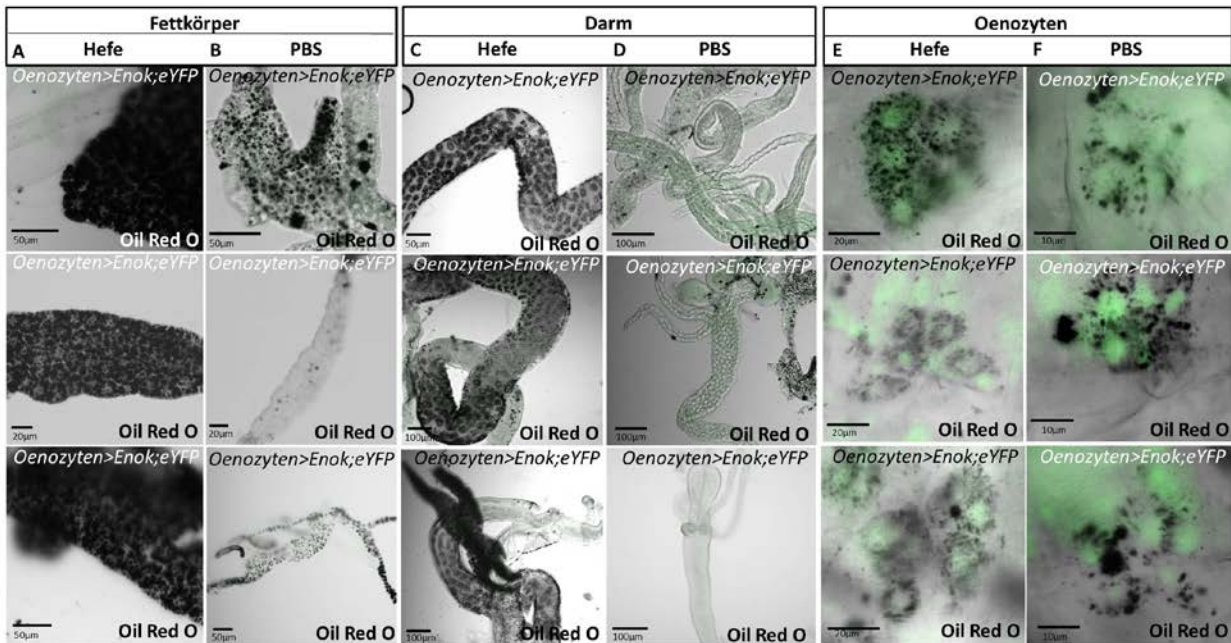
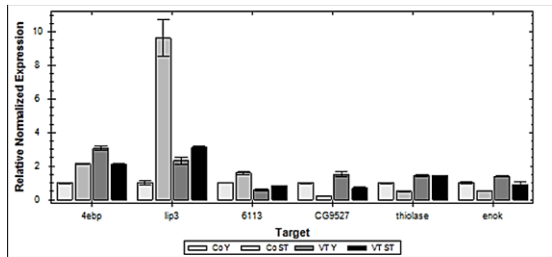


Abbildung 7.26: Auswirkung der Überexpression von *enok* in den Oenozyten auf den Lipidmetabolismus.

(A-E) Oil Red O Färbung von *enok*-Überexpressionstieren unter der Kontrolle der *Oenozyten-Gal4* Linie. Die Lipidakkumulation wird auf proteinreicher Nahrung (Hefe) und unter Hunger (PBS) in den drei Geweben, Fettkörper, Darm und Oenozyten, untersucht. Die Lipidverteilung auf Hefe im Fettkörper (A) und Darm (C) entspricht der Kontrollsituation. In den Oenozyten ist ebenfalls eine Akkumulation zu sehen (E). Nach einer Hungerperiode von 14h konnte eine Verstärkung der Lipidmobilisation und des Abbaus beobachtet werden. (B) Im Fettkörper sind nur noch vereinzelte Lipidtröpfchen gespeichert. Dies deutet auf einen gesteigerten Abbau hin. Der Darm (D) und die Oenozyten (F) verhielten sich wildtypisch. Der jeweilige Genotyp und Maßstab ist in den einzelnen Bildern festgehalten.



Target	Sample	Expression	Expression SEM	Mean Cq	Cq SEM
4ebp	Co S1/Kontrolle AA	2,14018	0,04583	17,29	0,01934
4ebp	Co Y/Kontrolle Hefe	1,00000	0,03914	20,07	0,05837
4ebp	VT ST/Oenocytes>Enok.eYFP AA	2,10435	0,05748	20,23	0,03287
4ebp	VT Y/Oenocytes>Enok.eYFP Hefe	3,06625	0,12024	18,83	0,05907
lip3	Co S1/Kontrolle AA	9,01748	1,09338	18,38	0,16229
lip3	Co Y/Kontrolle Hefe	1,00000	0,11584	22,87	0,16711
lip3	VT ST/Oenocytes>Enok.eYFP AA	3,10801	0,10482	22,27	0,04358
lip3	VT Y/Oenocytes>Enok.eYFP Hefe	2,32932	0,22512	21,83	0,13829
6113lip4	Co S1/Kontrolle AA	1,00991	0,10160	24,81	0,05807
6113lip4	Co Y/Kontrolle Hefe	1,00000	0,01858	26,45	0,02670
6113lip4	VT ST/Oenocytes>Enok.eYFP AA	0,82113	0,01250	28,03	0,00318
6113lip4	VT Y/Oenocytes>Enok.eYFP Hefe	0,59331	0,05022	27,74	0,14283
CG9527	Co S1/Kontrolle AA	0,22318	0,02624	24,11	0,16778
CG9527	Co Y/Kontrolle Hefe	1,00000	0,03989	23,40	0,05751
CG9527	VT ST/Oenocytes>Enok.eYFP AA	0,67922	0,07523	25,23	0,15824
CG9527	VT Y/Oenocytes>Enok.eYFP Hefe	1,80931	0,11061	23,24	0,14071
thiolase	Co S1/Kontrolle AA	0,50089	0,05150	24,35	0,14634
thiolase	Co Y/Kontrolle Hefe	1,00000	0,02787	24,22	0,04930
thiolase	VT ST/Oenocytes>Enok.eYFP AA	1,42340	0,03027	25,11	0,02833
thiolase	VT Y/Oenocytes>Enok.eYFP Hefe	1,45455	0,05670	24,21	0,04623
enok	Co S1/Kontrolle AA	0,53772	0,01563	25,97	0,03438
enok	Co Y/Kontrolle Hefe	1,00000	0,04818	26,04	0,06942
enok	VT ST/Oenocytes>Enok.eYFP AA	0,31044	0,18822	27,47	0,29747
enok	VT Y/Oenocytes>Enok.eYFP Hefe	1,04111	0,03302	25,99	0,01113

Gene	One Way ANOVA		Signif. cant? P < 0,05?	Summary	95% CI of diff	
	Bonferroni's Multiple Comparison Test	Mean Diff.				
4ebp	Kontrolle Hefe vs Kontrolle AA	-1,14	10,56	Yes	**	-1,859 to -0,6211
	Kontrolle Hefe vs Oenocytes>Enok.eYFP Hefe	-2,060	19,31	Yes	**	-2,586 to -1,547
	Kontrolle Hefe vs Oenocytes>Enok.eYFP AA	-1,104	10,32000	Yes	**	-1,623 to -0,5852
	Kontrolle AA vs Oenocytes>Enok.eYFP Hefe	-0,6261	8,85500	Yes	**	-1,445 to -0,4070
	Kontrolle AA vs Oenocytes>Enok.eYFP AA	0,03577	0,33430	No	ns	-0,4833 to 0,5548
	Oenocytes>Enok.eYFP Hefe vs Oenocytes>Enok.eYFP AA	0,5618	8,99000	Yes	**	0,4428 to 1,481
lip3	Kontrolle Hefe vs Kontrolle AA	-8,617	10,81	Yes	**	-12,48 to -4,751
	Kontrolle Hefe vs Oenocytes>Enok.eYFP Hefe	-1,32	1,856	No	ns	-5,187 to 2,548
	Kontrolle Hefe vs Oenocytes>Enok.eYFP AA	-2,108	2,645	No	ns	-5,875 to 1,759
	Kontrolle AA vs Oenocytes>Enok.eYFP Hefe	7,297	9,155	Yes	**	3,431 to 11,16
	Kontrolle AA vs Oenocytes>Enok.eYFP AA	6,509	8,187	Yes	**	2,843 to 10,33
	Oenocytes>Enok.eYFP Hefe vs Oenocytes>Enok.eYFP AA	-0,7877	0,9883	No	ns	-4,354 to 3,079
lip4	Kontrolle Hefe vs Kontrolle AA	-0,0968	7,132	Yes	*	-1,019 to -0,1944
	Kontrolle Hefe vs Oenocytes>Enok.eYFP Hefe	0,4067	4,782	No	ns	-0,005629 to 0,8182
	Kontrolle Hefe vs Oenocytes>Enok.eYFP AA	0,1788	2,103	No	ns	-0,2387 to 0,9913
	Kontrolle AA vs Oenocytes>Enok.eYFP Hefe	1,014	11,92	Yes	**	0,5011 to 1,426
	Kontrolle AA vs Oenocytes>Enok.eYFP AA	0,7257	9,24	Yes	**	0,3732 to 1,198
	Oenocytes>Enok.eYFP Hefe vs Oenocytes>Enok.eYFP AA	-0,2729	2,63	No	ns	0,0404 to 0,846
CG9527	Kontrolle Hefe vs Kontrolle AA	0,7768	6,278	Yes	*	0,1764 to 1,377
	Kontrolle Hefe vs Oenocytes>Enok.eYFP Hefe	-0,5059	4,088	No	ns	-1,106 to 0,09450
	Kontrolle Hefe vs Oenocytes>Enok.eYFP AA	0,3203	2,59200	No	ns	-0,2796 to 0,9212
	Kontrolle AA vs Oenocytes>Enok.eYFP Hefe	-1,283	10,36000	Yes	**	-1,883 to -0,6823
	Kontrolle AA vs Oenocytes>Enok.eYFP AA	-0,4561	3,88600	No	ns	-1,056 to 0,1444
	Oenocytes>Enok.eYFP Hefe vs Oenocytes>Enok.eYFP AA	0,8267	6,67000	Yes	*	0,3253 to 1,427
thiolase	Kontrolle Hefe vs Kontrolle AA	0,499	7,943	Yes	**	0,1942 to 0,8038
	Kontrolle Hefe vs Oenocytes>Enok.eYFP Hefe	-0,4540	7,235	Yes	*	-0,7593 to -0,1499
	Kontrolle Hefe vs Oenocytes>Enok.eYFP AA	-0,4234	6,739	Yes	*	-0,7282 to -0,1186
	Kontrolle AA vs Oenocytes>Enok.eYFP Hefe	-0,9530	15,18	Yes	**	-1,258 to -0,6488
	Kontrolle AA vs Oenocytes>Enok.eYFP AA	-0,9224	14,63	Yes	**	-1,227 to -0,6176
	Oenocytes>Enok.eYFP Hefe vs Oenocytes>Enok.eYFP AA	0,03115	0,4658	No	ns	-0,2736 to 0,3759
enok	Kontrolle Hefe vs Kontrolle AA	0,4623	3,307	No	ns	-0,2159 to 1,140
	Kontrolle Hefe vs Oenocytes>Enok.eYFP Hefe	-0,4011	2,864	No	ns	-1,079 to 0,2770
	Kontrolle Hefe vs Oenocytes>Enok.eYFP AA	0,08856	0,6407	No	ns	-0,5886 to 0,1867
	Kontrolle AA vs Oenocytes>Enok.eYFP Hefe	-0,3634	6,176	Yes	*	-1,547 to -0,1863
	Kontrolle AA vs Oenocytes>Enok.eYFP AA	-0,3727	2,989	No	ns	-1,051 to 0,3054
	Oenocytes>Enok.eYFP Hefe vs Oenocytes>Enok.eYFP AA	0,4907	3,51	No	ns	0,1874 to 1,199

Abbildung 7.27. Transkriptionelle Analyse der Überexpression von *enok* in den Oenozysten.

enok-Überexpressionstieren unter der Kontrolle der *Oenozysten-Gal4* Linie.

Transkriptionelle Analyse der *enok*-Überexpressionstieren unter der Kontrolle des Oenozysten-Treibers. Untersucht wurde die Expression des Wachstumsarrestgens *4ebp* und der Hungermarker *Lip3* und *Lip4*. Weiterhin wurden Gene der β -Oxidation angeschaut und die Expression von *enok*. Die Expression der Gene deutete auf einen verstärkten Lipidabbau hin und bestätigte die Oil Red O Ergebnisse. Der Graph zeigt das Originaldiagramm (Rohdaten), das von der Bio Rad Software abgebildet wurde. Die entsprechende Tabelle enthält die rel. Expressionslevel. Zur stat. Auswertung wurde One Way Anova mit der Bonferroni Korrektur durchgeführt. Fehlerbalken repräsentieren standard error of the mean (SEM). *4ebp*, eukaryotischer Initiationsfaktor 4E-Bindeprotein; *Lip3*, *Lipase3*; *Lip4/CG6113*, *Lipase4*.

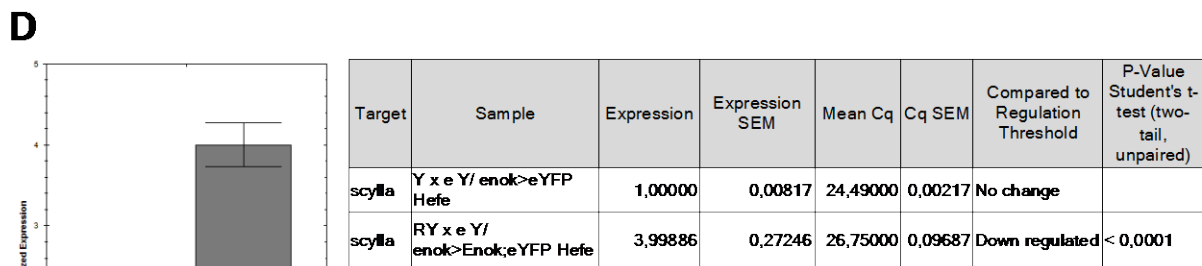
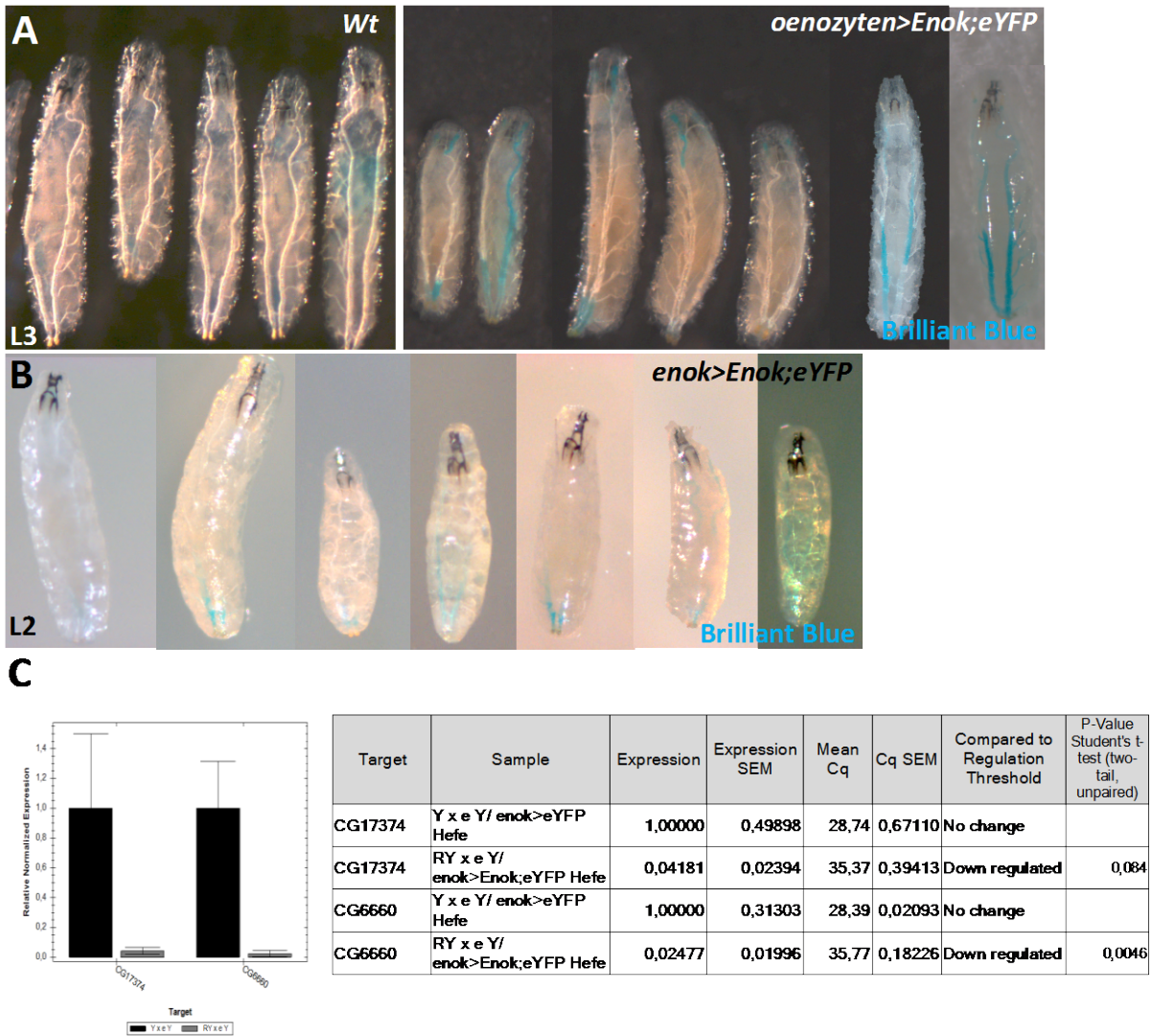


Abbildung 7.28: Enok ist verantwortlich für die Abdichtung des respiratorischen Systems.

(A,B) Um die Abdichtung der Spirakel zu testen, wird der Wasserabdichtungs-Test verwendet. Dazu werden Larven nicht länger als zehn Minuten in einer 0,1%igen Brilliant Blue Lösung gebadet. Dadurch kann man testen, ob und wie viel Flüssigkeit in die Tracheen eintritt. (A) Bei einer Überexpression von *enok* in den Oenozyten mit dem *Oenozyten*-Treiber wurde ein Eintritt der Flüssigkeit in die

anterioren und posterioren Spirakel festgestellt. Larven befanden sich im dritten Larvalstadium. (B) Bei einer Überexpression von *enok* in den Oenozyten mit dem *enok*-Treiber liefen die Tracheen bereits in Larven voll, die sich im zweiten Larvalstadium befanden. Der Defekt scheint bei einer Überexpression mit dem *enok*-Treiber stärker zu sein, da hier noch andere Gewebe, die im Metabolismus eine wichtige Rolle spielen, betroffen sind. (C) Die transkriptionelle Analyse der Fettsäuresynthese-Gene, die für die Herstellung der VLCFA verantwortlich sind, zeigte eine starke Reduktion dieser Gene. (D) In den Überexpressionstieren der Kreuzung *enok>Enok;eYFP* wurde eine Induktion vom Hypoxiemarker *scylla* detektiert. Die Originalgraphen (Rohdaten) sind in (C) und (D) zu sehen, die von der Bio Rad Software abgebildet wurden. Die Tabellen enthalten die Expressionslevel. Die stat. Auswertung wurde mittels des Student's T-Test bestimmt. Fehlerbalken repräsentieren standard error of the mean (SEM). VLCFA, very long chain fatty acid.

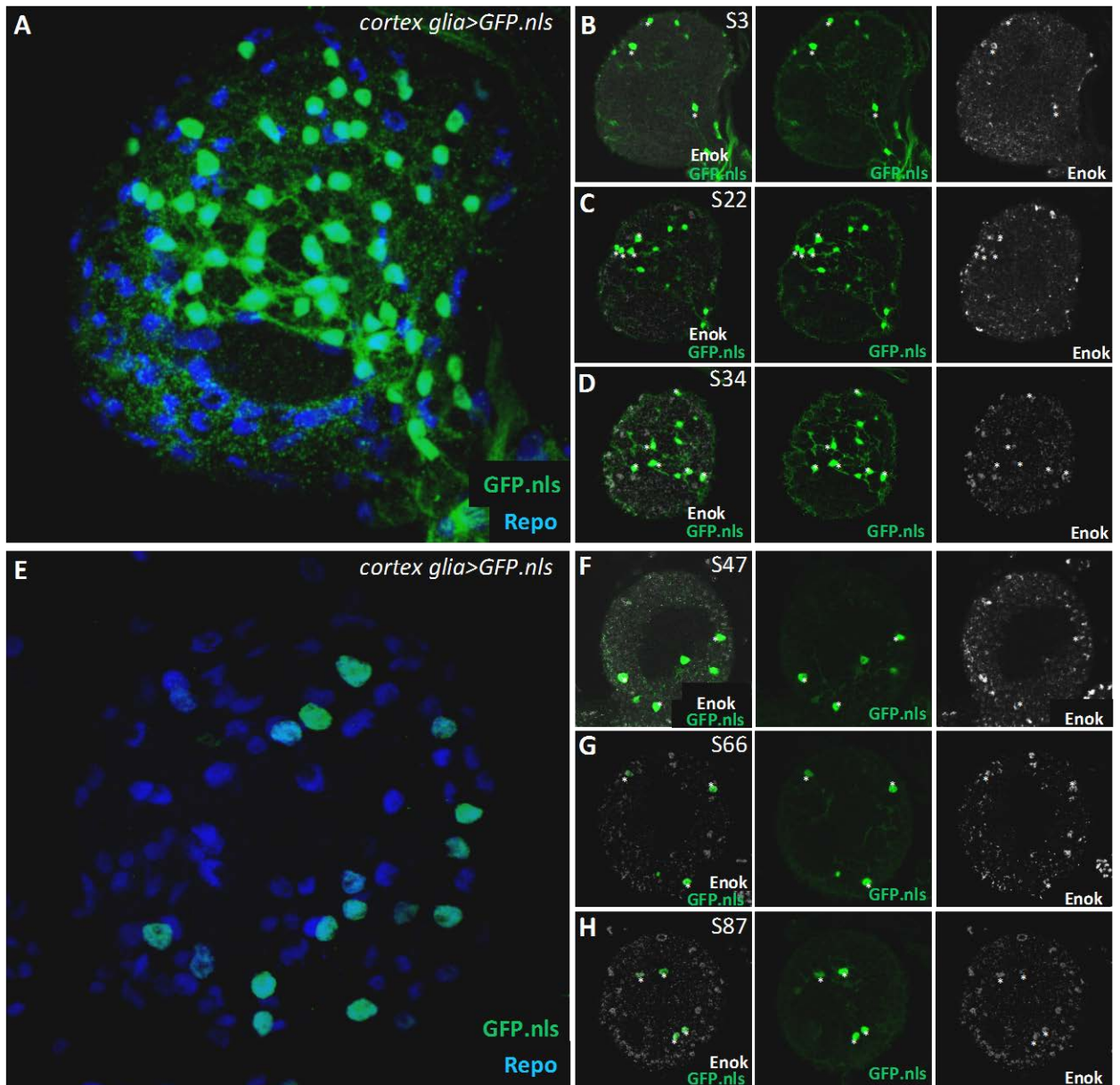


Abbildung 7.29: Enok ist in der Cortex Glia exprimiert.

(A und B) Immunfluoreszenz-Färbung der kernlokalisierten GFP-Expression (grün) unter der Kontrolle der *cortex glia-Gal4*. Die Gegenfärbung mit α -Repo AK markiert alle Glia Zellen. Das GFP-Signal ist ausschließlich in Glia Zellen zu sehen. Doch nicht alle Glia Zellen sind GFP-positiv. Die *cortex glia-Gal4* Linie ist nur in der Cortex Glia aktiv. Verschiedene Ebenen sind in (B,C,D und F,G,H) gezeigt. Jede Ebene zeigt eine Co-Färbung von Enok (weiß) und dem GFP-Signal. Zellen, die positiv für beide Signale sind, sind mit einem Stern markiert. Jede GFP-positive Zelle ist auch positiv für Enok. S, Slide, die Zahl dahinter ist die Nummer des Slides in der Maximumprojektion. Primäre Antikörper: (A-D) chicken α -GFP; (A) mouse α -Repo; (B-D) rat α -Enok.

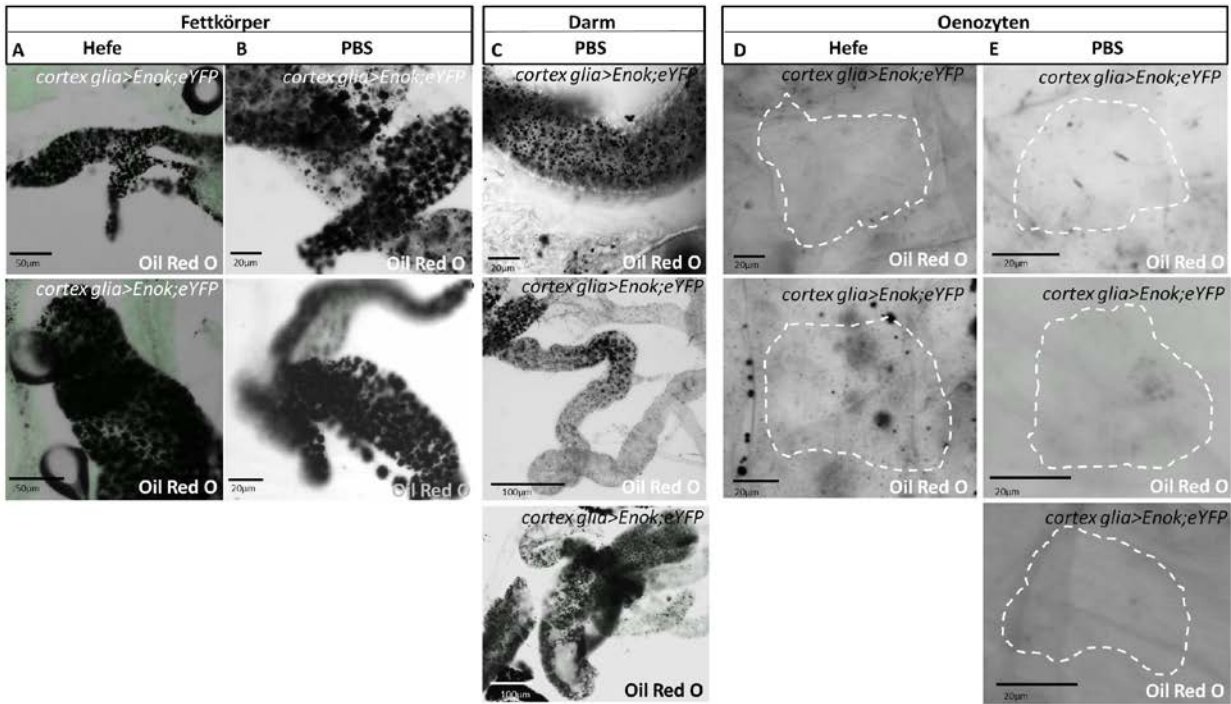


Abbildung 7.30: Auswirkung auf den Lipidmetabolismus bei der Überexpression von *enok* unter der Kontrolle des *Cortex glia*-Treibers.

Die Überexpression von *enok* spezifisch in der Cortex Glia kopiert den *enok*-Phänotyp. (A-E) Die Lipidakkumulation gezeigt mittels Oil Red O wird auf proteinreicher Nahrung (Hefe) und unter Hunger (PBS) in den drei Geweben, Fettkörper, Darm und Oenozyten, gezeigt. Im Fall der *enok*-Überexpression in der Cortex Glia sah die Verteilung der Lipide auf Hefe aus wie im Wildtyp und wie bei der *enok*-Überexpression unter der Kontrolle des *enok*-Promotors. Lipide wurden im Fettkörper (A), jedoch keine in den Oenozyten (D) detektiert. Nach 14stündigem Nahrungsentzug (PBS) konnte kein Lipidabbau festgestellt werden. Die Lipide wurden im Fettkörper (B) und zu großen Mengen im Darm (C) detektiert. Die Akkumulation in den Oenozyten (E) fand nicht statt. Die Oenozyten in D und E sind mit weißer gestrichelter Linie umrandet. Der jeweilige Genotyp und Maßstab ist in den einzelnen Bildern festgehalten.

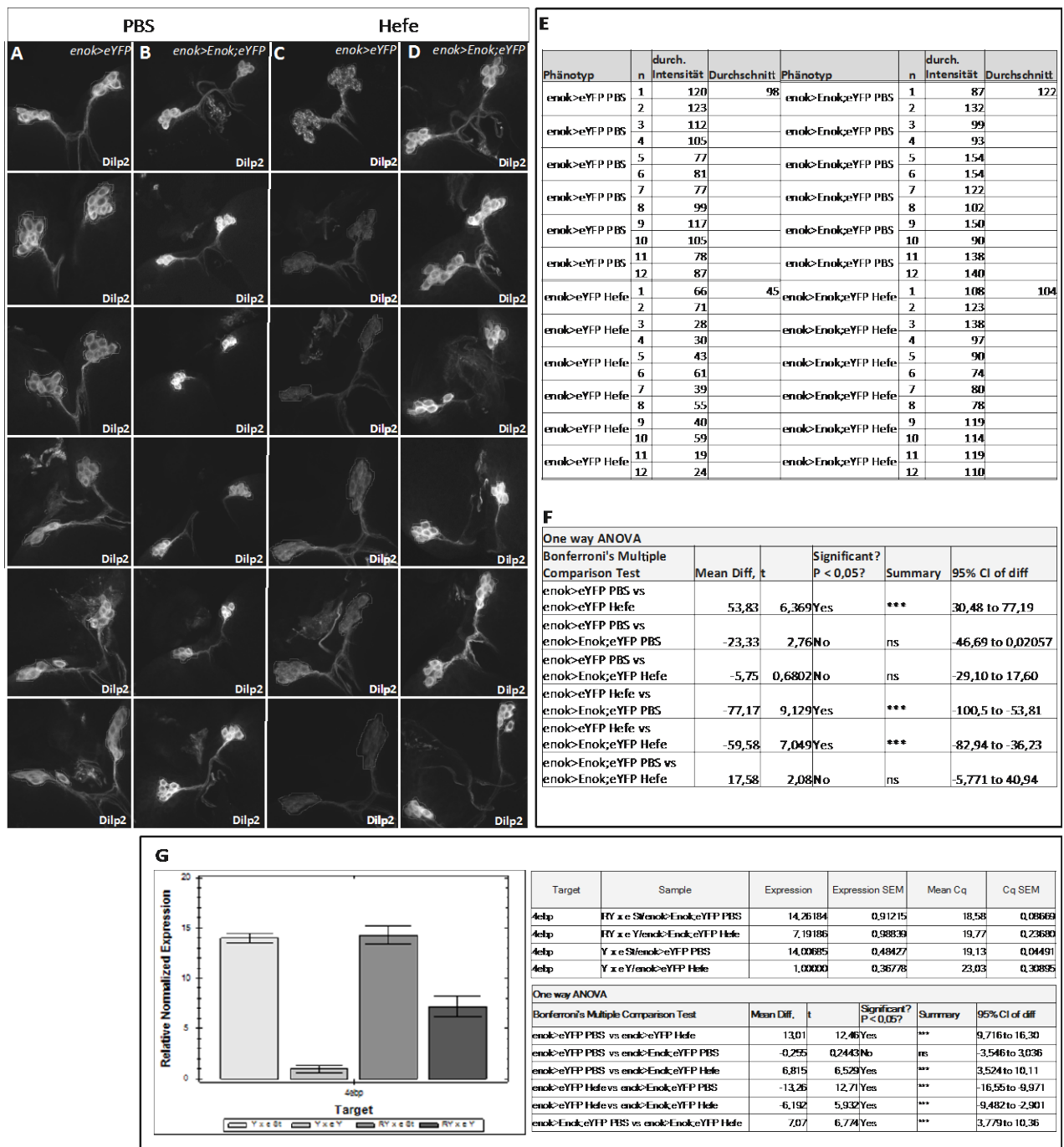


Abbildung 7.31: Dilp2 Sekretion wird durch *enok*-Überexpression verhindert.

Die Dilp2 Akkumulation oder Sekretion in und aus den neurosekretorischen Zellen -den Insulin-like peptide producing cells (IPCs)- wird nahrungsabhängig reguliert. Nach der jeweiligen Ernährungs-Behandlung werden die Gehirne entnommen und *Drosophila* Insulin-like peptide 2 (Dilp2) wird mittels einer Immunfluoreszenz-Färbung und Mikroskopie detektiert. Die Lasereinstellungen werden an die Akkumulation, welche während des Hungerns stattfindet, angepasst und nicht mehr verändert. Die ROI, die zur Quantifizierung benutzt wurden, sind in den einzelnen Bildern eingezeichnet. (A,C) Dilp2 Signal in den IPCs der Kontrolle *enok>eYFP*. (A) Akkumulation von Dilp2 nach 14h Nahrungsentzug. (C) Auf proteinreicher Nahrung wird Dilp2 sezerniert. Die IPCs sind deshalb kaum sichtbar. (B,D) *enok*-Überexpression unter der Kontrolle des *enok*-Promotors verhindert die Sekretion von Dilp2 auf proteinreicher Nahrung (D). Bei Nahrungsentzug ist die Akkumulation leicht erhöht, jedoch nicht signifikant (B). (E) Quantifizierte Fluoreszenz Intensität für Dilp2 der Genotypen in A-D unter verschiedenen Nahrungsbedingungen. (F) Statistische Auswertung mittels One Way Anova mit der Bonferroni Korrektur der Quantifizierung in (E). (G) Insulinsignalweg-Zielgen und Wachstumsarrestmarker *4ebp* reagiert auf die Dilp2-Sekretion in der Peripherie. Während der Akkumulation von Dilp2 auf PBS wird die Transkription von *4ebp* induziert. Bei proteinreicher Nahrung wird die Transkription gehemmt. In *enok*-Überexpressionstieren findet diese Anpassung nicht statt. Balkendiagramm in (G) zeigt den Originalgraph (Rohdaten) der Bio Rad Software. Die dazugehörige Tabelle zeigt die rel-Expressionswerte und stat. Auswertung. Fehlerbalken repräsentieren standard error of the mean (SEM). *4ebp*, eukaryotischer Initiationsfaktor 4E-Bindeprotein. Primärer Antikörper: (A-D) guinea pig α -Dilp2.

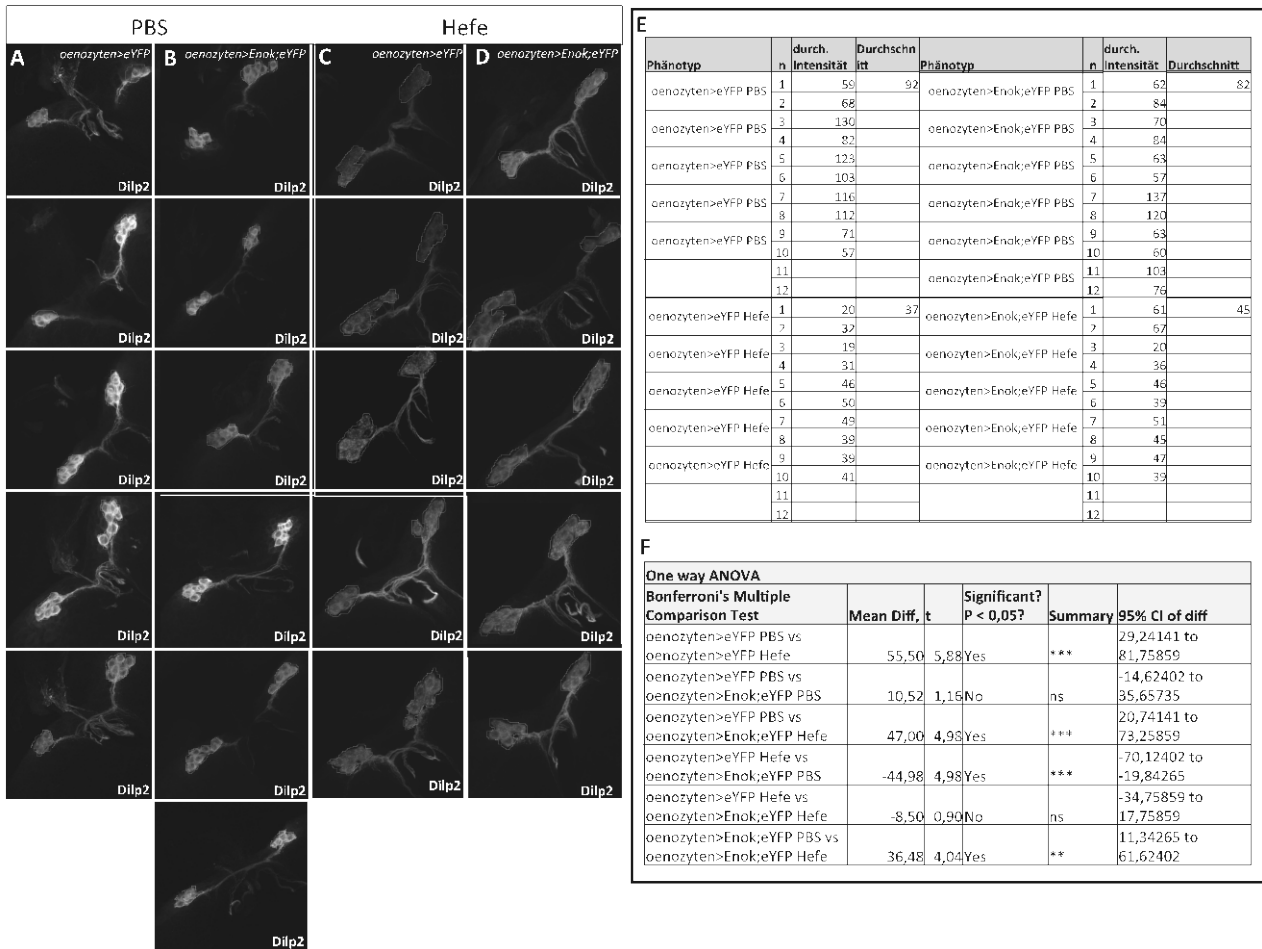
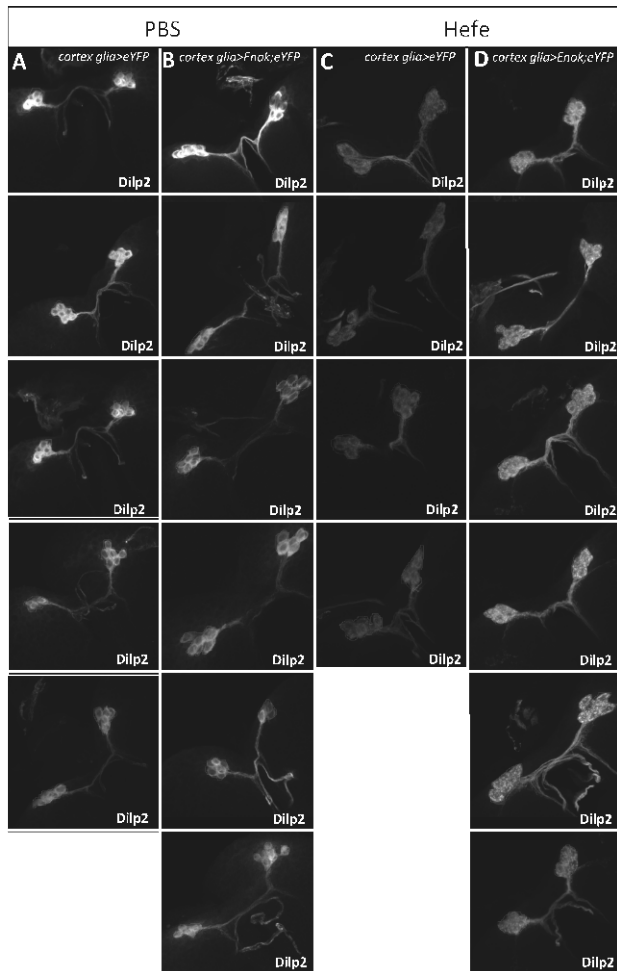


Abbildung 7.32: *enok*-Überexpression in den Oenozyten ist nicht für die Dilp2 Retention in den IPCs auf proteinreicher Nahrung verantwortlich.

(A,C) Dilp2 Signal in den IPCs der Kontrolle *oenozyten>eYFP*. (A) Akkumulation von Dilp2 nach 14h Nahrungsentzug. (C) Auf proteinreicher Nahrung wird Dilp2 sezerniert. Die IPCs sind deshalb kaum sichtbar. (B,D) Dilp2 Signal in den IPCs der Kreuzung *oenozyten> Enok;eYFP* unterscheidet sich nicht von der Kontrolle. Sowohl bei Hungerbedingung (B), als auch auf proteinreicher Nahrung (D), reagieren diese Larven wildtypisch. (E) Quantifizierte Fluoreszenz Intensität für Dilp2 der Genotypen in A-D unter verschiedenen Nahrungsbedingungen. Die ROI, die zur Quantifizierung benutzt wurden, sind in den einzelnen Bildern eingezeichnet. (F) Statistische Auswertung mittels One Way Anova mit der Bonferroni Korrektur der Quantifizierung in (E). Fehlerbalken repräsentieren standard error of the mean (SEM). Primärer Antikörper: (A-D) guinea pig α -Dilp2.



E

Phänotyp	n	durch. Intensität	Durchschnitt	Phänotyp	n	durch. Intensität	Durchschnitt
cortex glia>eYFP PBS	1	104	88	cortex glia>Enok,eYFP PBS	1	128	88
	2	135			2	136	
cortex glia>eYFP PBS	3	118		cortex glia>Enok,eYFP PBS	3	118	
	4	116			4	82	
cortex glia>eYFP PBS	5	86		cortex glia>Enok,eYFP PBS	5	48	
	6	112			6	76	
cortex glia>eYFP PBS	7	79		cortex glia>Enok,eYFP PBS	7	84	
	8	64			8	68	
cortex glia>eYFP PBS	9	59		cortex glia>Enok,eYFP PBS	9	59	
	10	63			10	66	
	11			cortex glia>Enok,eYFP PBS	11	92	
	12				12	94	
cortex glia>eYFP Hefe	1	67	49	cortex glia>Enok,eYFP Hefe	1	101	87
	2	60			2	87	
cortex glia>eYFP Hefe	3	56		cortex glia>Enok,eYFP Hefe	3	99	
	4	40			4	85	
cortex glia>eYFP Hefe	5	52		cortex glia>Enok,eYFP Hefe	5	90	
	6	61			6	93	
cortex glia>eYFP Hefe	7	31		cortex glia>Enok,eYFP Hefe	7	97	
	8	22			8	96	
	9			cortex glia>Enok,eYFP Hefe	9	85	
	10				10	92	
	11			cortex glia>Enok,eYFP Hefe	11	62	
	12				12	62	

F

One way ANOVA				
Bonferroni's Multiple Comparison Test	Mean Diff, t	Significant? P < 0,05?	Summary	95% CI of diff
cortex glia>eYFP PBS vs cortex glia>eYFP Hefe	45,28 4,269	Yes	***	23,81 to 66,74
cortex glia>eYFP PBS vs cortex glia>Enok,eYFP PBS	6,15 0,6424	No	ns	-13,23 to 25,53
cortex glia>eYFP PBS vs cortex glia>Enok,eYFP Hefe	6,48 0,6773	No	ns	-12,90 to 25,86
cortex glia>eYFP Hefe vs cortex glia>Enok,eYFP PBS	-39,13 3,834	Yes	***	-59,78 to -18,47
cortex glia>eYFP Hefe vs cortex glia>Enok,eYFP Hefe	-38,79 3,801398	Yes	***	-59,45 to -18,13
cortex glia>Enok,eYFP PBS vs cortex glia>Enok,eYFP Hefe	0,33 0,03652	No	ns	-18,14 to 18,81

Abbildung 7.33: Die Überexpression von *enok* in der Cortex Glia ist für die Dilp2 Retention in den IPCs auf proteinreicher Nahrung verantwortlich.

Wird *enok* in der Cortex Glia exprimiert, wird der Phänotyp kopiert, welcher auch unter der Kontrolle des *enok*-Promotors beobachtet wurde. (A-D) Die Immunfluoreszenz-Färbung des Dilp2 Signals zeigt, dass Enok in der Cortex Glia für die Ausschüttung von Dilp2 auf proteinreicher Nahrung verantwortlich ist. (A,C) Dilp2 Signal in den IPCs unter der Kontrolle *cortex glia>eYFP*. (A) Akkumulation von Dilp2 nach 14h Nahrungsentzug. (C) Auf proteinreicher Nahrung wird Dilp2 sezerniert. Die IPCs sind deshalb kaum sichtbar. (B) Bei der Überexpression in der Cortex Glia wird Dilp2 in den IPCs bei Nahrungsentzug akkumuliert. (D) Auf proteinreicher Nahrung wird die Sekretion von Dilp2 verhindert. (E) Quantifizierte Fluoreszenz Intensität für Dilp2 der Genotypen in A-D unter verschiedenen Nahrungsbedingungen. Die ROI, die zur Quantifizierung benutzt wurden, sind in den einzelnen Bildern eingezeichnet. (F) Statistische Auswertung mittels One Way Anova mit der Multitest Bonferroni Korrektur der Quantifizierung in (E). Fehlerbalken repräsentiert standard error of the mean (SEM). Primärer Antikörper: (A-D) guinea pig α -Dilp2.

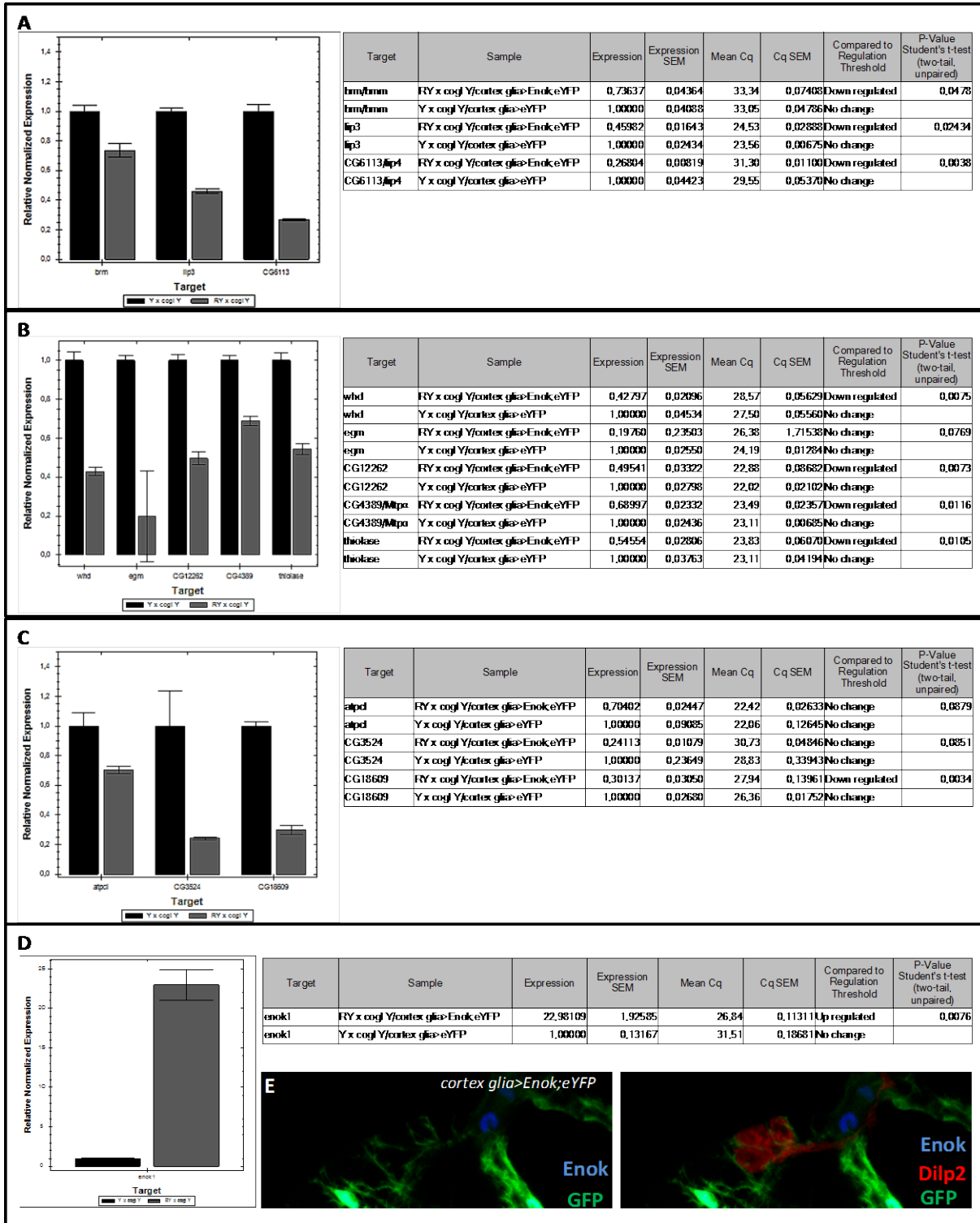
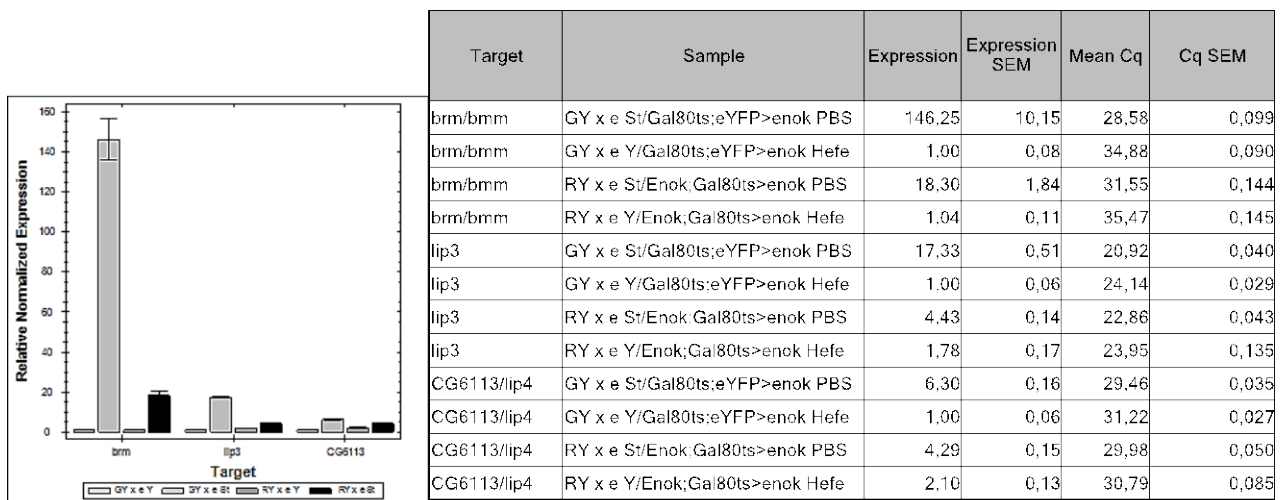


Abbildung 7.34: Systemische Kontrolle des Lipidmetabolismus in der Peripherie durch Enok in der Cortex Glia.

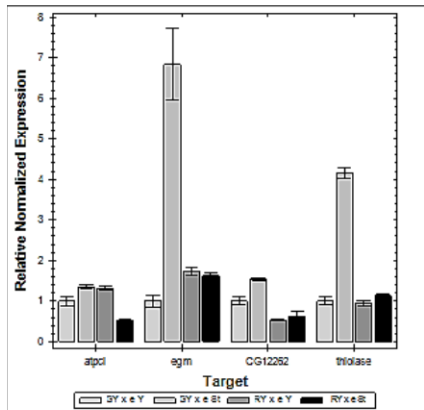
Systemische Regulation der Peripherie verursacht durch die Überexpression von *enok* in der Cortex Glia. Die Regulation geht zentral vom Gehirn aus. (A-D) Die jeweiligen Graphen zeigen das Originaldiagramm (Rohdaten), das von der Bio Rad Software abgebildet wurde. Die entsprechenden Tabellen enthalten die rel. Expressionslevel. Zur stat. Auswertungen wurde der Student's T-Test durchgeführt. (A-C) Das Expressionsprofil der Lipidmetabolismusgene wurde zwischen der Kontrolle *cortex glia>eYFP* und der Überexpressionskreuzung *cortex glia>Enok;eYFP* verglichen. Die untersuchten metabolischen Prozesse waren: (A) Lipolyse, (B) β -Oxidation und (C) Fettsäuresynthese. Die transkriptionelle Analyse zeigte eine Beeinträchtigung der Lipidmetabolismusgene. (D) zeigt die Expressionslevel von *enok*. (E) Immunfluoreszenz-Färbung der IPCs. Cortex Glia Zellen (GFP-positiv, grün) ummanteln die IPCs (Dilp2-positiv, rot) und beeinflussen möglicherweise somit direkt die Ausschüttung von Dilp2. Enok Signal (blau) markiert den Zellkern der Cortex Glia Zelle markiert. Fehlerbalken repräsentieren standard error of the mean (SEM). Primäre Antikörper: (D) chicken α -GFP, guinea pig α -Dilp2, rat α -Enok. *ATPCL*, *ATP-Citrat Lyase*; *bmm*, *Brummer*; *egm*, *enigma*; *Lip3*, *Lipase3*; *Lip4*, *Lipase4*; *Mtpa/CG4389*, *Mitochondrial trifunctional protein a subunit*; *whd*, *withered*.



One way ANOVA						
Gene	Bonferroni's Multiple Comparison Test	Mean Diff.	t	Significant? P < 0,05?	Summary	95% CI of diff
bmm	Gal80ts:eYFP>enok Hefe vs Gal80ts:eYFP>enok PBS	-145,3	19,92	Yes	***	-180,6 to -109,9
	Gal80ts:eYFP>enok Hefe vs Enok;Gal80ts>enok Hefe	-0,037	0,005175	No	ns	-35,41 to 35,34
	Gal80ts:eYFP>enok Hefe vs Enok;Gal80ts>enok PBS	-17,3	2,37200	No	ns	-52,68 to 18,07
	Gal80ts:eYFP>enok PBS vs Enok;Gal80ts>enok Hefe	145,2	19,91000	Yes	***	109,8 to 180,6
	Gal80ts:eYFP>enok PBS vs Enok;Gal80ts>enok PBS	128	17,55000	Yes	***	92,58 to 163,3
	Enok;Gal80ts>enok Hefe vs Enok;Gal80ts>enok PBS	-17,26	2,36700	No	ns	-52,64 to 18,11
Lip3	Gal80ts:eYFP>enok Hefe vs Gal80ts:eYFP>enok PBS	-16,33	41,67	Yes	***	-18,23 to -14,43
	Gal80ts:eYFP>enok Hefe vs Enok;Gal80ts>enok Hefe	-0,78	1,986	No	ns	-2,680 to 1,123
	Gal80ts:eYFP>enok Hefe vs Enok;Gal80ts>enok PBS	-3,434	8,761	Yes	**	-5,335 to -1,533
	Gal80ts:eYFP>enok PBS vs Enok;Gal80ts>enok Hefe	15,55	39,69	Yes	***	13,65 to 17,46
	Gal80ts:eYFP>enok PBS vs Enok;Gal80ts>enok PBS	12,9	32,91	Yes	***	11,00 to 14,80
	Enok;Gal80ts>enok Hefe vs Enok;Gal80ts>enok PBS	-2,656	6,775	Yes	*	-4,557 to -0,7543
Lip4	Gal80ts:eYFP>enok Hefe vs Gal80ts:eYFP>enok PBS	-5,304	28,18	Yes	***	-6,217 to -4,391
	Gal80ts:eYFP>enok Hefe vs Enok;Gal80ts>enok Hefe	-1,1	5,847	Yes	*	-2,013 to -0,1875
	Gal80ts:eYFP>enok Hefe vs Enok;Gal80ts>enok PBS	-3,29	17,48	Yes	***	-4,203 to -2,377
	Gal80ts:eYFP>enok PBS vs Enok;Gal80ts>enok Hefe	4,204	22,34	Yes	***	3,291 to 5,117
	Gal80ts:eYFP>enok PBS vs Enok;Gal80ts>enok PBS	2,014	10,7	Yes	**	1,101 to 2,927
	Enok;Gal80ts>enok Hefe vs Enok;Gal80ts>enok PBS	-2,19	11,64	Yes	**	-3,103 to -1,277

Abbildung 7.35: Entwicklungsunabhängiger Effekt von Enok auf die Lipolyse.

Gal80ts-abhängige Expressionsanalysen ermöglichen es Effekte, die durch die Entwicklung verursacht werden, auszuschließen. Hier abgebildet ist die Gal80ts-abhängige transkriptionelle Analysen der Lipolyse Die Überexpression wurde nach 96h auf 18° C mit der Temperaturänderung auf 29°C für 15h aktiviert. Die Aktivität wurde zusätzlich unter verschiedenen Nahrungsbedingungen (Hefe und PBS) untersucht. Der Graph zeigt das Originaldiagramm (Rohdaten), das von der Bio Rad Software abgebildet wurde. Die entsprechende Tabelle enthält die rel. Expressionslevel. Zur stat. Auswertung wurde One Way Anova mit der Bonferroni Korrektur durchgeführt. Fehlerbalken repräsentieren standard error of the mean (SEM). *bmm*, *Brummer*; *Lip3*, *Lipase3*; *Lip4/CG6113*, *Lipase4*.



Target	Sample	Expression	Expression SEM	Mean Cq	Cq SEM
atpcl	GY x e St/Gal80ts:eYFP>enok PBS	1,34663	0,05309	26,26	0,05511
atpcl	GY x e Y/Gal80ts:eYFP>enok Hefe	1,00000	0,11442	24,51	0,09239
atpcl	RY x e St/Enok;Gal80ts>enok PBS	0,52993	0,01041	27,36	0,00997
atpcl	RY x e Y/Enok;Gal80ts>enok Hefe	1,31862	0,05966	24,53	0,03000
egm	GY x e St/Gal80ts:eYFP>enok PBS	6,83790	0,87758	25,81	0,18462
egm	GY x e Y/Gal80ts:eYFP>enok Hefe	1,00000	0,14633	26,41	0,16080
egm	RY x e St/Enok;Gal80ts>enok PBS	1,61662	0,07039	27,65	0,05694
egm	RY x e Y/Enok;Gal80ts>enok Hefe	1,71779	0,19030	26,05	0,06111
CG12262	GY x e St/Gal80ts:eYFP>enok PBS	1,53939	0,02698	24,72	0,02101
CG12262	GY x e Y/Gal80ts:eYFP>enok Hefe	1,00000	0,10177	23,17	0,05333
CG12262	RY x e St/Enok;Gal80ts>enok PBS	0,61713	0,11991	25,80	0,27907
CG12262	RY x e Y/Enok;Gal80ts>enok Hefe	0,53422	0,02151	24,49	0,00379
thiolase	GY x e St/Gal80ts:eYFP>enok PBS	4,16581	0,13136	25,59	0,04326
thiolase	GY x e Y/Gal80ts:eYFP>enok Hefe	1,00000	0,09536	25,47	0,01462
thiolase	RY x e St/Enok;Gal80ts>enok PBS	1,12729	0,06183	27,24	0,07454
thiolase	RY x e Y/Enok;Gal80ts>enok Hefe	0,94915	0,06383	25,97	0,07780

One way ANOVA						
Gene	Bonferroni's Multiple Comparison Test	Mean Diff.	t	Significant? P < 0,05?	Summary	95% CI of diff
atpcl	Gal80ts:eYFP>enok Hefe vs Gal80ts:eYFP>enok PBS	-0,3466	3,504	No	ns	-0,8266 to 0,1333
	Gal80ts:eYFP>enok Hefe vs Enok;Gal80ts>enok Hefe	-0,3186	3,22	No	ns	-0,7986 to 0,1613
	Gal80ts:eYFP>enok Hefe vs Enok;Gal80ts>enok PBS	0,4701	4,75109	No	ns	-0,009881 to 0,9500
	Gal80ts:eYFP>enok PBS vs Enok;Gal80ts>enok Hefe	0,02801	0,28310	No	ns	-0,4519 to 0,5080
	Gal80ts:eYFP>enok PBS vs Enok;Gal80ts>enok PBS	0,8167	8,25500	Yes	**	0,3367 to 1,297
	Enok;Gal80ts>enok Hefe vs Enok;Gal80ts>enok PBS	0,7887	7,97200	Yes	**	0,3087 to 1,269
egm	Gal80ts:eYFP>enok Hefe vs Gal80ts:eYFP>enok PBS	-5,838	9,193	Yes	**	-8,919 to -2,757
	Gal80ts:eYFP>enok Hefe vs Enok;Gal80ts>enok Hefe	-0,7178	1,13	No	ns	-3,798 to 2,363
	Gal80ts:eYFP>enok Hefe vs Enok;Gal80ts>enok PBS	-0,6166	0,971	No	ns	-3,697 to 2,464
	Gal80ts:eYFP>enok PBS vs Enok;Gal80ts>enok Hefe	5,12	8,063	Yes	**	2,039 to 8,201
	Gal80ts:eYFP>enok PBS vs Enok;Gal80ts>enok PBS	5,221	8,222	Yes	**	2,141 to 8,302
	Enok;Gal80ts>enok Hefe vs Enok;Gal80ts>enok PBS	0,1012	0,1593	No	ns	-2,979 to 3,182
CG12262	Gal80ts:eYFP>enok Hefe vs Gal80ts:eYFP>enok PBS	-0,5394	4,737	No	ns	-1,092 to 0,01294
	Gal80ts:eYFP>enok Hefe vs Enok;Gal80ts>enok Hefe	0,4658	4,091	No	ns	-0,08655 to 1,018
	Gal80ts:eYFP>enok Hefe vs Enok;Gal80ts>enok PBS	0,3829	3,363	No	ns	-0,1695 to 0,9352
	Gal80ts:eYFP>enok PBS vs Enok;Gal80ts>enok Hefe	1,005	8,828	Yes	**	0,4528 to 1,558
	Gal80ts:eYFP>enok PBS vs Enok;Gal80ts>enok PBS	0,9223	8,1	Yes	**	0,3699 to 1,475
	Enok;Gal80ts>enok Hefe vs Enok;Gal80ts>enok PBS	-0,08291	0,7282	No	ns	-0,6352 to 0,4694
thiolase	Gal80ts:eYFP>enok Hefe vs Gal80ts:eYFP>enok PBS	-3,166	24,19	Yes	***	-3,801 to -2,531
	Gal80ts:eYFP>enok Hefe vs Enok;Gal80ts>enok Hefe	0,05085	0,3886	No	ns	-0,5839 to 0,6856
	Gal80ts:eYFP>enok Hefe vs Enok;Gal80ts>enok PBS	-0,1273	0,9728	No	ns	-0,7621 to 0,5075
	Gal80ts:eYFP>enok PBS vs Enok;Gal80ts>enok Hefe	3,217	24,58	Yes	***	2,582 to 3,851
	Gal80ts:eYFP>enok PBS vs Enok;Gal80ts>enok PBS	3,039	23,22	Yes	***	2,404 to 3,673
	Enok;Gal80ts>enok Hefe vs Enok;Gal80ts>enok PBS	-0,1781	1,361	No	ns	-0,8129 to 0,4566

Abbildung 7.36: Entwicklungsunabhängiger Effekt von Enok auf die β -Oxidation.

Gal80ts-abhängige Expressionsanalysen ermöglichen es Effekte, die durch die Entwicklung verursacht werden, auszuschließen. Hier abgebildet ist die Gal80ts-abhängige transkriptionelle Analysen der β -Oxidation. Die Überexpression wurde nach 96h auf 18° C mit der Temperaturänderung auf 29°C für 15h aktiviert. Die Aktivität wurde zusätzlich unter verschiedenen Nahrungsbedingungen (Hefe und PBS) untersucht. Der Graph zeigt das Originaldiagramm (Rohdaten), das von der Bio Rad Software abgebildet wurde. Die entsprechende Tabelle enthält die rel. Expressionslevel. Zur stat. Auswertung wurde One Way Anova mit der Bonferroni Korrektur durchgeführt. Fehlerbalken repräsentieren standard error of the mean (SEM). *ATPCL*, *ATP-Citrat Lyase*; *egm*, *enigma*.

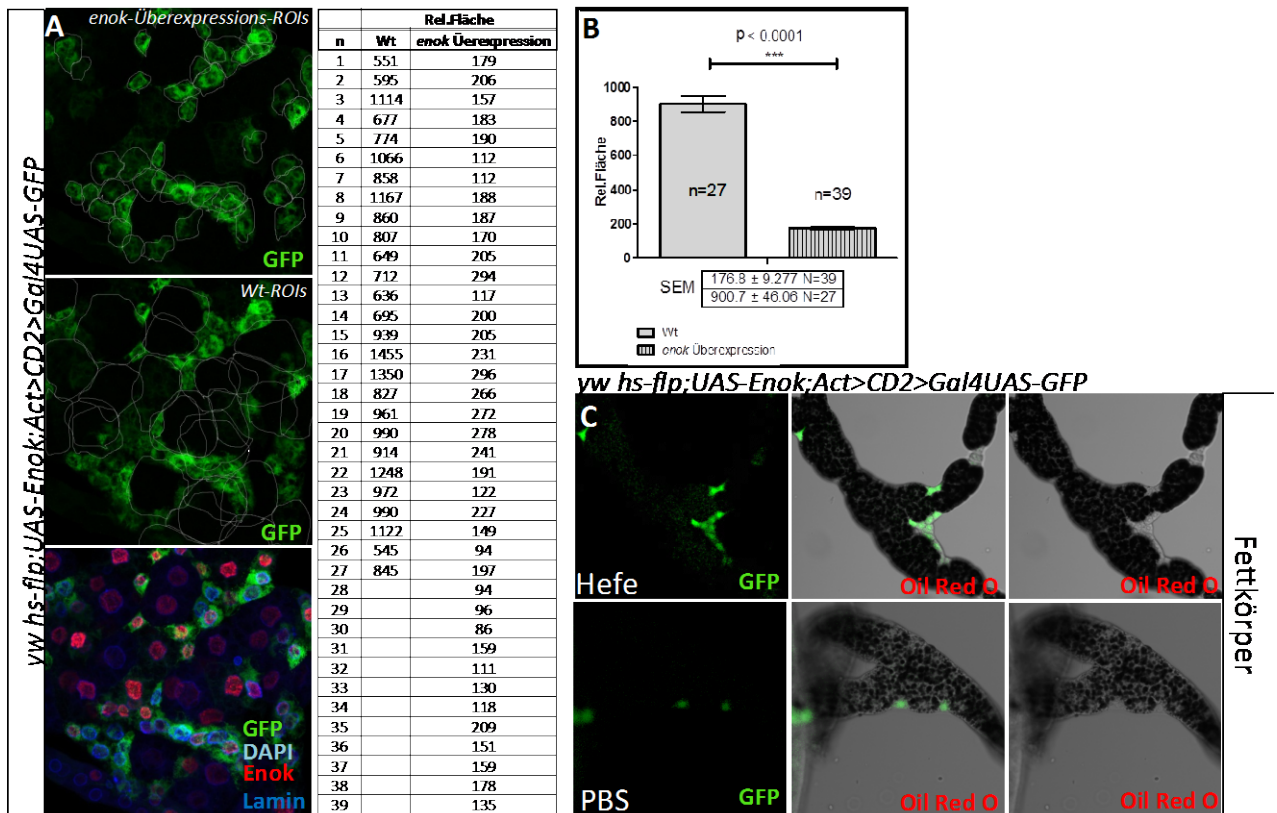


Abbildung 7.37: Enok reguliert Wachstum und Lipidmetabolismus auf zellulärer Ebene.

Klonale Analysen ermöglichen es im selben Tier und im selbe Gewebe nebeneinander Klone zu erzeugen, welche einen unterschiedlichen genetischen Hintergrund haben. Die Flip-Out Linie *yw hs-flp; Act>CD2>Gal4 UAS-GFP* wurde mit *UAS-Enok* gekreuzt. Die Nachkommen wurden ab dem Schlüpfen aus dem Ei auf 25°C gehalten. Klone, die ein GFP-Signal (grün) aufweisen, sind auch positiv für die *enok*-Überexpression. GFP-negative Zellen sind wildtypisch. Beide Zelltypen wurden quantifiziert und die ROI sind in den jeweiligen Bilder zu sehen. In der Tabelle sind die Werte der rel. Fläche zusammengefasst. (B) Zeigt die graphische Auswertung des Experiments. Die relative Fläche zeigt einen signifikanten Größenunterschied zwischen Wt und *enok*-Überexpressionszellen. Die wildtypische Zelle ist im Schnitt fast fünf Mal so groß. (C) Oil Red O Färbungen zeigen den Lipidgehalt der Zellen im Fettkörper (C) die entweder auf proteinreicher Nahrung (Hefe) oder bei Nahrungsentzug (PBS) gehalten wurden. (C) Im Fettkörper enthalten die GFP-positiven Zellen keine Lipidtröpfchen. Auch durch das Forcieren der Lipidakkumulation im Fettkörper durch proteinreiche Nahrung (Hefe) konnten keine Lipidtröpfchen in den GFP-positiven Zellen beobachtet werden. In (A,B) n=27 bei Wt und n=39 bei der Überexpression. Zur stat. Auswertung wurde der Student's T-Test durchgeführt. Fehlerbalken repräsentieren standard error of the mean (SEM). Primäre Antikörper: (A) chicken α -GFP, mouse α -Lamin, rat α -Enok.

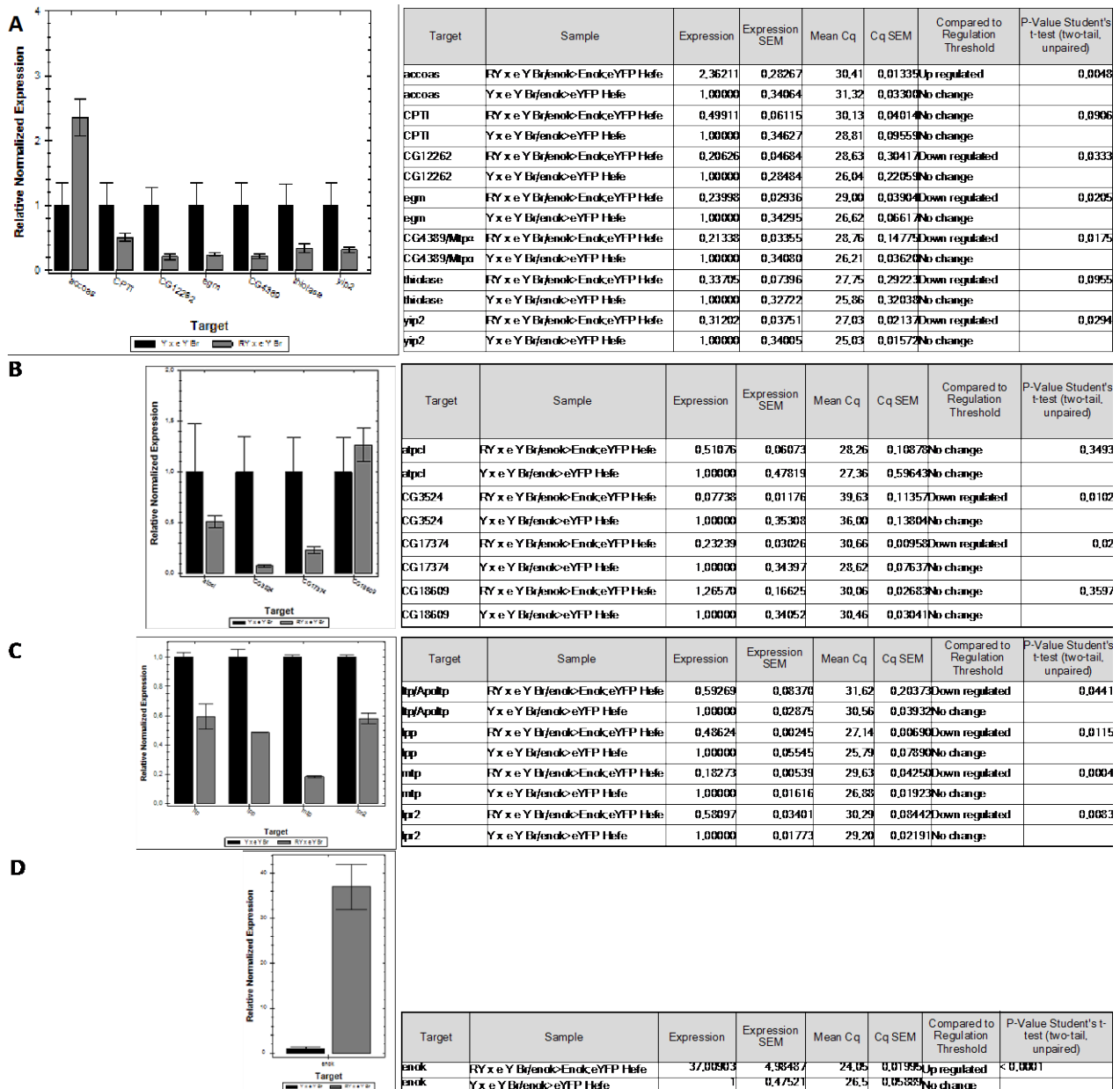


Abbildung 7.38: Kontrolle des Lipidmetabolismus im zentralen Nervensystem durch Enok.

Die transkriptionelle Analyse zeigte eine Beeinträchtigung der Lipidmetabolismus- und Lipid Transportgene im zentralen Nervensystem. (A,B) Das Expressionsprofil der Lipidmetabolismuskene. Hier wurde die Expression in Gehirnen verglichen. *enok*-Überexpressionstiere wurden mit Kontrolltieren verglichen. Gene der β -Oxidation waren signifikant reduziert (A). Im Gehirn waren die Gene der Fettsäuresynthese ebenfalls in der Transkription negativ beeinflusst (B). Regulation der Gene des Lipid Transports sind ebenfalls reguliert (C). In (D) ist das Level der *enok* Induktion dargestellt. (A-D) Die jeweiligen Graphen zeigen das Originaldiagramm (Rohdaten), das von der Bio Rad Software abgebildet wurde. Die entsprechende Tabelle enthält die rel. Expressionslevel. Zur stat. Auswertung wurde Student's T-Test durchgeführt. Fehlerbalken repräsentieren standard error of the mean (SEM). n=2. *AcCoAs*, *Acetyl-CoA Synthetase*; *Apoltp*, *Lipid Transfer Protein*; *ATPCL*, *ATP-Citrat Lyase*; *CPTI*, *Acyl-Carnitin/Carnitin-Antiporter*; *egm*, *enigma*; *Lip3*, *Lipase3*; *Lip4*, *Lipase4*; *Lpp*, *Lipophorin*; *LpR2*, *LDL receptor 2*; *Mtp*, *Microsomal Triglyceride Transfer Protein*; *Mtp α* , *Mitochondrial trifunctional protein a subunit*; *yip2*, *yippee interacting protein 2*.

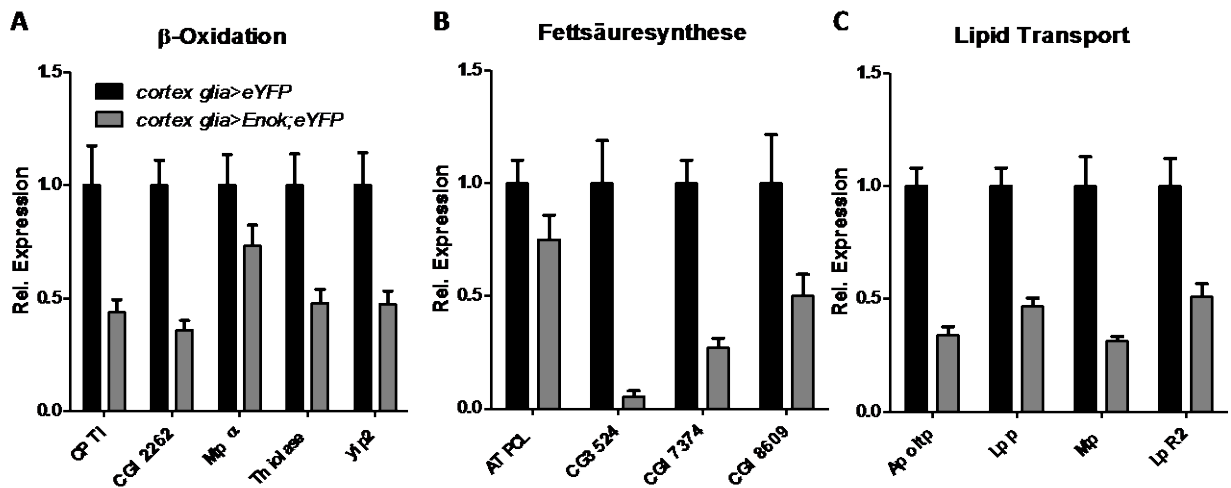
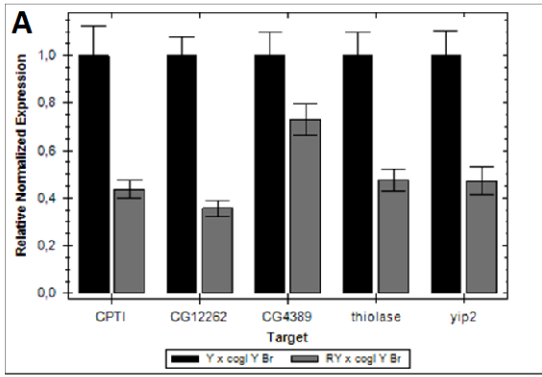
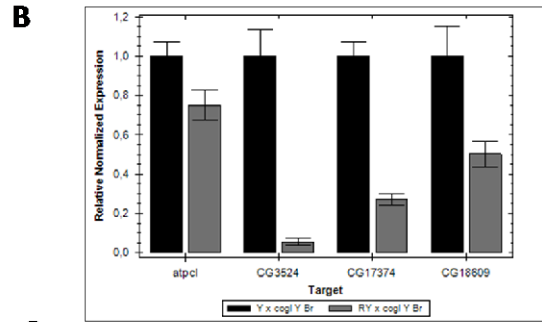


Abbildung 7.39: Kontrolle des Lipidmetabolismus im Cortex Glia Zellen durch Enok.

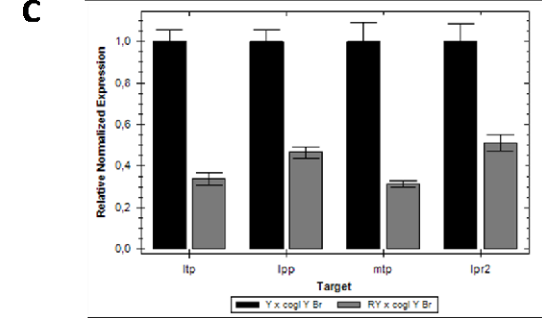
Die transkriptionelle Analyse zeigte eine Beeinträchtigung der Lipidmetabolismus- und Lipid Transportgene in der Cortex Glia. (A,B) Das Expressionsprofil der Lipidmetabolismusgene. Hier wurde die Expression in Gehirnen verglichen. *enok*-Überexpressionstiere wurden mit Kontrolltieren verglichen. Gene der β -Oxidation waren reduziert (A). In der Cortex Glia waren die Gene der Fettsäuresynthese ebenfalls in der Transkription negativ beeinflusst (B). Regulation der Gene des Lipid Transports sind ebenfalls reguliert (C). Fehlerbalken repräsentieren standard error of the mean (SEM). *Apoltp*, Lipid Transfer Protein; *ATPCL*, ATP-Citrat Lyase; *CPT1*, Acyl-Carnitin/Carnitin-Antiporter; *Lip3*, Lipase3; *Lip4*, Lipase4; *Lpp*, Lipophorin; *LpR2*, LDL receptor 2; *Mtp*, Microsomal Triglyceride Transfer Protein; *Mtp α* , Mitochondrial trifunctional protein a subunit; *yip2*, yippee interacting protein 2



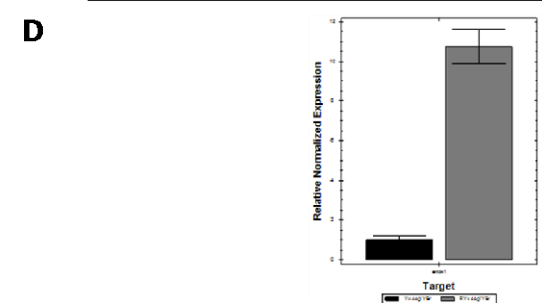
Target	Sample	Expression	Expression SEM	Mean Cq	Cq SEM
CPT1	RY x cogl Y Br/cortex glia>Enok;eYFP	0,43682	0,03984	28,73	0,03393
CPT1	Y x cogl Y Br/cortex glia>eYFP	1,00000	0,12407	30,75	0,14611
CG12262	RY x cogl Y Br/cortex glia>Enok;eYFP	0,35603	0,03154	26,78	0,01327
CG12262	Y x cogl Y Br/cortex glia>eYFP	1,00000	0,07795	28,51	0,04422
CG4389	RY x cogl Y Br/cortex glia>Enok;eYFP	0,73117	0,06453	25,97	0,00735
CG4389	Y x cogl Y Br/cortex glia>eYFP	1,00000	0,09604	28,74	0,09223
thiolase	RY x cogl Y Br/cortex glia>Enok;eYFP	0,47520	0,04449	25,86	0,04570
thiolase	Y x cogl Y Br/cortex glia>eYFP	1,00000	0,09804	28,00	0,09652
yip2	RY x cogl Y Br/cortex glia>Enok;eYFP	0,47264	0,05889	25,55	0,00000
yip2	Y x cogl Y Br/cortex glia>eYFP	1,00000	0,10127	27,69	0,10321



Target	Sample	Expression	Expression SEM	Mean Cq	Cq SEM
atpcl	RY x cogl Y Br/cortex glia>Enok;eYFP	0,75068	0,07641	24,40	0,07354
atpcl	Y x cogl Y Br/cortex glia>eYFP	1,00000	0,07171	27,21	0,00350
CG3524	RY x cogl Y Br/cortex glia>Enok;eYFP	0,05515	0,01725	38,58	0,43303
CG3524	Y x cogl Y Br/cortex glia>eYFP	1,00000	0,13331	37,62	0,16217
CG17374	RY x cogl Y Br/cortex glia>Enok;eYFP	0,27149	0,02958	33,00	0,09247
CG17374	Y x cogl Y Br/cortex glia>eYFP	1,00000	0,07217	34,34	0,01225
CG18609	RY x cogl Y Br/cortex glia>Enok;eYFP	0,50275	0,06555	31,18	0,13865
CG18609	Y x cogl Y Br/cortex glia>eYFP	1,00000	0,15189	33,41	0,19320



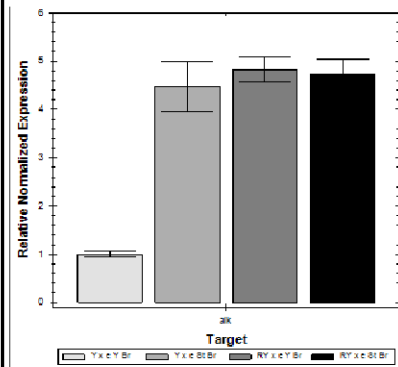
Target	Sample	Expression	Expression SEM	Mean Cq	Cq SEM
ltp/Apoltp	RY x cogl Y Br/cortex glia>Enok;eYFP	0,33811	0,02777	30,14000	0,09528
ltp/Apoltp	Y x cogl Y Br/cortex glia>eYFP	1,00000	0,05649	31,80000	0,04686
lpp	RY x cogl Y Br/cortex glia>Enok;eYFP	0,46523	0,02712	25,81000	0,04590
lpp	Y x cogl Y Br/cortex glia>eYFP	1,00000	0,05621	27,92000	0,04615
mtp	RY x cogl Y Br/cortex glia>Enok;eYFP	0,31170	0,01534	28,19000	0,00868
mtp	Y x cogl Y Br/cortex glia>eYFP	1,00000	0,09057	29,72000	0,11237
lpr2	RY x cogl Y Br/cortex glia>Enok;eYFP	0,50967	0,04040	29,34000	0,09007
lpr2	Y x cogl Y Br/cortex glia>eYFP	1,00000	0,08647	31,59000	0,10543



Target	Sample	Expression	Expression SEM	Mean Cq	Cq SEM
enok1	RY x cogl Y Br/cortex glia>Enok;eYFP	10,73023	1,16003	28,24	0,09037
enok1	Y x cogl Y Br/cortex glia>eYFP	1,00000	0,22507	34,88	0,30780

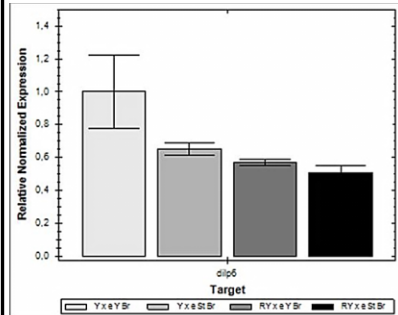
Abbildung 7.40: Kontrolle des Lipidmetabolismus im Cortex Glia Zellen durch Enok (Rohdaten).

Die transkriptionelle Analyse zeigte eine Beeinträchtigung der Lipidmetabolismus- und Lipid Transportgene in der Cortex Glia. (A,B) Das Expressionsprofil der Lipidmetabolismusgene. Hier wurde die Expression in Gehirnen verglichen. *enok*-Überexpressionstiere wurden mit Kontrolltieren verglichen. Gene der β -Oxidation waren reduziert (A). In der Cortex Glia waren die Gene der Fettsäuresynthese ebenfalls in der Transkription negativ beeinflusst (B). Regulation der Gene des Lipid Transports sind ebenfalls reguliert (C). In (D) ist das Level der *enok* Induktion dargestellt. (A-D) Die jeweiligen Graphen zeigen das Originaldiagramm (Rohdaten), das von der Bio Rad Software abgebildet wurde. Die entsprechenden Tabellen enthält die rel. Expressionslevel. Fehlerbalken repräsentieren standard error of the mean (SEM). *Apoltp*, Lipid Transfer Protein; *ATPCL*, ATP-Citrat Lyase; *CPT1*, Acyl-Carnitin/Carnitin-Antiporter; *Lip3*, Lipase3; *Lip4*, Lipase4; *Lpp*, Lipophorin; *Lpr2*, LDL receptor 2; *Mtp*, Microsomal Triglyceride Transfer Protein; *Mtp*/*CG4389*, Mitochondrial trifunctional protein a subunit; *yip2*, yippee interacting protein 2

A

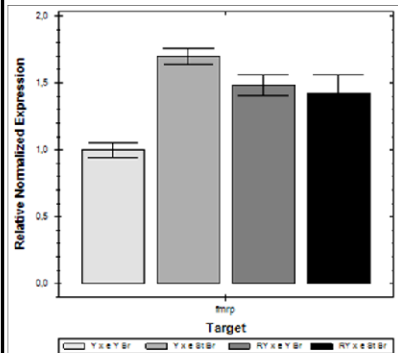
Target	Sample	Expression	Expression SEM	Mean Cq	Cq SEM
alk	Y x e Y Bt/enok>eYFP Hefe	1,00000	0,05921	28,08	0,02462
alk	Y x e St Bt/enok>eYFP PBS	4,47547	0,50291	27,30	0,15508
alk	RY x e Y Bt/enok>Enok,eYFP Hefe	4,82303	0,25593	26,37	0,02139
alk	RY x e St Bt/enok>Enok,eYFP PBS	4,71424	0,33163	26,48	0,06005

One way ANOVA				
Bonferroni's Multiple Comparison Test				
	t	Significant? P < 0,05?	Summary	95% CI of diff
enok>eYFP Hefe vs enok>eYFP PBS	7,479	Yes	*	5,730 to -1,221
enok>eYFP Hefe vs enok>Enok,eYFP Hefe	8,227	Yes	**	-6,077 to -1,569
enok>eYFP Hefe vs enok>Enok,eYFP PBS	7,993	Yes	**	-5,969 to -1,460
enok>eYFP PBS vs enok>Enok,eYFP Hefe	0,7479	No	ns	-2,602 to 1,907
enok>eYFP PBS vs enok>Enok,eYFP PBS	0,5138	No	ns	2,493 to 2,016
enok>Enok,eYFP Hefe vs enok>Enok,eYFP PBS	0,2341	No	ns	-2,146 to 2,363

B

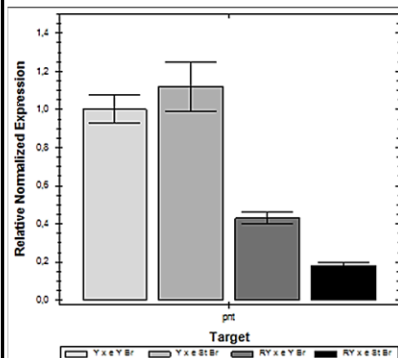
Target	Sample	Expression	Expression SEM	Mean Cq	Cq SEM
dip6	Y x e Y Bt/enok>eYFP Hefe	1,00000	0,21950	27,02	0,01962
dip6	Y x e St Bt/enok>eYFP PBS	0,65221	0,03979	29,49	0,08660
dip6	RY x e Y Bt/enok>Enok,eYFP Hefe	0,56996	0,01747	28,01	0,04094
dip6	RY x e St Bt/enok>Enok,eYFP PBS	0,50955	0,04441	28,75	0,12349

One way ANOVA				
Bonferroni's Multiple Comparison Test				
	t	Significant? P < 0,05?	Summary	95% CI of diff
enok>eYFP Hefe vs enok>eYFP PBS	3,04	No	ns	-0,01287 to 0,7084
enok>eYFP Hefe vs enok>Enok,eYFP Hefe	3,759	Yes	*	0,06938 to 0,7907
enok>eYFP Hefe vs enok>Enok,eYFP PBS	4,287	Yes	**	0,1298 to 0,8511
enok>eYFP PBS vs enok>Enok,eYFP Hefe	0,719	No	ns	-0,2784 to 0,4429
enok>eYFP PBS vs enok>Enok,eYFP PBS	1,247	No	ns	-0,2180 to 0,5033
enok>Enok,eYFP Hefe vs enok>Enok,eYFP PBS	0,5281	No	ns	-0,3002 to 0,4211

C

Target	Sample	Expression	Expression SEM	Mean Cq	Cq SEM
fmp	Y x e Y Bt/enok>eYFP Hefe	1,00000	0,05679	28,41	0,00472
fmp	Y x e St Bt/enok>eYFP PBS	1,69622	0,06182	29,04	0,02309
fmp	RY x e Y Bt/enok>Enok,eYFP Hefe	1,48014	0,07741	28,41	0,01704
fmp	RY x e St Bt/enok>Enok,eYFP PBS	1,42474	0,13380	28,54	0,10799

One way ANOVA				
Bonferroni's Multiple Comparison Test				
	t	Significant? P < 0,05?	Summary	95% CI of diff
enok>eYFP Hefe vs enok>eYFP PBS	5,598	Yes	*	-1,300 to -0,09285
enok>eYFP Hefe vs enok>Enok,eYFP Hefe	3,86	No	ns	-1,084 to 0,1232
enok>eYFP Hefe vs enok>Enok,eYFP PBS	3,415	No	ns	-1,028 to 0,1786
enok>eYFP PBS vs enok>Enok,eYFP Hefe	1,737	No	ns	-0,3873 to 0,8195
enok>eYFP PBS vs enok>Enok,eYFP PBS	2,183	No	ns	0,3319 to 0,8749
enok>Enok,eYFP Hefe vs enok>Enok,eYFP PBS	0,4454	No	ns	0,5480 to 0,6588

D

Target	Sample	Expression	Expression SEM	Mean Cq	Cq SEM
prt	Y x e Y Bt/enok>eYFP Hefe	1,00000	0,07400	28,58	0,02529
prt	Y x e St Bt/enok>eYFP PBS	1,11940	0,12938	29,91	0,04515
prt	RY x e Y Bt/enok>Enok,eYFP Hefe	0,42995	0,02980	30,33	0,04033
prt	RY x e St Bt/enok>Enok,eYFP PBS	0,18247	0,01529	31,52	0,07494

One way ANOVA				
Bonferroni's Multiple Comparison Test				
	t	Significant? P < 0,05?	Summary	95% CI of diff
enok>eYFP Hefe vs enok>eYFP PBS	1,105	No	ns	-0,6434 to 0,4046
enok>eYFP Hefe vs enok>Enok,eYFP Hefe	5,277	Yes	*	0,04604 to 1,094
enok>eYFP Hefe vs enok>Enok,eYFP PBS	7,568	Yes	**	0,2935 to 1,342
enok>eYFP PBS vs enok>Enok,eYFP Hefe	6,383	Yes	*	0,1654 to 1,213
enok>eYFP PBS vs enok>Enok,eYFP PBS	8,674	Yes	**	0,4129 to 1,461
enok>Enok,eYFP Hefe vs enok>Enok,eYFP PBS	2,291	No	ns	-0,2765 to 0,7715

Abbildung 7.41: Enok beeinflusst nahrungsabhängige Signalwege im Gehirn.

(A-D) Transkriptionelle Analyse von Genen, die in nahrungsabhängige Signalwege wie Insulin/PI3K/AKT- oder MAPK-Signalweg involviert sind. Die Balkendiagramme zeigen gehirnspezifische Expression dieser Gene. Für diesen Versuch wurden ausschließlich nur Gehirne der L2 Larven präpariert. Das Expressionsprofil wurde unter verschiedenen Nahrungsbedingungen untersucht. Hier wurde die Expression in Gehirnen unter Hungerbedingungen (PBS) oder auf proteinreicher Nahrung (Hefe) verglichen. Einzelheiten zu den jeweiligen Signalwegen sind im Text beschrieben. Die jeweiligen Originalgraphen (Rohdaten) der Bio Rad Software sind in (A-D9) zu sehen. Die dazugehörigen Tabellen zeigt die rel- Expressionswerte und stat. Auswertung mittels One Way Anova mit Multitest Bonferroni Korrektur. Fehlerbalken repräsentieren standard error of the mean (SEM). *Alk*, Anaplastic Lymphoma Kinase; *dilp6*, *Drosophila Insulin-like Peptide 6*; *FMRP*; *Fragile X Mental Retardation 1 Protein*; *pnt*, *pointed*.

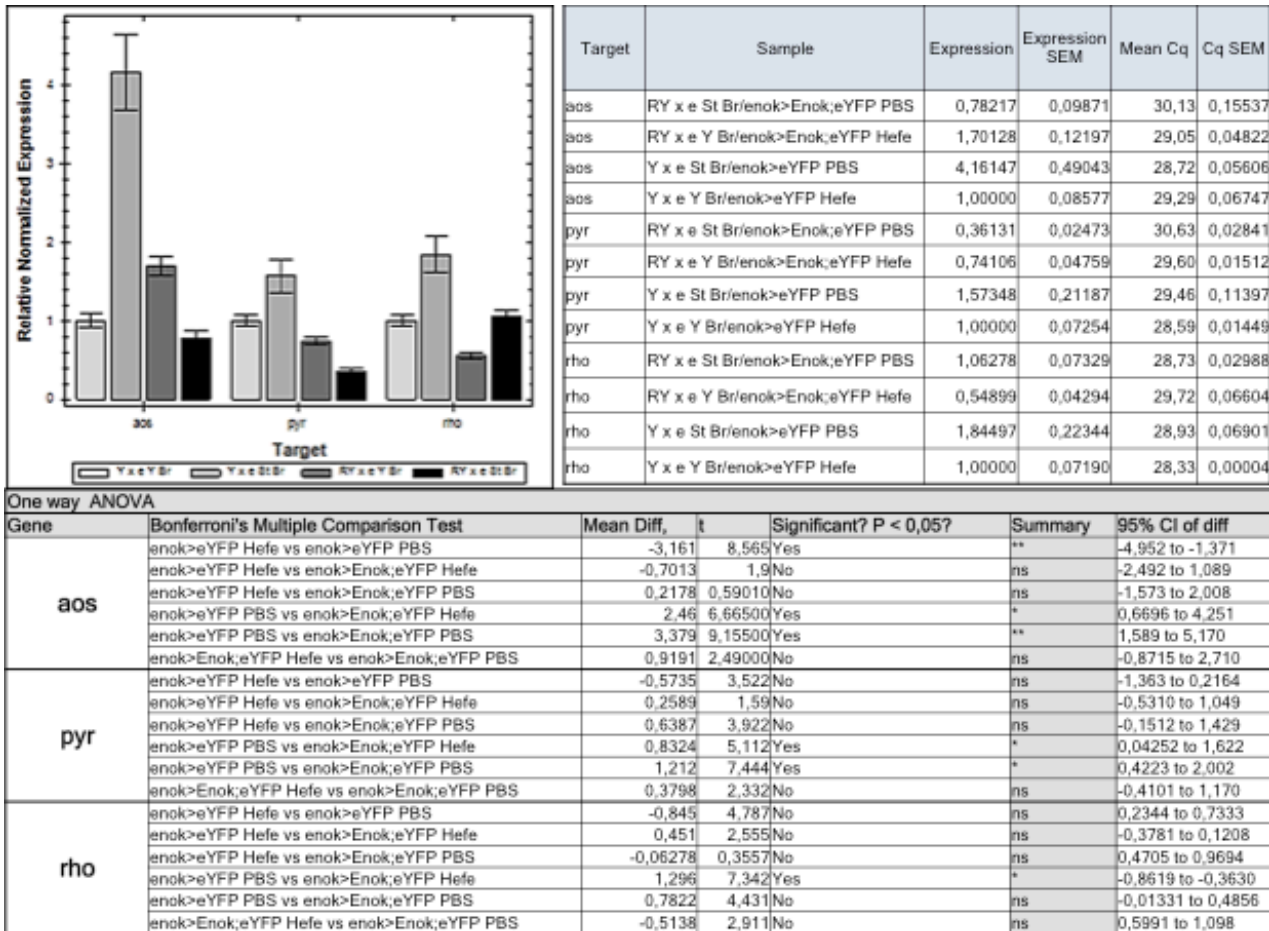


Abbildung 7.42: Enok beeinflusst MAPK Signalweg im Gehirn.

Transkriptionelle Analyse von Genen, die in MAPK-Signalweg involviert sind. Die Balkendiagramme zeigen gehirnspezifische Expression dieser Gene. Für diesen Versuch wurden ausschließlich nur Gehirne der L2 Larven präpariert. Das Expressionsprofil wurde unter verschiedenen Nahrungsbedingungen untersucht. Hier wurde die Expression in Gehirnen unter Hungerbedingungen (PBS) oder auf proteinreicher Nahrung (Hefe) verglichen. Der Graph zeigt das Originaldiagramm (Rohdaten), das von der Bio Rad Software abgebildet wurde. Die entsprechende Tabelle enthält die rel. Expressionslevel. Zur stat Auswertung wurde die One Way Anova mit Multitest Bonferroni Korrektur benutzt. Fehlerbalken repräsentieren standard error of the mean (SEM). *aos*, *argos*; *pyr*, *pyramus*; *rho*, *rhomboid*.

8. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1.1: MOZ/MORF Multiprotein-Komplex.....	3
Abbildung 1.2: Genaktivität wird durch die Acetylierung der Histone reguliert.....	4
Abbildung 1.3: Phänotyp der homozygoten <i>querkopf</i> -Mutante.	5
Abbildung 1.4: Übersicht über die β -Oxidation.....	7
Abbildung 1.5: Mobilisierung der Lipide ist abhängig vom Ernährungszustand.....	8
Abbildung 1.6: <i>Drosophila</i> Lipoproteine und Lipidtransfer zwischen den Geweben.....	9
Abbildung 1.7: Interorgan-Kommunikation in der <i>Drosophila</i> Larve.	11
Abbildung 1.8: Glia-abhängige Kontrolle der Neuroblastenreaktivierung und des Wachstums.....	13
Abbildung 1.9: Variation und Komplexität der <i>Drosophila</i> Glia.....	14
Abbildung 3.1: Getaggtetes Konstrukt der Enok-cDNA und das getaggte Enok Protein.	41
Abbildung 3.2: Analyse des pUAST-attB-HA-Enok-FLAG Konstruktes in S2 Zellen.....	42
Abbildung 3.3: Expression des getaggteten Enok-Konstrukts in Gewebe.....	43
Abbildung 3.4: Detektion der Lokalisation des getaggteten Enok-Proteins im Gewebe.....	44
Abbildung 3.5: Kolokalisation von Enok mit einem Histon Marker. ...	45
Abbildung 3.6: Kolokalisation von Enok mit transkriptionellem und mitotischem Marker.....	46
Abbildung 3.7: Acetylierungsaktivität von Enok.....	47
Abbildung 3.8: Der <i>enok</i> -Lokus.....	49
Abbildung 3.9: <i>enok</i> -Promotoranalysen in Embryonen und Larven... ..	53
Abbildung 3.10: <i>enok</i> -Promotoranalysen in adulten Tieren.	55
Abbildung 3.11: <i>gek</i> -Promotoranalysen.....	56
Abbildung 3.12: Verifizierung und Charakterisierung des <i>enok-Gal4</i> Expressionsmusters.....	58
Abbildung 3.13: Phänotypische Beschreibung der Mutanten <i>enok</i> ^{Δ/Δ} und <i>enok</i> ¹⁰⁴	60
Abbildung 3.14: Transkriptionsanalyse der β -Oxidationsgene in den Mutanten <i>enok</i> ^{Δ/Δ} und <i>enok</i> ¹⁰⁴	62
Abbildung 3.15: Phänotypische Beschreibung der <i>enok</i> -Überexpression unter der Kontrolle des <i>enok</i> -Promotors.	66
Abbildung 3.16: Lipidmobilisation und Abbau finden in <i>enok</i> -Überexpressionstieren unter der Kontrolle des <i>enok</i> -Promotors nicht statt.....	71
Abbildung 3.17: Expressionsmuster der untersuchten spezifischen Treiberlinien.	73
Abbildung 3.18: Funktion von Enok im Fettkörper.	75
Abbildung 3.19: Lipoproteinexpression wird nicht während der gesamten Entwicklung von Enok kontrolliert.....	79
Abbildung 3.20. Phänotypische Analyse der Überexpression von <i>enok</i>	

in den Oenozyten.....	80
Abbildung 3.21: Enok ist verantwortlich für die Abdichtung des respiratorischen Systems.	82
Abbildung 3.22: Enok ist in der Cortex Glia exprimiert.	85
Abbildung 3.23: Phänotypische Analyse der Überexpression von <i>enok</i> in der Cortex Glia.....	86
Abbildung 3.24: Dilp2 Sekretion wird durch <i>enok</i> -Überexpression verhindert.....	88
Abbildung 3.25: <i>enok</i> -Überexpression in den Oenozyten ist nicht für die Dilp2 Retention in den IPCs auf proteinreicher Nahrung verantwortlich.	89
Abbildung 3.26: Die Überexpression von <i>enok</i> in der Cortex Glia ist für die Dilp2 Retention in den IPCs auf proteinreicher Nahrung verantwortlich.	90
Abbildung 3.27: Systemische Kontrolle des Lipidmetabolismus in der Peripherie durch Enok in der Cortex Glia.	91
Abbildung 3.28: Entwicklungsunabhängiger und zellautonomer Effekt von Enok auf den Lipidmetabolismus und Wachstum.	93
Abbildung 3.29: Enok reguliert Lipidmetabolismus im zentralen Nervensystem.....	96
Abbildung 3.30: Enok beeinflusst nahrungsabhängige Signalwege im Gehirn.....	98
Abbildung 4.1: Posttranslationale Modifikationen von Enok.	102
Abbildung 4.2: Querkopf Expression in der Wildtypmaus.	105
Abbildung 4.3: Modell der transkriptionellen Regulation der Enok Zielgene.....	109
Abbildung 4.4.: Zusammenfassung der Enok-gesteuerten Prozesse.	111
Abbildung 4.5: Einfluss von Enok auf die Interorgan-Kommunikation.	116
Abbildung 7.1: Analyse des pUAST-attB-HA-Enok-FLAG Konstruktes in S2 Zellen.....	137
Abbildung 7.2: Expression des getaggtten Enok-Konstrukts in Gewebe.	137
Abbildung 7.3: Detektion der Lokalisation des getaggtten Enok-Proteins im Gewebe.....	138
Abbildung 7.4: Kolokalisation von Enok mit einem Histon Marker. .	138
Abbildung 7.5: Kolokalisation von Enok mit transkriptionellem und mitotischem Marker.....	138
Abbildung 7.6: Acetylierungsaktivität und Konservierung der putativen Autoacetylierungsstellen von Enok.	139
Abbildung 7.7: <i>enok</i> -Promotoranalysen in Embryonen und Larven.	140
Abbildung 7.8: <i>enok</i> -Promotoranalysen in adulten Tieren.	141
Abbildung 7.9: <i>gek</i> -Promotoranalysen.....	141
Abbildung 7.10: Verifizierung und Charakterisierung des <i>enok-Gal4</i> Expressionsmusters.....	142
Abbildung 7.11: Phänotypische Beschreibung der Mutanten <i>enok</i> ^{Δ/Δ} und <i>enok</i> ¹⁰⁴	143
Abbildung 7.12: Transkriptionelle Analyse der Mutanten <i>enok</i> ^{Δ/Δ} und <i>enok</i> ¹⁰⁴	144

Abbildung 7.13: Transkriptionsanalyse der β -Oxidationsgene in den Mutanten <i>enok</i> ^{Δ/Δ} und <i>enok</i> ¹⁰⁴	146
Abbildung 7.14: Beeinträchtigung der Neuroblastenproliferation durch die <i>enok</i> -Überexpression unter der Kontrolle des <i>enok</i> -Promotors.....	146
Abbildung 7.15: Transkriptionelle Analyse von Enok bei verschiedenen Nahrungsbedingungen in der Überexpression und in der Kontrolle.....	146
Abbildung 7.16: Effekt der Enok Überexpression auf Lipolyse.	147
Abbildung 7.17: Effekt der Enok Überexpression auf β -Oxidation... ..	148
Abbildung 7.18: Effekt der Enok Überexpression auf Fettsäuresynthese.	149
Abbildung 7.19: Effekt der <i>enok</i> -Überexpression auf die Mitochondrien.....	150
Abbildung 7.20: Lipidmobilisation in der Kontrollsituation und fehlende Lipidmobilisation in <i>enok</i> -Überexpressionstieren unter der Kontrolle des <i>enok</i> -Promotors.	150
Abbildung 7.21: Überexpression von <i>enok</i> im Fettkörper verhindert Lipid-Abtransport.	151
Abbildung 7.22: Überexpression von <i>enok</i> im Fettkörper verhindert Transkription von Lipoprotein- und β -Oxidations-Genen.....	152
Abbildung 7.23: Lipoproteinexpression wird nicht während der gesamten Entwicklung von Enok kontrolliert.....	154
Abbildung 7.24: Enok Überexpression kontrolliert von Gal80ts.	154
Abbildung 7.25: Lipoproteinexpression wird nicht während der gesamten Entwicklung von Enok kontrolliert.....	156
Abbildung 7.26: Auswirkung der Überexpression von <i>enok</i> in den Oenozyten auf den Lipidmetabolismus.	156
Abbildung 7.27. Transkriptionelle Analyse der Überexpression von <i>enok</i> in den Oenozyten.	157
Abbildung 7.28: Enok ist verantwortlich für die Abdichtung des respiratorischen Systems.	158
Abbildung 7.29: Enok ist in der Cortex Glia exprimiert.	159
Abbildung 7.30: Auswirkung auf den Lipidmetabolismus bei der Überexpression von <i>enok</i> unter der Kontrolle des <i>Cortex glia</i> -Treibers.	160
Abbildung 7.31: Dilp2 Sekretion wird durch <i>enok</i> -Überexpression verhindert.....	161
Abbildung 7.32: <i>enok</i> -Überexpression in den Oenozyten ist nicht für die Dilp2 Retention in den IPCs auf proteinreicher Nahrung verantwortlich.	162
Abbildung 7.33: Die Überexpression von <i>enok</i> in der Cortex Glia ist für die Dilp2 Retention in den IPCs auf proteinreicher Nahrung verantwortlich.	163
Abbildung 7.34: Systemische Kontrolle des Lipidmetabolismus in der Peripherie durch Enok in der Cortex Glia.	164
Abbildung 7.35: Entwicklungsunabhängiger Effekt von Enok auf die Lipolyse.	165
Abbildung 7.36: Entwicklungsunabhängiger Effekt von Enok auf die β -Oxidation.	166

Abbildung 7.37: Enok reguliert Wachstum und Lipidmetabolismus auf zellulärer Ebene.	167
Abbildung 7.38: Kontrolle des Lipidmetabolismus im zentralen Nervensystem durch Enok.	168
Abbildung 7.39: Kontrolle des Lipidmetabolismus im Cortex Glia Zellen durch Enok.	169
Abbildung 7.40: Kontrolle des Lipidmetabolismus im Cortex Glia Zellen durch Enok (Rohdaten).	170
Abbildung 7.41: Enok beeinflusst nahrungsabhängige Signalwege im Gehirn.	172
Abbildung 7.42: Enok beeinflusst MAPK Signalweg im Gehirn.	172

Danksagungen

Ich danke Prof. Michael J Pankratz für die Möglichkeit in seinem Labor meine Dissertation erstellen zu dürfen.

Ich danke Priv-Doz. Gerhild van Echten-Deckert für die Übernahme der Ko-korrektur meiner Dissertation und für Ihre Unterstützung.

Auch möchte ich Prof. Michael Hoch und Prof. Peter Vöhringer dafür danken, dass Sie eingewilligt haben ein Teil meines Prüfungskomitees zu sein.

Ich bedanke mich auch bei allen Leuten aus dem Labor, die sowohl durch theoretischen Rat als auch durch tatkräftige Unterstützung dazu beigetragen haben, dass ich die Arbeit so gut wie es nur möglich war, erstellen konnte.

Ich danke Ingo für seine Einführung in dieses Projekt, das mir so viel Spaß gemacht hatte.

Auch möchte ich mich besonders herzlich bei Susanne bedanken, die mir immer eine große Unterstützung, sowohl beruflich als auch privat, war.

Zusätzlich gilt mein Dank Mitgliedern des Hoch Labors, die mir bei meinem Projekt geholfen haben, und mit denen ich eine schöne und unvergessliche Zeit im LIMES-Institut hatte, an die ich mich gern erinnern werde. (Anna, André, Disha und Elvira)

Natürlich bedanke ich mich bei meinen Eltern und meiner Familie, die immer für mich da war und von der ich während meiner Doktorandenzeit viel Verständnis und Unterstützung erfahren habe.

Vor allem möchte ich Rüdi danken, der mich immer in allem, was ich gemacht habe, unterstützt hat. Du bist mein Ruhepol und meine Stütze.