

**HEXAMERINE UND NEUROPEPTIDE IN DER
POSTEMBRYONALEN ENTWICKLUNG DER
INSEKTEN – NEUE ANSÄTZE ZUR
IDENTIFIZIERUNG VON INSEKTIZIDEN
WIRKSTOFFEN**

**Dissertation zur Erlangung des
naturwissenschaftlichen Doktorgrades
der Bayerischen Julius-Maximilians-Universität Würzburg**

vorgelegt von
Immo A. Hansen
aus
Bad Hersfeld

Würzburg 2001

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von 1998 bis 2001 am Institut für Zell- und Entwicklungsbiologie der Universität Würzburg unter der Leitung von Prof. Dr. Klaus Scheller angefertigt.

Eingereicht am:

Mitglieder der Promotionskommission:

Vorsitzender:

Gutachter : Prof. Dr. Klaus Scheller

Gutachter: Prof. Dr. Roland Benz

Tag des Promotionskolloquiums:

Doktorurkunde ausgehändigt am:

ERKLÄRUNG

Ich erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertation selbständig angefertigt habe und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe.

Ferner erkläre ich, dass ich nicht anderweitig mit oder ohne Erfolg versucht habe, eine Dissertation einzureichen.

Außer den mit dem Zulassungsgesuch urkundlich vorgelegten Graden habe ich keine weiteren Grade erworben oder zu erwerben versucht.

Würzburg, den

Immo Hansen

DANKSAGUNG

Herrn Prof. Dr. Klaus Scheller gilt mein besonderer Dank für die Vergabe der interessanten Themen, seine intensive Betreuung und stetige Diskussionsbereitschaft und, dass er es mir ermöglicht hat, an vielen internationalen Kooperationen mitzuarbeiten.

Herrn Prof. Dr. Roland Benz danke ich für die Übernahme des Korreferats.

Meinem Kollegen Dr. Peter Wolbert danke ich für viele wissenschaftliche Diskussionen, Espressos und die kritische Durchsicht des Manuskripts dieser Arbeit.

Herrn Prof. Dr. Franticek Sehnal danke ich für die außerordentlich erfolgreiche Zusammenarbeit bei dem Corazonin-Projekt.

Besonderer Dank gebührt Susanne R. Meyer, die mit großem Einsatz an allen unseren Projekten mitgearbeitet hat.

Ingo Schäfer danke ich für seine Mitarbeit an dem AFP-Projekt.

Bei Volker Gutschmann, Thorsten Leicher, Andreas Turberg und Anja Ticheloven bedanke ich mich ganz herzlich für die freundliche Aufnahme in der HTS-Abteilung der „Bayer-Tiergesundheit“ und für die Unterstützung meines Projekts.

Bei Herrn Kölbl bedanke ich mich für die Finanzierung des Hexamerinrezeptor-Projekts und für die jährlichen Einladungen zu den Bayer-Hochschultagen.

Herzlichen Dank gilt meinen Kollegen in der Zell- und Entwicklungsbiologie für die freundliche Atmosphäre, für ihre Hilfsbereitschaft und Unterstützung.

Meinen Eltern danke ich für ihre Unterstützung während meines Studiums.

Den größten Dank schulde ich meiner Frau Anja.

ZUSAMMENFASSUNG

Das Ziel der vorliegenden Dissertation war die Entwicklung neuartige Ansätze zur Identifizierung von biologisch aktiven Wirkstoffen, die in die Metamorphose von holometabolen Insekten eingreifen. Hexamerine und Neuropeptide besitzen sehr unterschiedliche Funktionen. Während Neuropeptide zusammen mit anderen Gewebshormonen auf einer übergeordneten regulatorischen Ebene wirken, sind Hexamerine als Speicher- und Verteidigungsproteine ein Endglied dieser hormonellen Regulationskaskade.

In der vorliegenden Arbeit wurden zwei Fragestellungen bearbeitet:

- 1) Im ersten Projekt sollten allatotrope Substanzen im Gehirn der großen Wachsmotte *Galleria mellonella* durch Screening einer Expressionsbibliothek mit polyklonalen Antisera identifiziert werden. Dabei wurde das Neuropeptid Corazonin identifiziert. Die vollständige Corazonin-mRNA wurde kloniert und sequenziert. Die Expression der Corazonin-mRNA und des Peptids wurde mittels Northern-Analyse und in-situ-Hybridisierung charakterisiert. Corazonin wird in vier Zellpaaren, die zu den lateralen neurosekretorischen Zellen gehören, exprimiert. Die Axone dieser Zellen verlaufen ipsilateral zu den Nervi corpori cardiaci I+II, feine Fasern verzweigen sich in die am Ösophagus angrenzende Hirnregion hinein. Corazonin wird offensichtlich an den Axon-Endigungen in den Corpora cardiaca in die Hämolymphe freigesetzt. Einige feine Fasern enden in den Corpora allata bzw. am Vorderdarm.

Der Nachweis, dass Corazonin tatsächlich eine allatotrope Wirkung hat, konnte nicht erbracht werden.

- 2) Die Protein/Protein-Interaktion zwischen Hexamerinen und dem Hexamerinrezeptor der Schmeißfliege *Calliphora vicina* wurde durch Two-Hybrid-Experimenten analysiert. Durch Interaktionstest mit trunkierten Proteinfsegmenten wurden die Bindungsdomänen beider Proteine kartiert. Als rezeptorbindende Domäne des Arylphorins wurde ein 49 AS großes Peptid in der Domäne-3 des Arylphorin-Monomers identifiziert. Die Ligandenbindungsdomäne des Hexamerinrezeptors wurde in den ersten 24 AS des N-Terminus kartiert. Ausgehend von diesen Ergebnissen wurde ein HTS-Protokoll entwickelt, das zur Identifizierung von Substanzen verwendet werden kann, welche die Bindung dieser beiden Proteine beeinflussen.

Eine Two-Hybrid-Bibliothek wurde ausgehend von 7dL-Fettkörper-RNA konstruiert und mit "Hexamerinrezeptor-Ködern" gescreent. Dabei wurden zwei neue Interaktionspartner des Hexamerinrezeptors gefunden und genauer charakterisiert.

Der erste identifizierte Interaktionspartner - δ -AP-3 - ist Teil eines Adaptin-Komplexes, der als Adapter zwischen membranständigen Rezeptoren und Clathrin oder ähnlichen Proteinen an der rezeptorvermittelten Endozytose beteiligt ist. Die Adaptin-Interaktionsdomäne liegt innerhalb des ABP64-Spaltprodukts des Hexamerinrezeptors.

Die Funktion des zweiten Interaktionspartners – AFP - ist unbekannt. AFP wird im anterioren Teil des Fettkörpers und in Hämozyten exprimiert. Die Interaktion zwischen dem Hexamerinrezeptor und AFP ist demnach auf diesen Teil des Fettkörpers beschränkt. Die mit AFP interagierende Domäne des Hexamerinrezeptors liegt innerhalb des P30-Spaltprodukts.

SUMMARY

The goal of this project was to develop innovative basic approaches to identify biologically active substances which interfere with the metamorphosis of holometabolous insects.

Hexamerins and neuropeptides clearly have different functions. While neuropeptides are involved in initial regulatory steps hexamerins have important functions as storage and defense proteins during the final steps of the regulatory cascade.

Two projects are part of this dissertation:

- 1) Aim of the first project was the identification of allatotropic substances in the brain of the greater waxmoth *Galleria mellonella* by screening an expression-library with polyclonal antisera. Thereby the neuropeptide corazonin was identified. The corazonin-mRNA was cloned and sequenced. The expression profile of the mRNA and the peptide was examined with northern-blotting and in-situ-hybridization.

Corazonin is produced in four neurosecretory cells localized laterally in each brain hemisphere. Axons of these cells follow the ipsilateral tract to the nervi corpori cardiaci I+II, finer fibers seem to terminate in the brain region adjacent to the oesophagus. Corazonin seems to be released in axon terminals within the corpora cardiaca. Axon endings are even regularly seen in the foregut wall and in the corpora allata.

It could not be established that corazonin in fact is an allatotropic substance.

- 2) The protein/protein-interaction between hexamerins and the hexamerin-receptor of the blowfly *Calliphora vicina* was analysed using the yeast-two-hybrid-system. By interaction tests with truncated protein fragments the binding domains of both proteins were mapped. The receptor binding domain of arylphorin was located within a peptide of 49 aa in domain-3 of the arylphorin monomer. The ligand binding domain of the hexamerin-receptor was mapped within the first 24 aa of the N-terminus.

Proceeding from this results a protocol for a high-throughput-screening was developed which can be used to identify substances that interfere with the binding of these two proteins.

A two-hybrid-library was constructed from 7dL-fat body RNA and screened with a hexamerin-receptor-bait. Two novel interactors of the hexamerin-receptor were identified and characterized within this project.

The first identified interactor - δ -AP-3 – is part of an adaptin complex which serves as an adapter between membrane bound receptors and clathrin or related proteins and is part of the receptor-mediated endocytosis process. The adaptin-interacting domain lies within the ABP64 cleavage product of the receptor.

The function of the second interactor – AFP – is unknown. AFP is produced specifically in the anterior part of the fat body and in hemocytes. Hence the interaction between the hexamerin-receptor and AFP is limited to this part of the fat body. The AFP-interacting domain is located within the P30 cleavage product of the hexamerin-receptor.

INHALTSVERZEICHNIS:

| | |
|---|-----------|
| 1. Einleitung | 1 |
| 1.1. Endokrinologische Aspekte der postembryonalen Entwicklung holometaboler Insekten - ein Überblick | 2 |
| 1.2. Neuropeptide sind Regulatoren des Metabolismus und der Entwicklung von Insekten | 8 |
| 1.3. Die Rolle von Speicherproteinen in der postembryonalen Entwicklung der Insekten | 13 |
| 1.3.1. Hexamerine - larvale Serumproteine holometaboler Insekten | 13 |
| 1.3.2. Hexamerinrezeptoren und rezeptorvermittelte Endocytose | 18 |
| 1.4. Schema der hormonellen Regulation der postembryonalen Entwicklung bei Insekten | 21 |
| 1.5. Ansätze zur Entwicklung neuartiger Insektizide | 23 |
| 1.6. Detektion von Protein/Protein-Interaktionen im Hefe-Two-Hybrid-System | 26 |
| 1.7. Hochdurchsatz-Sortiersuche (HTS) - Konzept, Chancen, Risiken | 28 |
| 1.8. Aufgabenstellung und Voraussetzungen dieser Arbeit | 30 |
| | |
| 2. Material | 31 |
| 2.1. Versuchstiere | 31 |
| 2.2. Bakterien- und Hefestämme | 31 |
| 2.3. Plasmide | 32 |
| 2.3.1. Plasmide für <i>E.coli</i> -Klonierungen | 32 |
| 2.3.2. „Two-Hybrid-Shuttle“-Plasmide | 32 |
| 2.3.3. Sonstige Plasmide | 33 |
| 2.4. Enzyme | 34 |
| 2.5. Molekulargewichtsmarker für DNA, RNA und Proteine | 35 |
| 2.6. Antikörper und Antiseren | 36 |
| 2.7. Kits (Reagenziensätze) | 37 |
| 2.8. Nukleinsäuren und Nukleotide | 37 |
| 2.9. Chemikalien | 38 |
| 2.10. Medien | 41 |
| 2.10.1. Medien und Lösungen für die Bakterienkultur | 41 |

| | |
|--|-----------|
| 2.10.2. Medien und Lösungen für die Zucht von Lambda-Phagen | 43 |
| 2.10.3. Hefemedien und Lösungen | 44 |
| 2.11. Geräte und sonstige Materialien | 46 |
| 3. Methoden | 47 |
| 3.1. Mikro- und molekularbiologische Methoden | 47 |
| 3.1.1. Kultur von <i>E.coli</i> | 47 |
| 3.1.2. Herstellung von elektrokompetenten <i>E.coli</i> -Zellen | 48 |
| 3.1.3. Elektroporation von <i>E.coli</i> | 48 |
| 3.1.4. Isolierung von Plasmid-DNA aus <i>E.coli</i> | 49 |
| 3.1.4.1. Plasmid-Mini-Präparation (GST-Methode) | 49 |
| 3.1.4.2. Plasmid-Mini-Präparation (Methode Quiagen) | 49 |
| 3.1.4.3. Plasmid-Maxi-Präparation (Methode Quiagen) | 51 |
| 3.1.5. DNA-Konzentrationsbestimmung | 51 |
| 3.1.6. DNA-Fällung | 51 |
| 3.1.7. Reinigung von DNA durch Phenol/Chloroform-Extraktion | 52 |
| 3.1.8. Agarose-Gelelektrophorese | 52 |
| 3.1.9. Isolierung von DNA aus Agarosegelstücken (Methode Qiagen) | 53 |
| 3.1.10. DNA-Modifikationen | 54 |
| 3.1.11. Polymerase-Kettenreaktion (PCR) | 58 |
| 3.1.11.1. Konzeption von Primern für die PCR | 59 |
| 3.1.11.2. Durchführung und Optimierung der PCR | 59 |
| 3.1.12. Klonierung von PCR-Fragmenten mit dem pCRScript-Cloning-Kit .. | 60 |
| 3.1.13. Herstellung einer mit Digoxigenin-markierten RNA Sonde | 61 |
| 3.1.14. Southern-Analyse genomischer DNA | 62 |
| 3.1.15. Northern-Analyse | 65 |
| 3.1.16. Totalpräparat-in-situ-Hybridisierung | 67 |
| 3.1.17. Herstellung einer lambda-TriplX2-Phagen-Bibliothek | 71 |
| 3.1.18. Immunoscreening einer Phagenbibliothek | 77 |
| 3.1.19. In-vivo-Exzission des pTriplEX2 aus der Phagen DNA | 79 |
| 3.1.20. Sequenzierung von DNA | 81 |
| 3.1.21. Computergestützte DNA-Sequenzanalyse | 82 |

| | |
|--|------------|
| 3.2. Two-Hybrid-Methoden | 83 |
| 3.2.1. Kultivierung von <i>Saccharomyces cerevisiae</i> | 83 |
| 3.2.2. Transformation von <i>Saccharomyces cerevisiae</i> | 84 |
| 3.2.3. Charakterisierung eines „Köder“-Proteins | 87 |
| 3.2.3.1. Immunologischer Nachweis des „Köder“-Proteins in Hefeklonen | 87 |
| 3.2.3.2. Test auf Aktivierung der Reportergene durch das „Köder“- Protein | 87 |
| 3.2.4. „Repression assay“ | 89 |
| 3.2.5. Nachweis einer Interaktion zwischen „Köder“- und „Beute“- Fusionsprotein | 90 |
| 3.2.5.1. Galaktose induzierter, Glukose reprimierter Leu ⁺ -Phänotyp .. | 90 |
| 3.2.5.2. LacZ-Expression | 91 |
| 3.2.5.3. EGFP/RFP-Expression | 92 |
| 3.2.6. Screening einer Two-Hybrid-Bibliothek | 93 |
| 3.3. Proteinbiochemische und immunologische Methoden | 96 |
| 3.3.1. Immunoblotting („Western-Blotting“) | 96 |
| 3.3.2. Immunokopräzipitation | 102 |
| 3.3.3. Immunolokalisation an ganzen <i>Galleria</i> Gehirnen | 103 |
| 3.3.4. Immunolokalisation an Gefrierschnitten | 104 |
| | |
| 4. Ergebnisse | 105 |
| 4.1. Suche nach allatotropen Substanzen im Hirn von <i>Galleria mellonella</i> | 105 |
| 4.1.1. Herstellung einer <i>Galleria</i> „cooled brain“-Phagenbibliothek | 105 |
| 4.1.2. Immunoscreening der Bibliothek mit anti-Allatotropin-Antikörpern .. | 105 |
| 4.1.3. Die Corazonin-cDNA | 107 |
| 4.1.4. Vergleich der abgeleiteten Aminosäuresequenz des Arg ⁷ -Corazonin- Präprohormons von <i>G. mellonella</i> mit dem von <i>D. melanogaster</i> | 109 |
| 4.1.5. Expression der Corazonin-mRNA | 110 |
| 4.1.6. Ist das Corazonin ein single copy Gen? | 111 |
| 4.1.7. Lokalisation der Corazonin-mRNA in neurosekretorischen Zellen des Gehirns | 112 |

| | |
|---|------------|
| 4.1.8. Immunolokalisation des Corazonin-Peptids und Kolo-kalisation mit der mRNA | 114 |
| 4.1.9. Kombinierte Totalpräparat-in-situ-Hybridisierung/Immunofluoreszenz | 119 |
| 4.2. Analyse der Interaktion des Hexamerinrezeptors mit Arylphorin und anderen Proteinen | 120 |
| 4.2.1. Die Interaktion von Hexamerinen und Hexamerinrezeptoren im Hefe-Two- Hybrid-System | 120 |
| 4.2.1.1. Konstruktion einer Two-Hybrid-Bibliothek | 120 |
| 4.2.1.2. Screening der Bibliothek mit verschiedenen „Köder“-Proteinen | 125 |
| 4.2.1.3. Konstruktion von Deletionsfragmenten zur genauen Kartierung der Bindungsdomänen | 133 |
| 4.2.1.4. Kartierung der interagierenden Domänen im Two-Hybrid-Experiment | 139 |
| 4.2.2. Charakterisierung der identifizierten „Nicht Hexamerin“- Interaktoren des Hexamerinrezeptors | 142 |
| 4.2.2.1. Charakterisierung von AP-3-delta | 142 |
| 4.2.2.2. Charakterisierung des „anterior fat body proteins“ (AFP) von <i>Calliphora vicina</i> | 146 |
| 4.2.3. Ein 3D-Modell des <i>Calliphora</i> Arylphorins | 153 |
| 4.2.3.1. Software für das „Molecular modelling“ | 153 |
| 4.2.3.2. Das Hämocyanin von <i>P. interruptus</i> als Vergleichsmodell ... | 154 |
| 4.2.3.3. 3-D Teilmodelle der Domänen des Arylphorins von <i>C. vicina</i> . | 159 |
| 4.2.4. Entwicklung eines HTS-Protokolls | 160 |
| 4.2.4.1. Konstruktion von neuen Two-Hybrid-Reporterplasmiden für das HTS-screening | 161 |
| 4.2.4.2. Struktur und Eigenschaften von p8opEGFP und p8opRFP .. | 163 |
| 4.2.4.3. Identifizierung eines geeigneten Hefestamms | 166 |
| 4.2.4.4. Das Protokoll | 169 |

| | |
|--|------------|
| 5. Diskussion | 173 |
| 5.1. Die Suche nach einem larvalen Allatotropin in <i>Galleria mellonella</i> - Identifizierung von Arg ⁷ -Corazonin | 173 |
| 5.2. Analyse der Interaktionen von Hexamerinrezeptor und Arylphorin | 178 |
| 5.2.1. Konstruktion und Screening einer Two-Hybrid-cDNA-Bibliothek ... | 178 |
| 5.2.2. Kartierung der interagierenden Domänen von Arylphorin und Hexamerinrezeptor | 180 |
| 5.2.3. „Nicht Hexamerin“- Interaktoren des Hexamerinrezeptors | 181 |
| 5.2.4. Modifiziertes Modell des Hexamerinrezeptors und seiner Protein/Protein-Interaktionen | 185 |
| 5.2.5. Das HTS-Protokoll | 188 |
| 6. Literatur | 191 |
| 7. Anhang | 205 |

1. EINLEITUNG

Der Raupen wunderbare Verwandlung (Maria Sybille Merian, 1705) – oder allgemeiner: Die Metamorphose in der postembryonalen Entwicklung von Insekten hat seit der Entdeckung ihrer hormonellen Regulation (Kopec, 1922) und den Pionierarbeiten von Wigglesworth (1936) immer wieder Forscher fasziniert und auch zu Entdeckungen inspiriert, die weit über das engere Forschungsgebiet hinaus Bedeutung hatten. Das reicht vom ersten Nachweis von Hormonen bei wirbellosen Tieren (Kopec) über die enge Verbindung von Hormonen mit Entwicklungsvorgängen, dem ersten Modell der Wirkung von Steroidhormonen und, damit verknüpft, der Begründung einer molekularen Entwicklungsbiologie (Clever, Karlson, Ashburner) bis hin zur Betrachtung als Modellsystem für die postembryonale Reprogrammierung der Genexpression. Dabei umfasst das molekulare Regelsystem die Aspekte übergeordneter neurohormonaler Steuerung und der Aktivität subordinierter Hormondrüsen ebenso wie die Vorgänge im Zielgewebe, die zur stadien- und gewebespezifischen Expression von Strukturgenen führen. Eng verknüpft mit der Erforschung der Insektenmetamorphose ist seit jeher auch die Idee, das Wissen darüber praktisch anzuwenden, d.h., ausgehend von den beteiligten Hormonen Insektizide zu entwickeln, die geringe Säugertoxizität besitzen und die durch Anpassung der Applikation an den Lebenszyklus oder durch chemische Modifikation sogar artspezifisch einsetzbar sind (Slama, 1974, Williams, 1961). Die Ergebnisse diesbezüglicher Bemühungen konnten den hohen Erwartungen allerdings nur teilweise gerecht werden. Erst in jüngster Zeit stehen Techniken zur Verfügung, mit denen weitere Bereiche des hormonalen Regulationssystems in die Entwicklung von Insektiziden mit einbezogen werden können und die gestatten, in kurzer Zeit eine Vielzahl von Substanzen auf ihre Eignung als Wirkstoffe hin zu testen.

Schwerpunkt der vorliegenden Arbeit ist die Analyse von Kontrollmechanismen der Insektenmetamorphose einmal auf der übergeordneten neurohormonalen Ebene und zum zweiten auf der Ebene der Zielzellen der hormonalen Regulationskaskade. Fokus ist hier der Stoffwechsel von Speicherproteinen (Hexamerinen) in den Fettkörperzellen. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen sollen auf ihre Anwendung in der Insektenbekämpfung hin geprüft und die verwendeten Techniken für ein breiteres Einsatzfeld optimiert werden. Dies betrifft vor allem das Hefe-Two-Hybrid-System zur Untersuchung von Protein/Protein-Wechselwirkungen und das darauf basierende HTS-Screening als Methode der Wahl bei der Suche nach biologisch aktiven Wirkstoffen.

Dementsprechend gibt diese Einleitung zunächst einen Überblick über die postembryonale Entwicklung und die Metamorphose von Insekten, das Hormonsystem und die an der Regulation dieser Vorgänge beteiligten Hormone (1.1.). Darauf folgt eine Einführung über Neuropeptide als Regulatoren des Stoffwechsels und der postembryonalen Entwicklung von Insekten (1.2.). Im Anschluss daran wird die Rolle von Speicherproteinen in der postembryonalen Entwicklung der Insekten besprochen (1.3.). Ein weiteres Kapitel gibt einen kurzen Überblick über die Entwicklung von Insektiziden, die in das postembryonale Entwicklungsgeschehen eingreifen (1.5.). Schließlich wird auf die Grundlagen der Detektion von Protein/Protein-Wechselwirkungen im Hefe-Two-Hybrid-System (1.6.) und die Hochdurchsatz-Sortiersuche (HTS) nach biologisch aktiven Wirkstoffen (1.7.) eingegangen.

1.1. Endokrinologische Aspekte der postembryonalen Entwicklung holometaboler Insekten - ein Überblick

Metamorphose

Das griechische Wort Metamorphose beschreibt morphologische Änderungen im weiteren Sinn. In der Biologie wird dieser Begriff für postembryonale Entwicklungsvorgänge in verschiedenen Tiergruppen angewendet. Unter diesem Oberbegriff werden sehr unterschiedliche entwicklungsbiologische Phänomene, die zu diversen ontogenetischen Zeitpunkten auftreten, zusammengefasst. Die Gemeinsamkeit besteht in morphologischen Veränderungen, die für den Beobachter auffällig und plötzlich genug auftreten, um durch diesen Begriff bezeichnet zu werden. Häufig ist mit einer Metamorphose ein Wechsel der Lebensform und des Lebensraums verknüpft, z.B. der Übergang vom pelagischen zum sessilen bzw. benthischen oder vom aquatischen zu terrestrischen Leben. Dabei besteht kein Zusammenhang mit der sexuellen Reife, die häufig später eintritt und ein unabhängiges Phänomen darstellt (Gilbert et al., 1996).

Die postembryonale Entwicklung der Insekten

Die Eier der Insekten sind dotterreich, was als Anpassung an ihre terrestrische Lebensweise interpretiert wurde. Schon beim Schlüpfen stellen sie hochorganisierte Arthropoden dar.

Das starre Exoskelett, die Kutikula, muss in der folgenden Wachstumsphase periodisch abgestoßen und durch ein größeres Exoskelett ersetzt werden, um so ein augenfälliges diskontinuierliches Wachstum zu ermöglichen. Diesen Vorgang bezeichnet man als Häutung. Man unterscheidet fünf verschiedene Entwicklungstypen bei Insekten. Die primär flügellosen Urinsekten (Apterygota) zeigen während der Phase ihres allometrischen Wachstums keine

auffälligen morphologischen Veränderungen, man spricht hier von *Ametabolie* (Abb. 1). Die Reifung ihrer Geschlechtsorgane vollzieht sich auch graduell und nach Erreichen der Geschlechtsreife erfolgen weiterhin regelmäßige Häutungen (Abb. 1).

Bei den Pterygota, den flügeltragenden Insekten werden drei verschiedene Metamorphosentypen unterschieden.

Als *hemimetabol* bezeichnet man Insekten deren juvenile Stadien (Nymphen) die gleiche Organisationsform wie die Adulten haben und von einem bestimmten Zeitpunkt in der postembryonalen Entwicklung mit der graduellen Ausbildung adulter Organe (Flügel, Genitalien) beginnen. Die Veränderungen, die bei der letzten Häutung zum Adultus auftreten, sind hier, subjektiv betrachtet, größer als die Veränderungen in den vorangegangenen Häutungen, da nach dieser Häutung funktionelle Flügel auswachsen.

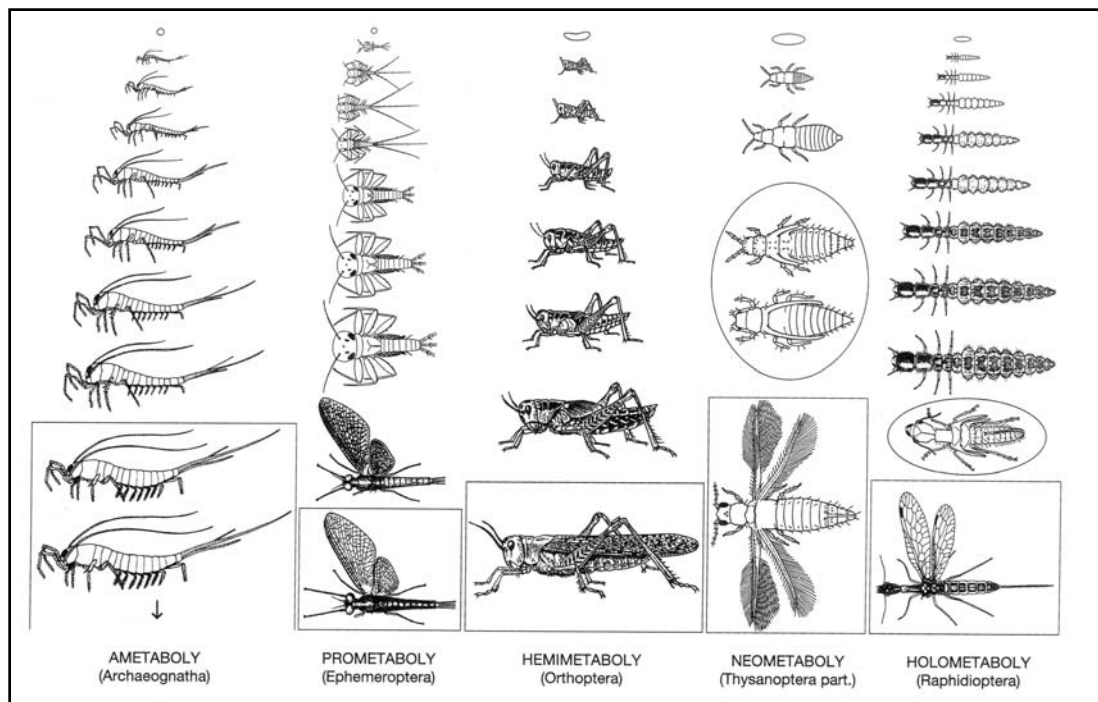


Abb. 1 Grundtypen der Entwicklung höherer Insekten (aus Gilbert et al., 1996) Erläuterungen, siehe Text.

Die juvenilen Stadien *holometaboler* Insekten haben eine andere Organisationsform als die Adulten und werden generell als Larven bezeichnet, auch wenn sie eine aquatische Lebensweise haben. Im Aussehen unterscheiden sie sich in der Regel deutlich von den adulten Tieren und besetzen häufig andere ökologische Nischen. Sie besitzen keine externen Flügelrudimente oder Genitalien. Diese und andere Organe entwickeln sich aus Gruppen undifferenzierter embryonaler Zellen, die als Imaginalscheiben bezeichnet werden. Auf die larvale Phase folgt die Puppenphase, eine Phase ohne Nahrungsaufnahme und mit

verminderter Bewegungsaktivität, wobei das Insekt in der Regel versteckt oder geschützt ist. In dieser pupalen Phase erfolgt der Abbau, Wiederaufbau bzw. die Ummodellierung von Geweben. Die Puppe hat in der Regel externe Anlagen von Flügeln und Genitalien, eine Ausnahme sind hierbei die Puparien der Dipteren (Tönnchenpuppen).

Unabhängig von der monophyletischen Gruppe der *Diptera* haben andere Insektengruppen einen ähnlichen Typ der Metamorphose entwickelt, mit diversen flügellosen Stadien und einem bis drei vollständig oder überwiegenden unbeweglichen präadulten Ruhestadien. Solche Gruppen werden häufig unter dem Begriff *Neometabola* zusammengefaßt. Als *Prometabolie* wird die einzigartige Entwicklung der Maifliegen (*Ephemeroptera*) mit mehreren postmetamorphen flügeltragenden Stadien bezeichnet.

Die endokrine Regulation der Insektenmetamorphose

Eine Reihe von Hormonen sind bekannt, die die Häutung und die Metamorphose bei Insekten steuern. Diese haben oft auch weitere Funktionen. Neben den Häutungshormonen, den Ecdysteroiden, die für jede Häutung unabdingbar sind, sind die Juvenilhormone für die Qualität einer Häutung entscheidend (z.B: larval/larval oder larval/pupal). Eine weitere wichtige Klasse bilden die Peptidhormone. Zu diesen gehören das Bursicon, das die Sklerotisierung der Cutikula induziert, und das Ecdysionshormon, das für den Vorgang des Schlüpfens und die damit verbundenen Änderungen in der motorischen Aktivität und des Verhaltens erforderlich ist. Weitere wichtige Peptidhormone sind das Prothoracotrope Hormon (PTTH), das die Synthese von Ecdysteroiden regelt, und die Allatotropine (AT) und Allatostatine (AS), die die Synthese von Juvenilhormonen regeln. Die beiden letztgenannten Peptidhormonklassen werden in einem separaten Abschnitt vorgestellt (Kapitel 1.2).

- ***Das Prothoracotrope Hormon (PTTH)***

Bei Insekten wird die Synthese von Ecdysteroiden durch Peptidhormone aus dem Gehirn stimuliert. In den frühen 20er Jahren konnte der tschechische Entomologe und Science-Fiction Autor Kopec zeigen, dass das Gehirn eine zentrale Rolle beim Wachstum, den Häutungen und der Metamorphose der Insekten spielt (Kopec, 1922). Er wies mit einer Reihe von Transplantationsexperimenten nach, dass das Gehirn ein endokrines Organ ist, und begründete damit das Wissenschaftsgebiet der Neuroendokrinologie.

Die Klonierung einer cDNA für ein prothoracotropes Hormon (PTTH), das Hormon, dessen Wirkung Kopec 68 Jahren zuvor beobachtet hatte, gelang 1990 beim Seidenspinner *Bombyx mori* (Kawakami et al., 1990) und später bei einigen anderen Insektenspezies.

Bei den meisten in der Folgezeit untersuchten Lepidopteren kommt PTTH in zwei verschiedenen Varianten vor, als hochmolekulares (22-29 kDa, PTTH-I) und als niedermolekulares Peptid (4-7 kDa; PTTH-II), die im Falle des Tabakschwärmers *Manduca sexta* beide in einer Reihe von Bioassays aktiv sind. Durch Immunofluoreszenzanalysen konnte gezeigt werden, dass PTTH bei *Manduca* in zwei Paaren lateraler neurosekretorischer Zellen des Gehirns synthetisiert wird (Agui et al., 1979). Durch die Neurone dieser Zellen wird das Hormon durch die Corpora allata in die Corpora cardiaca transportiert, die auch der Freisetzungsort der Juvenilhormone sind (siehe unten).

Bei *Manduca* sind die PTTH-Ausschüttung und die Ecdysteroidsynthese miteinander korreliert. Einige kleinere Anstiege des PTTH-Titer sind für die Ausbildung der unten erwähnten Reprogrammierungs-Spitze verantwortlich, der darauf folgende stärkere Anstieg induziert die Häutung.

- ***Ecdysteroide***

Ecdyson war das erste Hormon von Invertebraten, das in gereinigter Form vorlag (1954 von Butenandt und Karlson isoliert). Ähnliche Substanzen wurden schon bald darauf identifiziert und unter dem Namen Ecdysteroide zusammengefasst. Diese Gruppe umfasst zur Zeit mehr als 200 verschiedener Naturstoffe, Zoo- oder Phytoecdysteroide und chemisch erzeugte Analoga.

Ecdyson ist ein typisches Steroidhormon mit einem Sterangerüst und einer Cholesterin-Seitenkette.

Unter die hormonelle Kontrolle durch Ecdysteroide fällt eine Vielzahl biologischer Prozesse, u.a. die Häutung bei Embryonen und Postembryonalstadien und die Reproduktion der adulten Insekten. In Insektenlarven sind die Prothoraxdrüsen (oder homologe Organe, z.B. ein Teil der Ringdrüse der Dipteren) der Ort der Ecdyson-Biosynthese. Durch eine Reihe von Stimuli, ausgehend vom Gehirn, sekretieren die Prothoraxdrüsen Ecdyson in die Hämolymphe. Ecdyson wird in einer proteingebundenen Form freigesetzt und nicht in den Drüsen gespeichert. Im Fettkörper, den Malphigischen Gefäßen und dem Mitteldarm wird Ecdyson durch eine 20-Monooxygenase in seine biologisch wirksame Form 20-Hydroxyecdyson (20E) umgewandelt.

Die Prothoraxdrüsen vieler Insektenspezies degenerieren nach der letzten larvalen Häutung oder während der Häutung zum Adultus. Die hormonelle Steuerung während des weiblichen Reproduktionszyklus erfolgt dann durch Ecdysteroide, die von Follikelzellen des Ovars *de novo* synthetisiert werden (Goltzene et al., 1978).

Während der larvalen Entwicklung treten starke Schwankungen im Ecdysteroid-Titer auf, die den Zusammenhang zwischen Häutungen und signifikanten Anstiegen von Ecdysteroiden in der Hämolymphe aufzeigen (Vafopoulou und Steel, 1989). Bei holo- und hemimetabolen Insekten kommt es zu einem starken Anstieg des 20E-Titers vor jeder Häutung. Der 20E-Titer steigt vor der Apolysis, der Trennung der alten Kutikula von der Hypodermis, an, erreicht sein Maximum während oder kurz nach der Apolysis und fällt anschließend zum Zeitpunkt der Häutung auf einen niedrigen Wert oder unter die Nachweisgrenze (Bollenbacher et al., 1981).

Bei den meisten Lepidopteren wurden zwei Ecdysonspitzen im letzten Larvenstadium beobachtet. Der erste, kleinere Anstieg bewirkt eine Änderung im Verhalten der Larve. Die Larve nimmt keine Nahrung mehr auf und sucht einen geeigneten Platz zur Verpuppung auf. Eine weitere wichtige Funktion des ersten Anstiegs ist die Reprogrammierung der larvalen Epidermis von der Synthese larvaler zur Synthese adulter Proteine, deshalb wird dieser Anstieg auch als Reprogrammierungs-Spitze bezeichnet. Der zweite Anstieg ist sehr viel größer und induziert die larval-pupale Häutung. Nach der Verpuppung erfolgt ein sehr hoher und lang anhaltender Anstieg, der die Entwicklung zum adulten Tier begleitet (siehe Abb. 2). Wie oben erwähnt erscheinen Ecdysteroiden im adulten Tier im Zusammenhang mit der Reproduktion erneut.

Die am besten charakterisierte Wirkungsweise von Ecdysteroiden ist ihre Wirkung auf die Transkription spezifischer Gene. Diese Wirkung wird über intrazelluläre Rezeptoren vermittelt, die zur Steroidhormonrezeptor-Superfamilie zählen und in vielen Zielgeweben entwicklungs- und isotypspezifisch exprimiert werden. Die Ecdysteroidrezeptoren sind in der Lage mit dem Transkriptionsfaktor Ultraspiracle (USP) Heterodimere zu bilden. Die Ecdysteroidrezeptoren sind interessante Angriffspunkte für Ecdysteroid-Agonisten bzw. -Antagonisten (siehe unten).

In den letzten Jahren wurden auch eine Vielzahl nicht-genomischer Effekte von Ecdysteroiden gefunden, deren Mechanismus aber bisher ungeklärt ist.

• **Juvenilhormone**

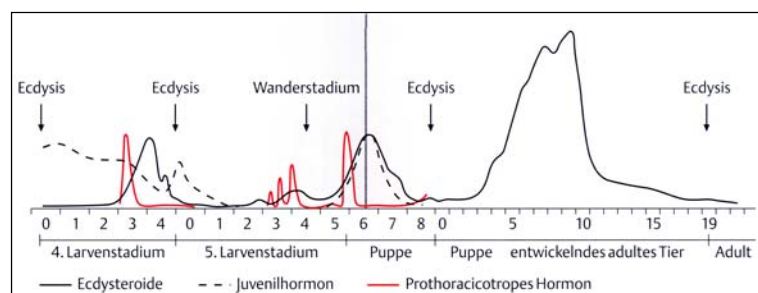
Die Juvenilhormone (JHs) sind eine Gruppe von Sesquiterpenen, die eine vielfältige Rolle bei Insekten spielen. Sie beeinflussen die Embryogenese, die larvalen Häutungen, die Metamorphose, die Kastendetermination sozialer Insekten, die Vitellogeninsynthese und die Entwicklung des Ovars, die Diapause, Farbänderungen und viele verschiedene Aspekte des Metabolismus (Review, siehe Nijhout, 1994). Zur Zeit sind 7 verschiedene Juvenilhormone bekannt, die in verschiedenen Insektengruppen, teilweise auch in Kombinationen vorkommen.

Die Existenz diese Hormonklasse wurde zuerst von Wigglesworth (1934) postuliert, der durch Transplantationsexperimente nachwies, dass diese Hormone durch die Corpora allata sekretiert werden.

Der Name Juvenilhormon entstand aus der Tatsache, dass die Metamorphose von Nymphen zu Imagines bzw. die Entwicklung von Puppen zu adulten Insekten durch diese Hormone blockiert werden. Juvenilhormone lösen selbst keine Häutungen aus, sie bestimmen aber die Qualität der Häutung und werden deshalb auch als Status-quo-Hormone bezeichnet. Bei holometabolen Insekten erfolgen larval/larval Häutungen, wenn Juvenilhormone anwesend sind. Die Verpuppung erfolgt nur in Abwesenheit von JH. Es wird allgemein angenommen, dass die Wirkung von Juvenilhormon nicht konzentrationsabhängig ist, aber dass die Wirkung während kritischer Perioden erfolgt, sogenannten Juvenilhormon-sensitiver Perioden. Wenn Juvenilhormon während einer solchen Periode abwesend ist, erfolgt eine Umprogrammierung der Genexpression und neue Entwicklungsprozesse werden angeschaltet.

Die Wirkungsweise von Juvenilhormonen ist komplex. Einige nukleare Juvenilhormonbindende Proteine sind isoliert worden, sie gehören aber zu keiner der bekannten Rezeptorfamilie und besitzen keine typische DNA-bindende Domäne (Riddiford und Truman, 1994). Direkte Wechselwirkungen von Juvenilhormonen mit der Plasmamembran sind ebenfalls beschrieben worden (Riddiford, 1994).

Abb. 2 Hormontiter während larval-larvaler Häutung und im Verlauf der Metamorphose beim Tabakswärmer *Manduca sexta* (aus Spindler, 1997, verändert).



1.2. Neuropeptide sind Regulatoren des Metabolismus und der Entwicklung von Insekten

Wie oben schon erwähnt, werden bei Insekten zwei Klassen von Hormonen unterschieden. Während die „Drüsen“-Hormone, Ecdysteroide und Juvenilhormone, von speziellen Hormondrüsen produziert werden, werden die Neuropeptide von neurosekretorischen Zellen des ZNS synthetisiert. Neben dem oben beschriebenen PTTH sind weitere Neuropeptide an der Steuerung der postembryonalen Entwicklung und von anderen Stoffwechselprozessen beteiligt. Häutung, Reproduktion, Wasser- und Ionenhaushalt, Stoffwechsel, Muskelkontraktion, Diapause, Verhalten, Farbwechsel und Pheromonsynthese werden hormonell reguliert. Die Funktionen von Neuropeptiden in der Physiologie, der Entwicklung und im Verhalten von Insekten sind intensiv untersucht worden (Review, siehe Gäde et al., 1997).

Allatoregulatorische Substanzen bei holometabolen Insekten

Änderungen des Juvenilhormontiters steuern das Wachstum und die Entwicklung von Insekten und die Reproduktion in den adulten Tieren (siehe oben). Die Änderungen des Titers sind Folge gesteuerter biochemischer Prozesse, wie Synthese, Abbau, Aufnahme und Freisetzung und Transport des Hormons. Die Regulation der Juvenilhormonsynthese in den Zellen der Corpora allata (CA) wird dabei als der wichtigste Kontrollpunkt angesehen (Gilbert et al., 2000). Die Degradation durch spezifische Enzyme scheint ebenso wie der Transport durch die Juvenilhormon-bindenden-Proteine (JHBP) eine weniger wichtige Rolle im Metabolismus dieser Hormonklasse zu spielen.

Die Existenz der *Corpora allata* ist schon lange bekannt (Janet, 1899, Nabert, 1913) und schon 1936 wurde gezeigt, dass durch Entfernen dieses Organs eine vorzeitige Häutung hervorgerufen werden kann (Bounhiol, 1936). Daher wurde das entscheidende Hormon, das von den Corpora allata sezerniert wird, als Juvenilhormon (JH, Wigglesworth, 1936) bezeichnet. Die Corpora allata sind zusätzlich ein Neurohämalorgan für neurosekretorisches Material aus dem Gehirn. Sie bilden zusammen mit den Corpora cardiaca den retrocerebralen Komplex bei Insekten. Bei Lepidopteren sind die Corpora allata durch den Nervus corporis allati, der im Gehirn entspringt, mit den Corpora cardiaca verbunden, während sie bei Dipteren Teil der Ringdrüse sind. Bei *Galleria mellonella*, die zur primitiven Familie der *Pyralidae* zählt, sind die Corpora cardiaca und Corpora allata zu einem Komplex

verschmolzen, der über die Nervi corporis cardiaci I und II (NCCI/II) mit dem Gehirn verbunden ist.

Eine Kontrolle der Juvenilhormonsynthese in den Corpora allata kann über stimulatorische bzw. inhibitorische Signale erfolgen, die diese Drüsen über die Hämolymphe oder durch nervöse Verbindungen erreichen. Bei vielen Insektenpezies ist bekannt, dass ein wichtiger Kontrollmechanismus durch Gehirnzellen besteht, deren Axone sich in die CA verzweigen und die dort einen parakrinen Einfluss auf die Drüsenzellen ausüben (Horseman et al., 1994). Da die Corpora allata aber sowohl durch Axone von typischen neurosekretorischen Zellen, als auch durch typische Hirnneurone innerviert werden, kann auf einen komplexen Steuermechanismus geschlossen werden. Mit der Kobalt-Rückfüllungsmethode (Pipa, 1978) konnten in verschiedenen Insekten die Gehirnzellen identifiziert werden, deren Produkte für eine Steuerung der Juvenilhormonsynthese in Frage kommen (Virant-Doberlet et al., 1994, Copenhaver und Truman, 1986).

Die Möglichkeit, die Juvenilhormonproduktion durch die Corpora allata in vitro zu messen (Pratt und Tobe, 1974) und die Entwicklung von Methoden zur Reinigung von Peptiden aus kleinen Mengen Ausgangsmaterial, ermöglichte die Entdeckung einer Reihe von allatoaktiven Peptiden. Zwei Klassen von regulatorischen Peptiden sind bekannt, Allatotropine und Allatostatine.

Allatotropine

Der erste und bisher einzige isolierte und klonierte allatoaktivierende Faktor war das Allatotropin des Tabakspinners *Manduca sexta* (Mas-AT, Kataoka et al., 1989, Taylor et al., 1996). Dabei handelt es sich um ein amidiertes Trideca-Peptid. Es wurde gezeigt, dass Mas-AT die Juvenilhormonsynthese in adulten *Corpora allata* von *Manduca sexta* und zwei anderen Lepidopteren stimuliert. Eine Stimulation der Juvenilhormonsynthese von larvalen *Corpora allata* konnte in den untersuchten Spezies mit dem verwendeten experimentellen Ansatz nicht nachgewiesen werden. In einer neueren Arbeit konnte jetzt gezeigt werden, dass Mas-AT unter günstigeren Versuchsbedingungen, die larvalen *Corpora allata* der Tomatenmotte *Lacanobia oleracea* aktivieren kann (Audsley et al., 2000).

Das Peptid wurde durch Immunfluoreszenz bei *Manduca sexta* in zwei Paaren ipsilateraler lateraler neurosekretorischer Zellen (Ia₁), in zwei Paaren contralateraler Zellen (III) und in vielen Axonen in den Corpora cardiaca und Corpora allata gefunden (Zitnan et al.,

1995). Weiterhin scheint es in anderen Nerven des ZNS und im Frontalganglion vorzukommen (Bhatt und Horodyski, 1999).

Das Allatotropin der Wachsmotte *Galleria mellonella*

Seit der Identifizierung von Mas-AT, 1989, wurden keine weiteren Allatotropin Sequenzen publiziert und trotz intensiver Bemühungen wurden bei der Suche nach Allatotropinen nur wenige neue Hinweise gefunden.

Lorenz und Hoffmann (1995) konnten eine allatotrope Aktivität in methanolischen Extrakten aus Subösophagialganglien von zwei Grillen, *Gryllus bimaculatus* und *Acheta domesticus*, nachweisen. Kou und Shu-Jung Chen (2000) wiesen in einer neueren Arbeit einen gleichartigen Effekt bei dem Schmetterling *Mythimna loreyi* nach.

Bei der Suche nach einem Allatotropin der Wachsmotte *Galleria mellonella* gelang die Identifizierung eines 20 kDa großen allatoaktivierenden Peptids durch Immunoblotting-Experimente (Bogus und Scheller, 1995). Dafür wurden Gehirnhomogenate von gekühlten Tieren über FPLC (fast-protein-liquid-chromatography) fraktioniert und die verschiedenen Fraktionen auf allatotrope Aktivität getestet. Eine Fraktion, mit deutlicher allatotroper Aktivität wurde zur Herstellung von monoklonalen Antikörpern verwendet. Alle vier auf diese Art gewonnenen Antikörper erkannten in einer Western-blot-Analyse von Gehirnpoteinen eine Bande auf der Höhe von 20 kDa. In einer Immunolokalisation an Totalpräparaten wurde mit diesen Antikörpern ein Paar mediane neurosekretorische Zellen und die Corpora cardiaca von *Galleria mellonella* angefärbt. Dieselben neurosekretorischen Zellen zeigten Immunoreaktivität gegenüber Antikörpern gegen Mas-AT (Zitnan, 1993). Interessant ist die Tatsache, dass alle vier Antikörper in der Lage sind, die Juvenilhormonsynthese *in vitro* zu inhibieren und durch Kühlung stimulierte Extrahäutungen zu unterdrücken. Diese Antikörper wirken also offensichtlich als Allatostatine, indem sie die Allatotropinwirkung unterdrücken.

Allatostatine

Während die Suche nach allatotropen Substanzen trotz intensiver Bemühungen nur mit der Identifizierung einer einzigen Allatotropinsequenz belohnt wurde, wurden im Bereich der Allatostatine, Peptide, welche die Juvenilhormonsynthese hemmen, in den letzten Jahren große Fortschritte erzielt. Die erste Identifizierung eines Allatostatins gelang Stay und Tobe (1991) bei der Schabe *Diploptera punctata*. Bis zum Jahre 2000 wurden insgesamt 13 Allatostatine bei *Diploptera* identifiziert (Gilbert et al., 2000), die alle einen ähnlichen C-

Terminus besitzen und unter der YXFGLamide-Familie zusammengefaßt wurden. Die Axone der Allatostatin-immunoreaktiven lateralen neurosekretorischen Gehirnzellen verzweigen sich in die Corpora cardiaca, was für eine Freisetzung dieser Peptide in die Hämolymphe spricht (Stay et al., 1994).

Bei den Lepidopteren konnte ein Allatotropin bei *Manduca sexta* identifiziert werden (Kramer et al., 1991), das nicht zur Familie der YXFGL-amide-Allatostatine gehört und die Juvenilhormonsynthese larvaler und adulter Corpora allata hemmt. Immunohistochemische Untersuchungen zeigten, dass das Peptid (Mas-AS) unter anderem in zwei Gruppen lateraler neurosekretorischer Zellen produziert wird, deren Axone sich wie bei *Diploptera* in die Corpora cardiaca verzweigen.

Mehr als 40 weitere Mitglieder der Allatostatin-Familie sind in verschiedenen Insektenpezies bekannt, teilweise mit , teilweise ohne allatoinhibitorischer Funktion. Eine große Anzahl weiterer Wirkungen von Allatostatinen auf verschiedene biologische Vorgänge sind bekannt. Bei *Diploptera* wirken Allatostatine, die auch in neurosekretorischen Zellen des Mitteldarms gefunden wurden (Yu et al., 1995), als potente Inhibitoren der Mitteldarmkontraktionen (Stay et al., 1994. Bei Lepidopteren hemmen sie die peristaltischen Bewegungen (Duve et al., 1997), ebenso bei Schaben (Schoofs et al., 1997). Ein Einfluß auf die Freisetzung von Vitellogenin durch den Fettkörper konnte bei *Blatella germanica* nachgewiesen werden (Martin et al., 1996).

Die Funktion der Allatostatine beschränkt sich offensichtlich nicht auf die Regulation der Juvenilhormonsynthese, sie sind außerdem ein Beispiel für „Gehirn-Darm Peptide“ bei Insekten (Gaede et al., 1997).

Neurotransmitter

Da Mas-AT unter Standard-Versuchsbedingungen nicht in der Lage ist die Juvenilhormonproduktion von larvalen Corpora allata zu stimulieren, stellt sich die Frage, wie die larvalen Corpora allata nun tatsächlich aktiviert werden.

Die Tatsache, dass diese Drüse auch von Neuronen mit nervöser Funktion innerviert werden, führte zu der Vermutung, dass eine Regulation über Neurotransmitter existiert. Es konnte gezeigt werden, dass Oktopamin die Juvenilhormonsynthese bei *Locusta* stimuliert (Lafont-Cazal und Baehr, 1988) und ebenso bei larvalen und adulten Honigbienen (Kaatz et al., 1994, Rachinsky 1994). Umgekehrt inhibiert Oktopamin die Juvenilhormonsynthese bei Grillen und Schaben (Thompson et al., 1994, Woodring und Hoffmann, 1994). Die Wirkung von Oktopamin auf die Corpora allata von weiblichen *Blatella germanica* ist abhängig vom

Stadium im Reproduktionszyklus, in dem sich das Tier befindet, und kann sowohl inhibitorisch, als auch stimulatorisch sein (Pastor et al., 1991).

Ähnliche Beobachtungen wurden bei Experimenten mit dem Neurotransmitter Dopamin gemacht (Granger et al., 1996, Wolfgang und Riddiford, 1986).

Zusammenfassung – wie wird Juvenilhormonsynthese durch die Corpora allata reguliert?

Wie wird also die Juvenilhormonproduktion in den Corpora allata reguliert? Es scheint sich um einen komplexen Mechanismus zu handeln, bei dem äußere Einflüsse, allatostimulatorische und allatoinhibitorische Peptide zusammen mit direkter neuronalen Regulation wirken (Abb. 3). Dabei ist die Kompetenz der Corpora allata, auf verschiedene Stimulatoren zu reagieren, abhängig vom Entwicklungszustand des Tieres. Die Tatsache, dass eine große Anzahl identifizierter Allatostatine nur zwei Allatotropinen gegenübersteht, sollte nicht zu der Annahme verleiten, dass Allatostatine eine wichtigere Rolle bei der Regulation spielen, da es sich um multifunktionelle Peptide handelt, die - wie oben erwähnt - auch bei anderen biologischen Prozessen eine Rolle spielen.

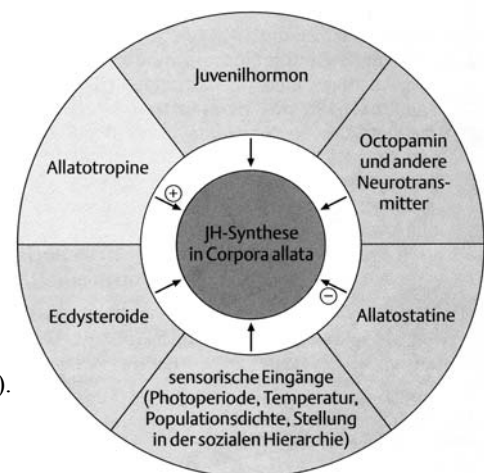


Abb. 3: Regulation der Juvenilhormonsynthese (aus Spindler, 1997).

Die oben gezeigten Daten zeigen, dass verschiedene Neuropeptide in der Lage sind, die Corpora allata *in vitro* zu beeinflussen, aber tun sie das auch tatsächlich *in vivo*? Liegt die Hauptfunktion der Allatostatin- Peptidfamilie in der Regulation der Juvenilhormonsynthese, oder sind die gezeigten Effekte ohne biologische Bedeutung? Um diese Fragen zu beantworten, müssen die entsprechenden Peptidhormone und ihre Rezeptoren identifiziert und charakterisiert werden. Erst dann kann ein schlüssiges Bild von der Regulation der Juvenilhormonsynthese entworfen werden.

1.3. Die Rolle von Speicherproteinen in der postembryonalen Entwicklung der Insekten

Die larvale Phase im Lebenszyklus eines holometabolen Insekts ist in der Regel eine ausgesprochene Fressphase, in der das Tier seine Körpermasse vervielfacht und Reserven für die anschließende Metamorphose anlegt. Die Speicherung von Aminosäuren erfolgt in Form von Speicherproteingranula im Fettkörper der Insektenlarve.

1.3.1. Hexamerine - larvale Serumproteine holometaboler Insekten

Der larvale Fettkörper

Der Fettkörper ist das mengenmäßig größte Organ in den Larven von holometabolen Insekten. Dieses Organ hat diverse Funktionen im intermediären Metabolismus von Kohlenhydraten, Fetten und stickstoffhaltigen Substanzen, bei der Speicherung von Glykogen, Fetten und Proteinen, der Synthese und Regulation des Blutzuckers und der Synthese der Hämolymp- Proteine. Seine Funktion läßt sich mit der Leber bei Vertebraten vergleichen (Keeley, 1985).

Bei *Calliphora vicina* besteht der Fettkörper aus drei verschiedenen Zelltypen. Neben den großen Trophozyten, die den Hauptteil des Fettkörpers ausmachen, kommen zwei kleinere Typen vor, die Urozyten und die Myzetozyten (Dean et al., 1985). Alle Trophozyten sind morphologisch betrachtet gleich und es wird vermutet, dass sie eine identische Funktion ausüben.

Einige Beobachtungen sprechen dafür, dass es bei *Lepidopteren* und *Dipteren* regionale Unterschiede in der Fettkörperfunktion gibt. Haunerland und Shirk (1994) konnten zeigen, dass es im Fettkörper des Schmetterlings *Helicoverpa zea* zwei Typen von Fettkörpergewebe gibt, den peripheren und den periviszeralen. Die beiden Typen unterscheiden sich bezüglich der Synthese und Aufnahme von Speicherproteinen, was bei dieser Spezies gut zu beobachten ist, da sie ein farbiges Speicherprotein besitzt (Haunerland und Bowers, 1984). Die Synthese von Speicherproteinen erfolgt im peripheren Fettkörper, während die Aufnahme und Speicherung durch den periviszeralen Fettkörper erfolgt (Haunerland und Shirk, 1994).

Bei Dipteren wurden Unterschiede im Fettkörpergewebe entlang der anterior-posterioren Achse beobachtet. Ein Gradient von anterior nach posterior wurde bei *Drosophila*

melanogaster bezüglich der Menge der genomischen DNA in den Fettkörperzellen und der Menge der gebildeten Speicherprotein-Granula beschrieben (Butterworth und Rasch, 1986).

In einer neueren Arbeit wurde ein Protein mit unbekannter Funktion bei der Fleischfliege *Sarcophaga peregrina* beschrieben, das nur im anterioren Teil des larvalen Fettkörpers exprimiert wird (Nakajima und Natori, 2000). Das ist ebenfalls ein Hinweis darauf, dass der Fettkörper der Dipteren entlang der anterior-posterioren Achse funktionelle Unterschiede besitzt.

Speicherprotein-Granula

Das Auftreten von Speicherprotein-Granula im Fettkörpergewebe wurde in vielen mikroskopischen Studien nachgewiesen (Bishop, 1922, 1923, Butterworth, 1965). Die Speicherproteine werden durch den Fettkörper der Insektenlarve synthetisiert. Sie werden aber nicht direkt als Granula eingelagert, sondern zuerst in die Hämolymphe sezerniert. Später werden sie von den Zellen des Fettkörpers wieder aufgenommen und in Granula gespeichert (Locke und Collins, 1968, Caglayan und Gilbert, 1987, Tojo et al., 1978). Die gespeicherten Proteine sind reich an aromatischen Aminosäuren und dienen vermutlich als Aminosäure-Quelle für die Proteinbiosynthese während der Metamorphose, einem Lebensabschnitt, in dem das Insekt keine Nahrung aufnimmt und daher auf endogene Vorräte angewiesen ist (Levenbook und Bauer, 1984). Die Hauptspeicherproteine bei holometabolen Insektenlarven gehören zur Familie der Hexamerine.

Hexamerine - Entdeckung, Eigenschaften, Struktur und Funktion

1971 wurde erstmals ein Serumprotein in der Larve von *Calliphora erythrocephala* biochemisch beschrieben, das *Calliphorin* (Munn et al., 1971). Ähnliche Proteine, die in der Proteinfamilie der Hexamerine zusammengefasst werden, wurden in der Folgezeit in vielen anderen Insektenpezies nachgewiesen und die Gene und cDNAs kloniert (Review siehe Burmester et al., 1998). Bis heute sind ca. 50 Hexamerin-DNA-Sequenzen aus verschiedenen holo- und hemimetabolen Insektenpezies bekannt.

Die Analyse der Aminosäuresequenz zeigt, dass es verschiedene Gruppen von Hexamerinen gibt, die sich in der Evolution aus einem gemeinsamen Vorläufer entwickelt haben. Bei Dipteren werden zwei Unterfamilien unterschieden, die Arylphorine und die LSP-2-Unterfamilie. Bei Lepidopteren existieren drei Unterfamilien: methioninreiche Speicherproteine, Arylphorine und Riboflavin-bindende Proteine (Review, siehe Hauerland, 1996, Burmester et al., 1997).

Eine Gemeinsamkeit aller Hexamerine ist ihr Aufbau aus sechs Untereinheiten mit einer molekularen Masse zwischen 70 und 90 kDa (Review, siehe Telfer und Kunkel, 1991). Die Untereinheiten formen dabei Hexamere mit einer molekularen Masse von ca. 500 kDa.

Alle Hexamerine zeigen in ihrer Primär- und Sekundärstruktur eine klare Homologie zu den Hämocyaninen der *Crustacea* und haben sich vermutlich aus einem gemeinsamen Vorläufer entwickelt (Beitema et al., 1994, Review, siehe Burmester, 1997). Bei Dipteren sind auch die Tertiär- und Quartärstrukturen der Hexamerine denen der Hämocyanine ähnlich (Markl et al., 1992). Hämocyanine sind sauerstoffbindende, kupferhaltige Proteine in der Hämolymphe von Arthropoden, die ebenfalls Hexamere oder Multihexamere bilden. Es wird vermutet, dass aufgrund der Entwicklung des Tracheensystems der Insekten bei diesen kein Bedarf mehr an sauerstoffbindenden Hämolympheproteinen bestand. Im Rahmen eines Funktionswechsels dieser Proteine ging die Fähigkeit zur Sauerstoffbindung verloren (Burmester und Scheller, 1991).

Die biologische Funktion der Hexamerine I

Die Hauptfunktionen der Hexamerine ist, wie oben erwähnt, die Speicherung von Aminosäuren, die später während der Metamorphose zum Aufbau adulter Proteine verwendet werden.

Der Lebenszyklus der Hexamerine von *C. vicina* ist in Abb. 4 dargestellt. Die Biosynthese der Hexamerine erfolgt ausschließlich durch das Fettkörpergewebe der Fresslarve. Die Synthese und Abgabe in die Hämolymphe beginnt mit dem Eintritt in das dritte und letzte Larvenstadium (3. Tag nach dem Schlüpfen). Der Hexamerinegehalt in der Hämolymphe steigt in den folgenden fünf Tagen kontinuierlich an. Am Ende des letzten Larvenstadiums sind zwischen 80 und 90% der löslichen Proteine in der Hämolymphe von *C. vicina* Hexamerine (Sekeris und Scheller, 1977).

Am Ende des letzten Larvenstadiums, kurz vor dem Eintritt in die Häutung zur Puppe, stoppt die Hexamerin-Biosynthese und der Fettkörper beginnt mit der selektiven Aufnahme und Einlagerung der Hexamerine. Zu diesem Zeitpunkt tauchen elektronendichte Granula und coated vesicles in den Zellen des Fettkörpers auf (Marx, persönliche Mitteilung, unveröffentlicht). Dieser Funktionswechsel des Fettkörpers - von Proteinbiosynthese zu Proteinspeicherung - wird durch einen Anstieg der Konzentration des Häutungshormons 20-Hydroxyecdysen (20-E) induziert (siehe unten).

Später in der Metamorphose werden die Granula und die darin gespeicherten Proteine hydrolytisch abgebaut. Die dabei gewonnene Energie und die freigesetzten Aminosäuren dienen dem Aufbau der adulten Gewebe (Levenbook und Bauer, 1984, Dean et al., 1985). Ein Teil der Hexamerine konnte in einer undegradierten Form in der adulten Kutikula nachgewiesen werden (König et al., 1986, Schenkel und Scheller, 1986).

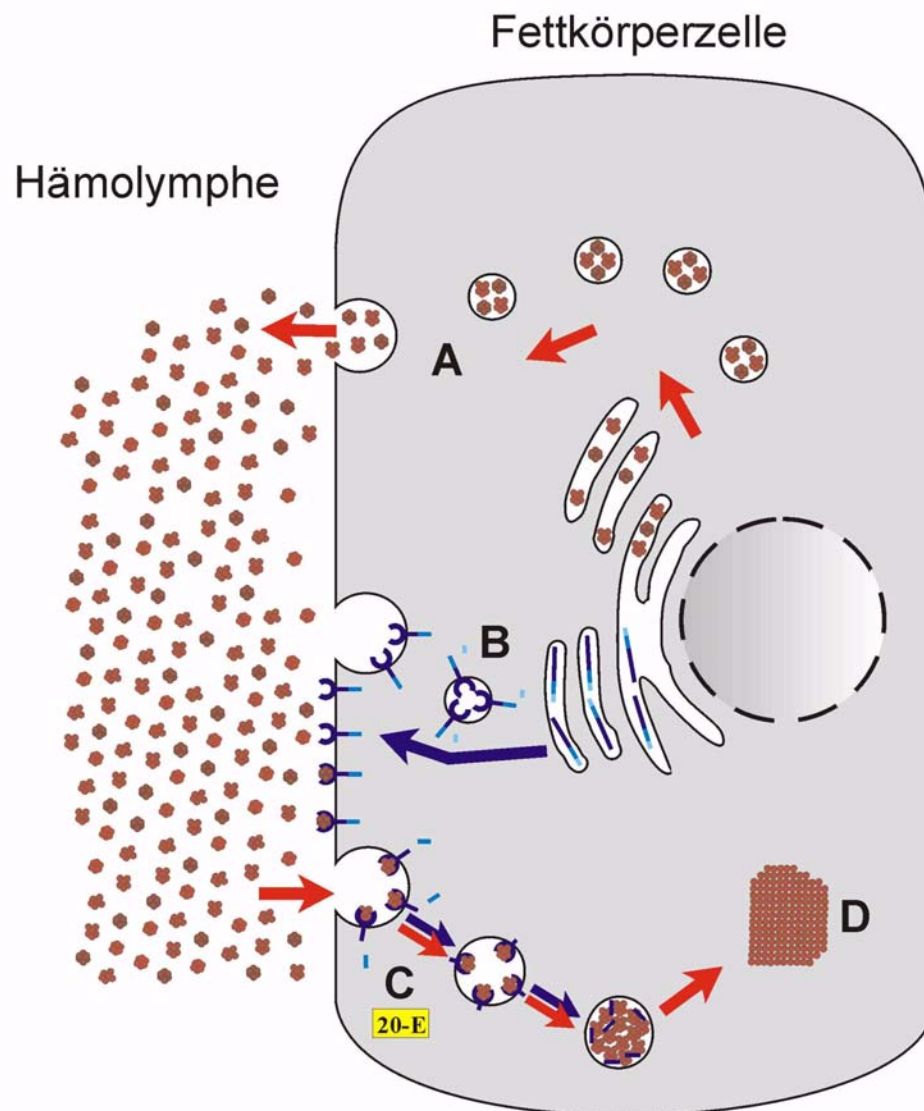


Abb. 4 Modell der Hexamerin-Synthese und Aufnahme bei *C. vicina* nach Burmester et al., (1995). **A**) Synthese und Ausscheidung von Hexamerinen (rot), **B**) 1. Prozessierungsschritt des Rezeptors (blau) und Transport zur Plasmamembran, **C**) 2. Prozessierungsschritt des Rezeptors und Endozytose der Hexamerine, **D**) Einlagerung in Speicherprotein-Granula, 20E = 20-Hydroxyecdysen. Erläuterungen zur Prozessierung des Rezeptors und der Wirkung von 20E siehe unten.

Die biologische Funktion der Hexamerine II

Neben ihrer Aufgabe als Speicherproteine erfüllen diese Proteine noch eine Vielzahl weiterer wichtiger Funktionen.

Es konnte gezeigt werden, dass Hexamerine als Transportmoleküle für kleine organische Substanzen dienen, wie z.B. für Riboflavin (Magee et al., 1994), Juvenilhormon (Braun und Wyatt, 1996), Ecdyson (Enderle et al., 1983, Scheller et al., 1990) und Insektizide (Haunerland et al., 1986).

Außerdem gibt es Hinweise darauf, dass Hexamerine auch an der Abwehr von eingedrungenen Parasiten beteiligt sind. Bei dem Mehlkäfer *Tenebrio molitor* wurde ein 86 kDa großes Hexamerin beschrieben, welches an der Einkapselung von eingedrunenem Fremdmaterial beteiligt ist - eine der Hauptabwehrstrategien von Insekten gegen Parasiten (Cho et al., 1999).

Bei der Schabe *Blaberus discoidialis* wurde ein 86 kDa großes Hexamerin identifiziert, das spezifisch an Laminarin bindet, ein beta-1,3-Glucan aus Pilzen (Chen et al., 1999). Aufgrund dieser Eigenschaft wurde dieses Protein als Lektin charakterisiert - Lektine sind Bestandteil des Einkapselungsmechanismus.

In einem ähnlichen Experiment wurde mit demselben Laminarin ein 85 kDa Protein aus der Hämolymphe von *Locusta migratoria* isoliert, das allerdings nicht weiter charakterisiert wurde (Duvic und Brehelin, 1998).

Ein indirekter Hinweis auf eine mögliche Beteiligung der Hexamerine an der Abwehr von Parasiten wurde bei der Untersuchung des Parasitismus der Schlupfwespe *Campoletis sonorensis* an der Larve des Schmetterlings *Heliothis virescens* gefunden (Shelby und Webb, 1997). Die Wespe injiziert zusammen mit ihrem Ei ein poly-DNA-Virus in die Larve. Das Virus „beschützt“ anschließend das Wespenei, indem es Veränderungen in der Physiologie und Entwicklung des Opfers induziert. Unter anderem wird dabei die Translation der mRNA von Hexamerinmonomeren selektiv unterdrückt (Shelby und Webb, 1994).

Eine Beteiligung von Hexamerinen an der Verteidigung der Insektenlarve gegen eingedrungene Parasiten scheint sehr wahrscheinlich. Dabei wirken sie vermutlich zusammen mit anderen Proteinen bei der Einkapselung von Fremdmaterial mit.

1.3.2. Hexamerinrezeptoren und rezeptorvermittelte Endocytose

Der Transport von Hexamerin-Molekülen aus der Hämolymphe durch die Zellmembran der Fettkörperzellen wird durch spezifische Rezeptoren vermittelt (Review siehe Haunerland, 1996 und Burmester und Scheller, 2000).

Ein solches hexamerinbindendes Protein wurde erstmals von Natori für die Fleischfliege *Sarcophaga peregrina* beschrieben (Ueno und Natori, 1982, 1984). Da die Autoren das Protein in einem Immuofluoreszenzexperiment nicht in der Plasmamembran nachweisen konnten, bezweifelten sie allerdings, dass das beschriebene Protein dort lokalisiert ist und als Rezeptor für die Endozytose dient. Burmester und Scheller (1995) konnten bei der nahe verwandten Fliegenspezies *Calliphora vicina* zeigen, dass dieses Protein tatsächlich ein Rezeptor ist, der die Endozytose von Hexamerinen vermittelt.

Bis jetzt sind drei Hexamerinrezeptoren bei Dipteren kloniert worden (*Sarcophaga peregrina*, Ueno und Natori, 1982; *Calliphora vicina*, Burmester und Scheller, 1995; *Drosophila melanogaster*, Burmester, 1999). Andere Rezeptorproteine bei Dipteren und Lepidopteren sind biochemisch charakterisiert (Wang und Haunerland 1994, Burmester und Scheller, 1997, Kirankumar et al., 1997, Dutta Gupta, 2000).

Bei Dipteren läuft eine konservierte Prozessierung von einem größeren Vorläuferläuferpeptid zum funktionellen Rezeptor ab (Burmester und Scheller, 1995, Burmester et al., 1999, Chung et al. 1995). Dabei erfährt das Vorläuferpeptid eine Reihe von posttranslationalen Spaltungen, wobei ein Signalpeptid abgespalten wird und drei längere Polypeptide entstehen (Burmester und Scheller, 1995, 1997, Burmester et al. 1999, Chung et al. 1995). Die Länge der Fragmente variiert dabei zwischen verschiedenen Spezies, wogegen der Prozessierungsmechanismus an sich konserviert zu sein scheint.

Bei *C. vicina* wird das Rezeptorprotein als 130 kDa großes Vorläuferpeptid (ABP130) synthetisiert, wobei das Signalpeptid am N-Terminus sofort entfernt wird (Burmester und Scheller, 1997, siehe Abb. 5). Die zweite Spaltung erfolgt beim Durchtritt des Peptids durch den Golgi-Apparat. Vermutlich durch eine convertaseähnliche Serin-Protease wird das Vorläuferpeptid an einer typischen dibasischen Spaltstelle in ein 96 kDa großes hexamerinbindendes Protein (ABP96) und ein 45 kDa großes C-terminales Fragment (P45) gespalten. ABP96 konnte in der Plasmamembran von Fettkörperzellen nachgewiesen werden und ist vermutlich der funktionelle Rezeptor. Gleichzeitig mit dem Beginn der Hexamerinaufnahme durch die Fettkörperzellen erfolgt die dritte Spaltung des Rezeptorproteins an einer dibasischen Spaltstelle, die eine typische Erkennungssequenz für elastaseähnliche Serin-Proteasen besitzt.

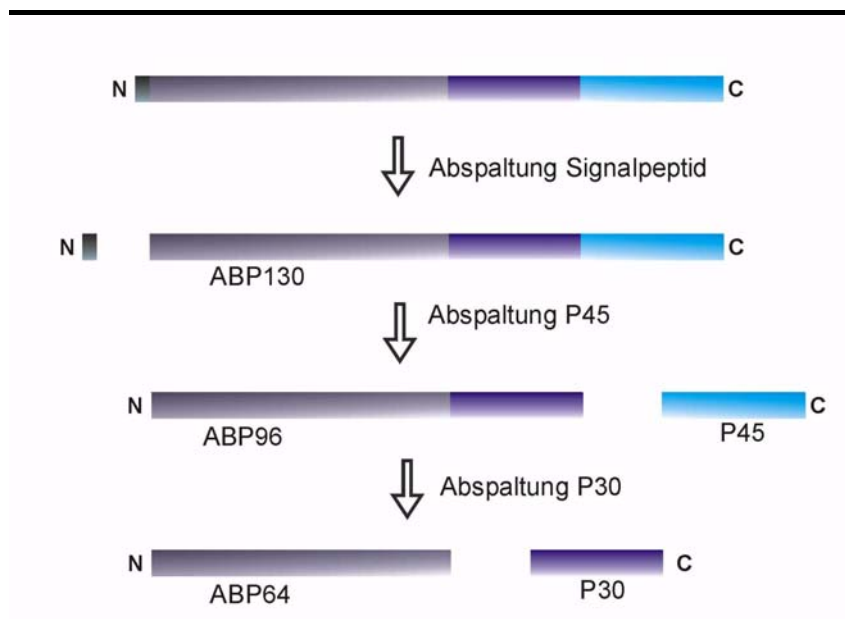


Abb. 5 Sequentielle Spaltung des Hexamerinrezeptor-Vorläuferpeptids von *C. vicina* (nach Burmester und Scheller, 1997)

Eine derartige Prozessierung konnte bisher nur bei Dipteren nachgewiesen werden (Burmester und Scheller, 1995, 1997, Burmester et al., 1999, Chung et al., 1995). Bei Lepidopteren wurden keine Fragmente, die auf ein derartiges Prozessierungsmuster schließen lassen, gefunden (Kirankumar et al., 1997, Wang und Hauerland 1994).

Regulation der Hexamerin-Synthese und -Resorption durch Ecdyson

Die Daten bezüglich der Wirkung von Ecdysteroiden auf die Biosynthese von Hexamerinen sind widersprüchlich. Einige Autoren berichten über einen hemmenden Effekt (Richards, 1981, Pau et al., 1979, Ray et al., 1987, Webb und Ridiford, 1988), wogegen andere eine Stimulation postulieren (Jowett und Postlethwait, 1981, Lepesant et al., 1982, Mousseron-Grall et al., 1997, Powell et al., 1984) und eine dritte Fraktion keinen Effekt detektieren konnte (Caglayan und Gilbert, 1987).

Bei *C. vicina* wurde ein hemmender Effekt von 20E auf die Proteinbiosynthese der Hexamerine beobachtet (Schenkel et al., 1983, Burmester et al., 1995), ein Effekt, der mit dem Auftreten eines kleinen Anstiegs der Ecdyson-Konzentration am Ende der Fressphase der Larve korreliert. Die Regulation scheint hierbei auf der Ebene der Translation zu erfolgen. In unserer Arbeitsgruppe konnte kürzlich ein hemmender Effekt von 20E auf die Transkription einer Hexamerin-mRNA bei dem Mehlkäfer *Tenebrio molitor* nachgewiesen werden (Schäfer, persönliche Mitteilung, unveröffentlicht).

Im Gegensatz zu der unklaren Situation bei der Proteinbiosynthese der Hexamerine ist der Einfluß von Ecdyson auf die Aufnahme von Hexamerinen und die Bildung von Speichergranula eindeutig ein aktivierender (Lepesant et al., 1978, Tojo et al., 1978, Ueno und Natori, 1982, Ismail und Gupta, 1990, Burmester und Scheller, 1995, Burmester et al., 1995, Ueneo et al., 1983). Besonders interessant ist dabei die Wirkung von 20E auf die Prozessierung der Hexamerinrezeptoren. Bei *C. vicina* wird die Spaltung des funktionellen Hexamerinrezeptors (ABP96) in ABP64 und P30 (siehe Abb. 5, oben) von 20E initiiert (Burmester und Scheller, 1997). Eine identische Wirkung konnte bei *D. melanogaster* beobachtet werden (Burmester et al., 1999). Dieser Effekt konnte auch bei einer gehemmten Proteinbiosynthese nachgewiesen werden und ist daher posttranslational und nicht über das klassische Modell der Genaktivierung durch Ecdyson erklärbar.

Der Hexamerin/Hexamerinrezeptor-Komplex – ein neuer Ansatzpunkt für die Entwicklung von Insektiziden

Die rezeptorvermittelte Aufnahme von Hexamerinen ist ein wichtiger Prozess und für die erfolgreiche Metamorphose holometaboler Insekten unabdingbar. Ein Wirkstoff, der spezifisch diesen Vorgang inhibiert, würde die Puppe von ihrer Aminosäurequelle abschneiden und könnte ein hochspezifisches Insektizid sein. Da ein vergleichbarer Prozess bei Vertebraten nicht existiert, ist eine toxische Wirkung auf diese Tiergruppe unwahrscheinlich.

In der Literatur ist bisher nur ein Wirkstoff beschrieben, der die Aufnahme von Speicherproteinen aus der Hämolymphe eines Schmetterlings inhibiert – Glutaurine (gamma-L-Glutamyltaurin, Sass et al., 1986). Über den Wirkungsmechanismus diese Substanz ist nichts bekannt, aber eine direkte Wirkung auf einen Hexamerinrezeptor ist eher unwahrscheinlich, da Glutaurin hormonähnliche Effekte auf die Metamorphose von Amphibienlarven (Feuer et al., 1979) und Neurohormon-ähnliche Effekte auf den Herzschlag von *Locusta migratoria* ausübt (Feuer und Rozsa, 1981) und deshalb von einer Wirkung auf einer anderen Ebene ausgegangen werden kann.

1.4. Schema der hormonellen Regulation der postembryonalen Entwicklung bei Insekten

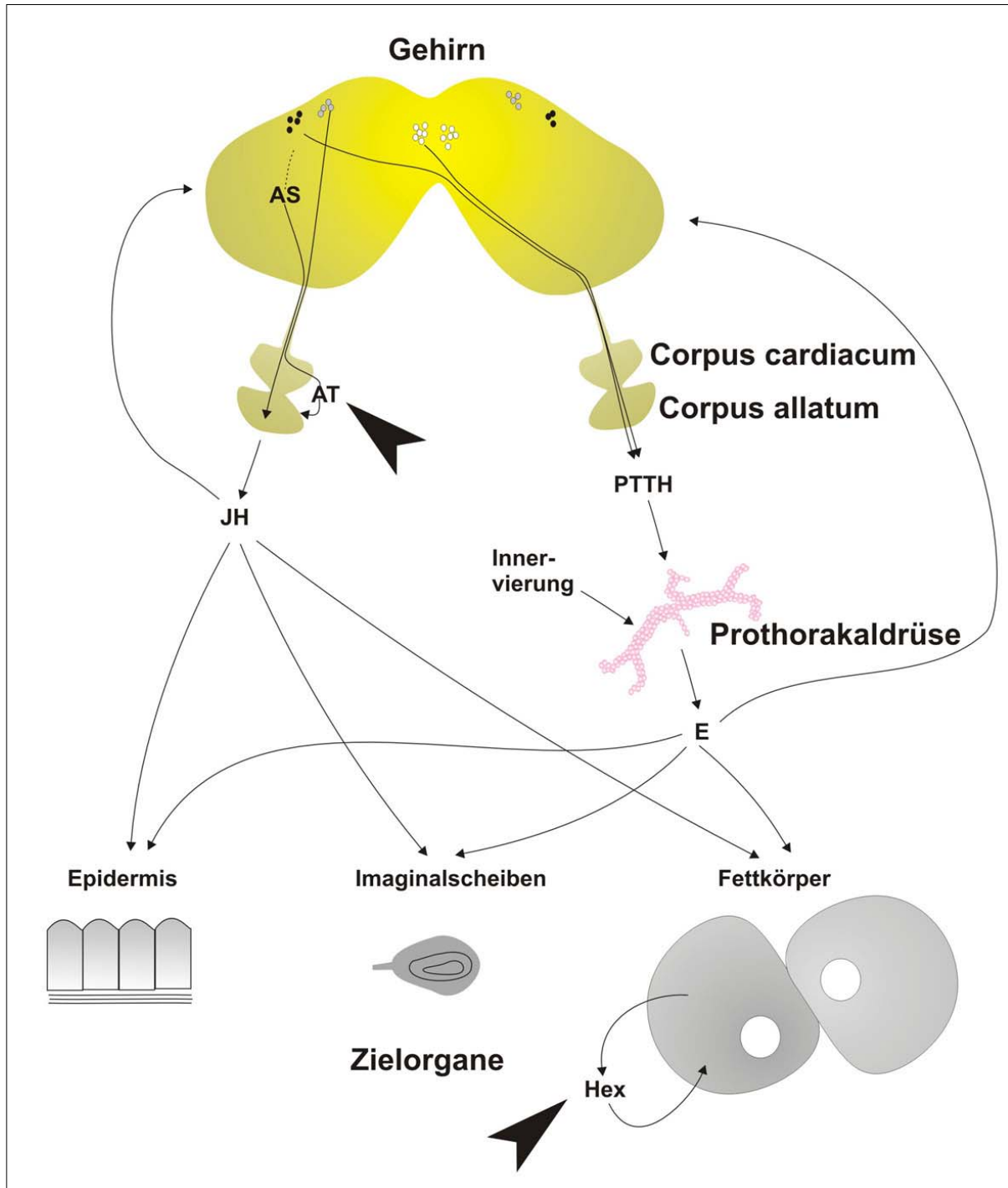


Abb. 6 Die Endokrine Kaskade in der Insekten-Metamorphose
 AS = Allatostatine, AT = Allatotropine, E= Ecdysteroide, Hex = Hexamerine, JH = Juvenilhormone, PTTH = Prothorakotropes Hormon, die schwarzen Pfeilspitzen kennzeichnen die in der vorliegenden Arbeit untersuchten Teilgebiete.

In diesem Kapitel sollen die vorne vorgestellten Interessengebiete dieser Arbeit in einem Schema zusammengefasst werden. Die Abb. 6 gibt eine vereinfachte Übersicht über die Regulation der Metamorphose bei Lepidopteren, das gezeigte Schema ist aber prinzipiell auf alle Insekten übertragbar.

- Spezifische neurosekretorische Zellen im Insektengehirn synthetisieren ein Neuropeptid, PTTH, das zu den Corpora allata transportiert und dort in Abhängigkeit von äußeren Einflüssen in die Hämolymphe freigesetzt wird. PTTH wirkt auf die Prothorakal- oder Häutungsdrüsen und stimuliert die Ecdysteroidbiosynthese. Ecdysterioide (E) werden in die Hämolymphe sezerniert. In der Hämolymphe und in den Zellen der Zielgewebe erfolgen chemische Modifikationen die zur Bildung des eigentlich wirksamen Häutungshormons 20-Hydroxyecdysen führen, das in den Zielgeweben aktiv ist.
- Die Synthese und Freisetzung von Juvenilhormonen (JH) durch die Corpora allata steht unter der Kontrolle von Neuropeptiden, die wie PTTH in neurosekretorischen Zellen des Gehirns synthetisiert werden. Allatotropine (AT) stimulieren die JH-Synthese, wohingegen Allatostatine (AS) eine inhibitorische Wirkung haben.
- Der Zeitpunkt und die Menge des synthetisierten und freigesetzten JHs führt zu einer Modulation der Ecdysteroidwirkung in den Zellen der Zielorgane. Die drei gezeigten Zielorgane - Epidermis, Imaginalscheiben und Fettkörper - stehen stellvertretend für alle Gewebe, die in Laufe der Metamorphose Veränderungen erfahren. Die Synthese, Freisetzung und Wiederaufnahme von Hexamerinen (Hex) durch den Fettkörper ist ein Prozess, der durch die Gewebshormone hochgradig geregelt ist (siehe oben).

1.5. Ansätze zur Entwicklung neuartiger Insektizide

Es besteht ein großer Bedarf an neuen Wirkstoffen für die Kontrolle von Schadinsekten. Insekten treten als Schädlinge an Nutzpflanzen und Tieren auf und sind außerdem Überträger verschiedener Krankheiten wie Malaria, Schlafkrankheit und der Pest. Die „klassischen“ organischen Insektizide sind ein grundlegender Bestandteil der modernen agrotechnischen Praxis und für die Kontrolle von Schadinsekten unverzichtbar geworden insbesondere in Entwicklungsländern.

Die großflächige Anwendung von organischen Wirkstoffen führt allerdings zu einer Reihe von Problemen, die mit den Eigenschaften der verwendeten Stoffe zusammenhängen. Die meisten Insektizide wirken gleichermaßen auf Schad- wie auch auf Nutzinsekten, zeigen also eine geringe Spezifität. Außerdem führte der Einsatz im großen Maßstab über einen längeren Zeitraum hinweg zur Ausbildung von immer stärkeren Resistenzen gegenüber herkömmlichen Insektiziden (z. B. Organochloriden, Organophosphaten, Carbamaten, Pyrethroiden, Benzimidazolen), was den Einsatz immer höherer Dosen notwendig machte. Ein großes Problem ist auch die Akkumulation von chlorierten Wirkstoffen und deren Metaboliten in höheren Tieren. Das Paradebeispiel hierfür ist die ökotoxikologische Wirkung von DDT bzw. des Abbauprodukts p,p'-DDE (Bitman et al., 1970), die zur Verdünnung der Eierschalen und damit zu einem Zusammenbruch der Weißkopfseeadlerpopulation an der Ostküste der USA führte (Review, siehe Bowermann et al., 1995).

Pyrethroide werden aufgrund ihrer vermeintlich geringen Toxizität gegenüber Wirbeltieren und ihrer hohen Toxizität gegenüber Insekten zunehmend in der Schädlingskontrolle eingesetzt. Ein großes Problem ist dabei der unsachgemäße Einsatz solcher Insektizide in Entwicklungsländern. Ein Blick auf die Fülle von Veröffentlichungen über Vergiftungserscheinungen beim Menschen durch Pyrethroide macht dies deutlich.

Diese Nachteile führten zu einem Mangel an Akzeptanz in der Bevölkerung der entwickelten Länder und machen die Entwicklung neuer Wirkstoffe mit geringerer Toxizität gegenüber Wirbeltieren und neuen, resistenzbrechenden Eigenschaften notwendig.

Das Hormonsystem der Insekten wurde schon in den 70er Jahren als vielversprechender Angriffspunkt für die Kontrolle von Schadinsekten entdeckt. Der Auslöser war die Entdeckung des „Papierfaktors“ durch Slama und Williams (1966). Die Autoren fanden, dass ein amerikanisches Zeitungspapier einen Stoff enthielt, der die Reproduktion von Schaben verhinderte. Die Beobachtung, dass eine ganze Insektenpopulation die Fähigkeit zur Reproduktion durch Kontakt mit einer einfachen Zeitung verlor, fand große Beachtung bei vielen Wissenschaftlern, die sich mit der Suche nach „ungiftigen“ Wirkstoffen zur

Insektenkontrolle beschäftigten. Noch im selben Jahr wurde der "Papierfaktor" als Juvenilhormonanalogen identifiziert (Bowers et al., 1966, Cerny et al., 1967).

Von der Aussicht auf lukrative Kooperationen mit agrochemischen Konzernen stimuliert wurde im Bereich der Insektenendokrinologie und -entwicklungsbiologie in den folgenden Jahren intensiv nach Wirkstoffen geforscht, die die Entwicklung von Insekten beeinflussen. Diverse Wirkstoffe wurden entdeckt und zum Teil auch kommerziell vermarktet. Sie werden unter dem Begriff Insekten-Wachstumsregulatoren (insect growth regulators, **IGRs**) zusammengefaßt. Darunter fallen die Hormon-Analoga und -Antagonisten, Inhibitoren der Cuticula-Synthese und Degradation und Wirkstoffe mit bis dato ungeklärter Wirkungsweise (Londershausen, 1996).

Im Bereich der Hormon-Analoga und -Antagonisten werden neben Ecdysteroiden (z.B. Tebufenozid) vor allem Juvenoide kommerziell eingesetzt. Synthetische Juvenoide wie z.B. Methopren, Fenoxycarb und Pyriproyfen werden im Bereich der Tiergesundheit und Hygiene erfolgreich gegen Flöhe, Mücken, Schaben und Fliegenspezies eingesetzt (Londershausen et al., 1996). Ein großer Nachteil von Juvenilhormon-Analoga ist das regelmäßige Auftreten von Superlarven und die relativ langsame Wirkung. Anfänglich wurde vermutet, dass Insekten nicht in der Lage sein würden, Resistenzen gegen Wirkstoffe zu entwickeln, die ihre eigenen Hormone widerspiegeln (Williams, 1967). Doch schon 1972 konnten Resistenzen gegen Methopren in mehreren Insektenspezies unter Laborbedingungen erzeugt werden (Dyte, 1972, Cerf und Georghiou, 1972). Der Mechanismus der Methopren-Resistenz in der *Drosophila* Mutante Met, konnte aufgeklärt werden (Shemshedini und Wilson, 1990). Hierbei spielt ein cytosolisches Juvenilhormon-bindendes Protein die entscheidende Rolle. Dass derartige Resistenzen noch nicht „im Feld“ beobachtet wurden liegt vermutlich daran, dass Methopren in der Landwirtschaft nur in geringem Umfang verwendet wird.

Da die IGRs die in sie gesetzten Erwartungen nur zum Teil erfüllt haben, scheinen die Forschungsaktivitäten auf diesem Gebiet nachzulassen, obwohl ab und zu neue Mittel auf den Markt kommen (Londershausen, 1996). Andere Angriffspunkte und Strategien zur Schädlingskontrolle werden gesucht und dabei wächst das Interesse an Insekten-Peptidhormonen. Dabei sind verschiedene Ansätze denkbar, wie die Applikation synthetischer Peptide, die Benutzung von Baculoviren als Überträger (Menn und Borkovec, 1989, Masler et al., 1993) oder Eingriffe in Spaltung, Prozessierung und Modifikation der Hormon-Vorläuferpeptide oder die Degradation der Peptide durch membrangebundene Peptidasen (O`Shea, 1991). Vor einem möglichen Einsatz derartiger Wirkstoffe, müssen

allerdings noch schwierige Problem, wie z.B. die Stabilität der Peptide, Aufnahme, Transport zum Zielgewebe, Wirkung auf Vertebraten usw. untersucht und gelöst werden.

Gordon (1997) konnte in einer Arbeit zeigen, dass die Wirkung von Pyrethroiden durch Kombination mit einem kurzen Peptid aus dem Gift eines Skorpions verstärkt werden kann. Beide Wirkstoffe greifen an denselben Natrium-Ionenkanälen an, allerdings an anderen Stellen. Eine solche Kombination hat den Vorteil, dass zum einen die Dosis des Pyrethroids gesenkt werden kann, zum anderen die Ausbildung von Resistenzen erschwert wird.

Ein ähnlicher Ansatz könnte die Kombination eines Juvenilhormonanalogs mit einem Allatotropin sein. Durch Anregung der endogenen Juvenilhormonsynthese würde die Wirkung des Juvenoids verstärkt.

1.6. Detektion von Protein/Protein Interaktionen im Hefe-Two-Hybrid-System

Protein/Protein-Interaktionen

Mit dem Voranschreiten der diversen Genom-Projekte füllen sich die Datenbanken mit Sequenzen, die für sich allein relativ wenig nützliche Information liefern. Die große Herausforderung in der Zukunft liegt in der Analyse der Funktion der gefundenen Gene - Schätzungen gehen von ca. 26 000 bis 39 000 offenen Leserastern (ORF) im menschlichen Genom aus (Venter et al., 2001) und ca. 13 000 ORFs bei *D. melanogaster* (Adams et al., 2000).

Die meisten bekannten Proteine müssen direkt mit anderen Proteinen interagieren, um ihre biologische Funktion zu erfüllen. Zur Aufklärung von Protein/Protein-Interaktionen werden verschiedene Techniken eingesetzt, u.a. Co-Immunopräzipitation, Gluthation-s-Transferase (GST) pull-down Experimente, phage display und das Hefe-Two-Hybrid-System. Das Hefe-Two-Hybrid-System wurde 1989 von Fields und Song (1989) zum erstenmal als genetisches System zur Detektion und Analyse von Protein/Protein Interaktionen vorgestellt.

Das Two-Hybrid-Prinzip

Dieses System macht sich den modularen Aufbau von eukaryotischen Transkriptionsfaktoren zu Nutze und hat den Vorteil, dass die Interaktionen in der lebenden Hefezelle („*in levuro*“, Walhout et al., 2000) untersucht werden.

Ein bekanntes Protein X, für das Interaktoren gefunden werden sollen, wird mit der DNA-bindenden Domäne (BD) eines Transkriptionsfaktors fusioniert, wie zum Beispiel Gal4 oder LexA. Dieses Protein wird als Köder (engl. bait) bezeichnet. Das zweite Hybridprotein besteht aus einem Protein Y und einer transkriptionsaktivierenden Domäne (AD) und wird als Beute (engl. prey) bezeichnet. Eine physische Interaktion zwischen den beiden Hybridproteinen führt zur Rekonstruktion eines funktionellen Transkriptionsfaktors, der die Expression von Reportergenen aktivieren kann.

In den letzten zehn Jahren wurde das Hefe-Two-Hybrid-System von verschiedenen Gruppen weiterentwickelt, um damit verschiedene Fragestellungen zu bearbeiten (Reviews siehe van Criekinge und Beyaert, 1999, Fashena et al., 2000). Im Rahmen dieser Arbeit wurde das klassische LexA-Hefe-Two-Hybrid-System zur Aufklärung von Protein/Protein-Interaktionen eingesetzt (Gyuris et al., 1993) und zur Bearbeitung einer speziellen Fragestellung - der Entwicklung eines HTS-Screens (siehe unten) - modifiziert.

Das Problem der falschen Positiven und falschen Negativen

Ein Nachteil des Two-Hybrid-Systems ist, dass regelmäßig falsch-positive Interaktoren gefunden werden, also solche, die in vivo keine biologische Bedeutung haben können, da die beteiligten Proteine in verschiedenen subzellulären Strukturen auftreten oder ein zeitlich verschobenes Expressionsmuster besitzen. Einige Proteine werden regelmäßig mit verschiedenen Kødern detektiert und werden als die „üblichen falsch-Positiven“ bezeichnet (eine Liste solcher Proteine ist unter <http://www.fccc.edu/research/labs/golemis/Table1.html> zugänglich).

Im Gegensatz dazu konnten einige bekannte Protein/Protein-Interaktionen im Two-Hybrid-System nicht nachgewiesen werden. Diese Tatsache kann durch verschiedene Eigenschaften der im Two-Hybrid-System eingesetzten Hybridproteine erklärt werden:

- Eines der Hybridproteine gelangt nicht in den Zellkern der Hefe.
- Eines der Hybridproteine funktioniert nicht im Kontext mit einer DB oder AD.
- Die Interaktion zwischen zwei Proteinen kann von einer post-translationalen Modifikation abhängen, die in der Hefe nicht erfolgt.
- Die Interaktion zwischen zwei Partnern ist nur möglich, wenn einer der beiden trunkiert ist.

Walhout et al. (2000) schätzen den Prozentsatz der falsch-Negativen bei einem von ihnen durchgeführten Two-Hybrid-Interaktions-Massenscreening von *C. elegans*-Proteinen auf ca. 45%.

Trotz dieser Nachteile wurde das Hefe-Two-Hybrid-System in den letzten Jahren als eines der wichtigsten Werkzeuge zur Untersuchung von Protein/Protein-Interaktionen etabliert und weiterentwickelt (Review zur Evolution von Two-Hybrid-Screening Methoden, Fashena et al., 2000, Crilkinge und Bayaert, 1999).

Kartierung von Protein-Interaktionsdomänen

Holt et al. (1994) beschrieben als erste die Möglichkeit mit dem Hefe-Two-Hybrid-System Interaktionsdomänen von Proteinen zu kartieren. Ausgehend von einer in diesem System nachgewiesenen Protein/Protein-Interaktion werden dabei Deletionsfragmente des einen Partners konstruiert und anschließend auf ihre Fähigkeit zur Interaktion mit dem Partner getestet. Diese Methode wurde in der vorgelegten Arbeit für die Kartierung der interagierenden Domänen des Arylphorins und des Arylphorinrezeptors von *C. vicina* verwendet.

1.7. Hochdurchsatz Sortiersuche (HTS) - Konzept, Chancen, Risiken

Aufgrund des starken globalen Wettbewerbs sind sowohl Pharmaunternehmen, als auch Forschungslaboratorien gezwungen, kosten- und zeitsparende Strategien bei der Wirkstoffentwicklung im pharmazeutischen und agrochemischen Bereich zu entwickeln. Die Unternehmensberater von McKinsey&Co schätzen, dass ca. 45% der totalen Kosten bei der Wirkstoffentdeckung und -entwicklung auf die Suche nach Wirkstoffen entfallen. Die Berater prophezeien, dass mit neuen Technologien zwischen 70 und 90% der Entwicklungszeiten und -kosten eingespart werden können (Raziv, 1998).

Dies war der Auslöser für die Einführung der Automation in den Wirkstoff-Entwicklungsprozess (Berg et al., 2000). Die Miniaturisierung von komplizierten Suchverfahren auf das Format von Mikrotiterplatten kombiniert mit dem Einsatz von Robotern wird dabei als aussichtsreiches Werkzeug gesehen, um kostengünstige Wirkstoffsuchen durchzuführen (Wedlin, 1999, Kolb und Neumann, 1997).

Was ist HTS?

Als „high throughput screening“ (HTS, ≈Hochdurchsatz-Sortiersuche) werden Verfahren zusammengefaßt, bei denen zwischen 10 000 und 100 000 Substanzen pro Tag in einem automatisierten Experiment auf ihre biologische Wirksamkeit getestet werden können. Bei einer Kapazität von > 10 000 Substanzen/Tag spricht man von ultra HTS (Hill, 1998). Ziel des HTS ist die Identifizierung von biologisch aktiven „Leitstrukturen“ (leads), deren Wirksamkeit anschließend durch chemische Modifikationen gesteigert werden soll.

Wie werden die Wirkstoffkandidaten erzeugt?

Mit der Miniaturisierung und Automatisierung von biologischen Untersuchungen Anfang der 80er Jahre, konnten Wirkstoffkandidaten sehr viel schneller ausgewertet werden, als sie mit traditionellen Methoden der experimentellen Chemie produziert werden konnten (Ridley et al., 1998). Diese Entwicklung trug unter anderem zur Weiterentwicklung im Bereich der kombinatorischen Chemie bei, womit es möglich wurde, simultan Hunderttausende von Wirkstoffkandidaten zu erzeugen (Wentworth und Janda, 1998, Matthews, 1997), was die oben geschilderten Verhältnisse wieder umkehrte. Dazu kommen wachsende Substanzbibliotheken mit Naturproduktextrakten.

Miniaturisierung

Die oben erwähnte Miniaturisierung der experimentellen Ansätze wurde durch die Entwicklung der Mikrotiterplatten und der entsprechenden Geräte zum Bearbeiten und Messen ermöglicht. Für die Wirkstoffsynthese und -lagerung kommen in der Regel Polypropylen-Platten zum Einsatz, während diverse Varianten von Polystyrol-Platten für die Screening-Experimente eingesetzt werden (Nakayama, 1998). Während noch 1998 die 96er Platte (8 x 12 Näpfe) das vorherrschende Plattenformat war, hat sich im Laufe der letzten Jahre, parallel zur Entwicklung passender Instrumente, die 384er Platte (12 x 32 Näpfe, 200 µl Volumen pro Napf) als Standard durchgesetzt (Gutsmann, mündliche Mitteilung). Für das Jahr 2010 wird die 1536er Platte als Standardformat für HTS Experimente vorhergesagt (Pope und Hertzberg, 1999). Das im Rahmen dieser Arbeit entwickelte HTS Experiment wurde für 384er Platten entworfen.

HTS-Assay Entwicklung

Die Entwicklung eines HTS-Experiments besteht aus dem Entwurf des grundlegenden experimentellen Aufbaus und einer anschließenden Optimierung der Bedingungen, um den problemlosen Übergang von der Entwicklungsphase zu einem großen Routine-Screening zu gewährleisten. Dabei müssen üblicherweise bestimmte Kriterien erfüllt werden (Robustheit, Zuverlässigkeit, Reproduzierbarkeit), bevor ein HTS-Experiment gestartet wird (Ridley et al., 1998).

Risiken?

In den letzten zehn Jahren haben alle großen Pharma- und Agrochemieunternehmen mit erheblichem finanziellen Aufwand HTS-Abteilungen eingerichtet und betrieben. Ob diese Anstrengungen tatsächlich zur Entdeckung von vielen neuartigen Leitsubstanzen und zur Entwicklung von neuen Wirkstoffen geführt hat, kann zur Zeit noch nicht beurteilt werden, da die Entwicklungszeit von Pestiziden bzw. Medikamenten in der Regel über 20 Jahre dauert und vorher mit keinen Veröffentlichungen zu rechnen ist. Die Zukunft wird zeigen, ob sich die Investitionen gelohnt haben.

1.8. Aufgabenstellung und Voraussetzungen dieser Arbeit

Ziel der vorgelegten Arbeit war Grundlagen für die Identifizierung von Substanzen zu schaffen, die zur Kontrolle von Schadinsekten verwendet werden können und einen neuartigen Wirkungsmechanismus besitzen.

- Im ersten Projekt sollte ein allatotroper Faktor im Gehirn der Wachsmotte *Galleria mellonella* identifiziert und charakterisiert werden.
- Ziel des zweiten Teils dieser Arbeit war die möglichst genaue Charakterisierung der interagierenden Domänen des Hexamerinrezeptors der Schmeißfliege *Calliphora vicina* und seines natürlichen Liganden Arylphorin.

Aufbauend auf den Ergebnissen sollte ein Protokoll für eine "Hochdurchsatz Sortiersuche" (HTS - high throughput screening) entwickelt werden, um Substanzen zu identifizieren, die die Rezeptor/Liganden-Bindung inhibieren. Das Protokoll sollte für 384er Mikrotiterplatten entwickelt werden und den Test von mehreren tausend Wirkstoffen am Tag ermöglichen.

- Weitere Experimente ergaben sich durch Befunde, die im Verlauf der Arbeit selbst auftraten.

Entscheidende Vorarbeiten, welche die Voraussetzungen für die bearbeiteten Themengebiete geschaffen haben, wurden in der Arbeitsgruppe von Prof. Scheller im Lehrstuhl für Zell- und Entwicklungsbiologie in Würzburg durchgeführt.

- Die Herstellung von monoklonalen Antiseren gegen ein Allatotropin von *Galleria mellonella* (Bogus und Scheller, 1996) ermöglichte die Suche nach diesem Neuropeptid.
- Die Klonierung der cDNAs des Arylphorins und des Hexamerinrezeptors von *Calliphora vicina* (Naumann und Scheller, 1991, Burmester und Scheller, 1995) in derselben Arbeitsgruppe waren Voraussetzung für die durchgeführten Two-Hybrid-Experimente und die Entwicklung des HTS-Protokolls.
- Das Hefe-Two-Hybrid-System wurde im Rahmen meiner Diplomarbeit in dieser Arbeitsgruppe etabliert.

2. MATERIAL

2.1. Versuchstiere

- ***Calliphora vicina***
(blaue Fleischfliege, NCBI *Taxonomy ID*: 7373) Der verwendete Stamm wird seit mehreren Dekaden im Labor gehalten. Die Fliegenlarven wurden auf Rindfleisch bei 25°C und einer relativen Luftfeuchtigkeit von 65% gehalten (Burmester et al., 1995).
- ***Galleria mellonella***
(große Wachsmotte, NCBI *Taxonomy ID*: 7137) Der verwendete Stamm wird seit über 30 Jahren im Labor gehalten. Die Larven werden auf einem Spezialfutter bei 32°C gehalten (Sehnal et al, 1966).

2.2. Bakterien und Hefestämme

E. coli Wirtsstämme:

XL1-Blue (Stratagene, Heidelberg)

Genotyp: D(mcrA)183 D(mcrCB-hsdSMR-mrr)173 endA1 supE44 thi-1 recA1 gyrA96 relA1 lac [F'φproAB lacIqZDM15 Tn10 (Tetr)],

Verwendung: Transformation von Ligationsansätzen, Screening von Phagenbibliotheken.

XL10-Gold Kan^r (Stratagene, Heidelberg)

Genotyp: TetrΔ (mcrA)183 Δ(mcrCB-hsdSMR-mrr)173 endA1 supE44 thi-1 recA1 gyrA96 relA1 lac Hte [F' proAB lacIqZDM15 Tn10 (Tetr) Tn5 (Kan^r) Amy]a,

Verwendung: Transformation großer DNA-Vektoren, Transformation cDNA-Bibliotheken.

BM25.8 (Clontech, Heidelberg)

Genotyp: supE44, thi Δ(lac-proAB) [F' traD36, pro AB⁺, lacI^qZ ΔM15]λimm434 (kan^R)P1 (cam^R) hsdR (r_{k12}-m_{k12}-),

Verwendung: cre-lox-vermittelte in vivo Exzision von pTriplEx2 aus λTriplEx2.

KC8 (Clontech, Heidelberg)

Genotyp: hsdR, leuB600, trpC9830, pyrF::Tn5, hisB463, lacΔX74, strA, galU, K (kan^R),

Verwendung: „Rescueing“, von AD-Plasmiden („preys“) aus Hefezellen.

S. cerevisiae:

EGY48

Genotyp: MATa, ura3-52, his3-200, lys2-801, ade2-101, ade5, trp1-901, leu2-3, 112, tyr1-501, gal4-Δ 512, gal80-Δ538, ade5::hisG,

Verwendung: Hefestamm für Two-Hybrid-Experimente.

2.3. Plasmide

2.3.1. Plasmide für E.coli-Klonierungen

| | Selektion: | Quelle: |
|------------------------|-------------------|------------------------|
| pCRScript | Ampizillin | Stratagene, Heidelberg |
| pBluescript-SK+ | Ampizillin | Stratagene, Heidelberg |
| pTriplEx2 | Ampizillin | Clontech, Heidelberg |
| pEGFP-N2 | Ampizillin | Clontech, Heidelberg |
| pRFP | Ampizillin | Clontech, Heidelberg |

2.3.2. Two-Hybrid shuttle -Plasmide

| | Selektion in E.coli: | Selektion in Hefe: | Verwendung: | Quelle: |
|---------------------------------|---------------------------------|-------------------------------|--|--------------------|
| pEG202 [pLexA] | Ampizillin | Histidin | „Köder-Fusionsproteine“ (baits) | Origene, Rockville |
| pJG4-5 [pB42AD] | Ampizillin | Tryptophan | Vektor zur Herstellung von B42-cDNA Bibliotheken | Origene, Rockville |
| pSH18-34 [p8op-lacZ] | Ampizillin | Urazil | LacZ – Reporter Plasmid | Origene, Rockville |
| pJK101 | Ampizillin | Histidin | Kontrolle | Origene, Rockville |
| pSH17-4 | Ampizillin | Histidin | Kontrolle | Origene, Rockville |
| pRHF1 | Ampizillin | Histidin | Kontrolle | Origene, Rockville |
| pBAIT | Ampizillin | Histidin | Kontrolle | Origene, Rockville |
| pTARGET | Ampizillin | Tryptophan | Kontrolle | Origene, Rockville |

Die verwendeten Plasmide sind Teil des DupLEX-ATM Hefe-Two-Hybrid-Systems der Firma Origene, Rockville, in eckigen Klammern stehen die Synonyme der Firma Clontech, Heidelberg

2.3.3. Sonstige Plasmide

- Arylphorin cDNA in pBluescript SK+

Das Plasmid enthält die vollständige cDNA des Arylphorins von *Calliphora vicina* (Genbank: M76480) und wurde von U. Naumann in dieser Arbeitsgruppe hergestellt.

- Arylphorin Rezeptor cDNA in pBluescript SK+

Das Plasmid enthält die vollständige cDNA des Hexamerinrezeptorklons B11 von *Calliphora vicina* (Genbank: X79100) und wurde von T. Burmester in dieser Arbeitsgruppe hergestellt.

2.4. Enzyme

| Restriktionsenzyme: | | |
|---------------------|----------------------|--|
| Bam HI | 5`-G↓GATCC-3` | MBI FERMENTAS, St. Leon-Rot |
| Bgl II | 5`-A↓GATCT-3` | MBI FERMENTAS, St. Leon-Rot |
| Dra I | 5`- TTT↓AAA -3` | MBI FERMENTAS, St. Leon-Rot |
| EcoR I | 5`-G↓AATTC-3` | MBI FERMENTAS, St. Leon-Rot |
| EcoR V | 5`-GAT↓ATC-3` | MBI FERMENTAS, St. Leon-Rot |
| Pst I | 5`- CTGCA↓G -3` | MBI FERMENTAS, St. Leon-Rot |
| Hind III | 5`-A↓AGCTT-3` | MBI FERMENTAS, St. Leon-Rot |
| Nsi I | 5`- ATGCA↓T-3` | MBI FERMENTAS, St. Leon-Rot |
| Sal I | 5`-G↓TCGAC -3` | MBI FERMENTAS, St. Leon-Rot |
| Sfi I | 5`-GGCCNNNN↓NGGCC-3` | New England Biolabs, Frankfurt am Main |
| Xba I | 5`-T↓CTAGA-3` | MBI FERMENTAS, St. Leon-Rot |
| Xho I | 5`-C↓TCGAG-3` | MBI FERMENTAS, St. Leon-Rot |

Im Restriktionsverdau wurden die von der jeweiligen Firma mitgelieferten Puffer in den empfohlenen Konzentrationen eingesetzt.

Enzyme für die Molekularbiologie:

| | |
|--|---------------------------------------|
| Alkalische Phosphatase aus Shrimps (SAP) | Roche, Mannheim |
| Pfu DNA Polymerase (cloned) | Stratagene, Heidelberg |
| Pfu turbo DNA Polymerase | Stratagene, Heidelberg |
| Proteinase K | Sigma, Steinheim |
| Reverse Transkriptase (Superscript) | Clontech, Heidelberg |
| RNaseA | Sigma, Steinheim |
| T3-RNA-Polymerase | Roche, Mannheim Diagnostics, Mannheim |
| T4-DNA-Ligase | MBI FERMENTAS, St. Leon-Rot |
| T4-Polynukleotid Kinase | MBI FERMENTAS, St. Leon-Rot |
| T7-RNA-Polymerase | MBI FERMENTAS, St.Leon-Rot |
| T7-RNA-Polymerase | Roche, Mannheim Diagnostics, Mannheim |
| Taq DNA Polymerase | Qiagen, Hilden |

2.5. Molekulargewichtsmarker für DNA, RNA und Proteine

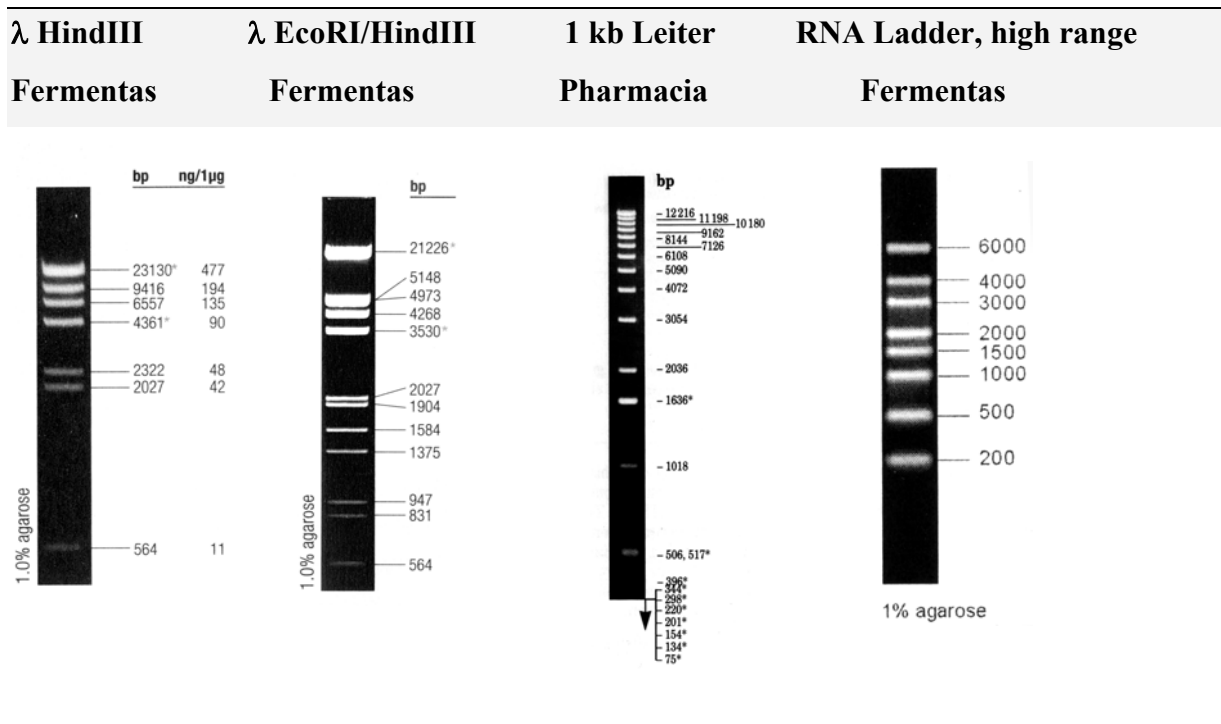


Abb. 7 DNA-Größenmarker

Protein Marker (SDS-PAGE Standards, Biorad, München):

| Protein | High-Marker | Low-Marker | Broad-Marker |
|---------------------------|-------------|------------|--------------|
| Myosin | 205,000 | | 208,000 |
| β -Galactosidase | 118,000 | | 115,000 |
| Phosphorylase B | | 107,000 | |
| BSA | 85,000 | 76,000 | 79,500 |
| Ovalbumin | 47,000 | 52,000 | 49,500 |
| Carbonic anhydrase | | 36,800 | 34,800 |
| Soybean trypsin inhibitor | | 27,200 | 28,300 |
| Lysozyme | | 19,000 | 20,400 |
| Aprotinin | | | 7,200 |

2.6. Antikörper und Antiseren

| Antikörper: | Verdünnung: | Quelle: |
|--|---|---|
| a-ABP96-IgG, polyklonal, Kaninchen | 1 : 10 000 | Dr. Thorsten Burmester, (Burmester und Scheller, 1997) |
| a-Arylphorin-IgG, polyklonal, Kaninchen | 1 : 5 000 | Dr. Ulrike Naumann, (Naumann und Scheller, 1991) |
| HA-Sonde, IgG, polyklonal, Kaninchen | 1 : 1 000 | Santa Cruz Biotechnology, Inc, Heidelberg |
| anti-Kaninchen-IgG, Ziege, konjugiert mit alkalischer Phosphatase | 1 : 10 000 | Promega, Mannheim |
| anti-LexA | 1 : 10 000 | Santa Cruz Biotechnology, Inc, Heidelberg |
| anti-Dig-AP | 1 : 5 000 (Northern blot) 1 : 500 (in situ-Hyb.) | Roche, Mannheim |
| anti-Corazonin (rabbit) | 1 : 2 000 | Dr. Jan Veenstra, (Veenstra et al., 1998) |
| anti rabbit-Cy2 | 1 : 50 | Rockland/Gilbertsville |

2.7. Kits (Reagenziensätze)

| Name: | Verwendung: | Quelle: |
|--|---|---------------------------------------|
| BigDye-Terminator-Cycle Sequencing Ready Reaction Kit | Sequenzierungen | Perkin Elmer, Rodgau- Jügesheim |
| DIG-RNA-Labeling Kit (SP6/T7) | Herstellung Digoxigenin markierter RNA Sonden | Roche, Mannheim |
| Gigapack® III Gold packaging extract | Verpackungsreaktion für cDNA Bibliotheken | Stratagene, Heidelberg |
| QIAfilter Plasmid Maxi Kit | Plasmid DNA Maxipräp | Qiagen, Hilden |
| QIAprep Spin Miniprep Kit | Plasmid DNA Minipräp | Qiagen, Hilden |
| QIAquick Gel Extraction Kit | Reinigung von DNA Fragmenten | Qiagen, Hilden |
| SMART™ cDNA Library Construction Kit | Konstruktion von cDNA Bibliotheken | Clontech, Heidelberg |

2.8. Nukleinsäuren und Nukleotide

| | |
|--------------------------|---------------------------------------|
| dNTP-Mix 10 mM | MBI FERMENTAS-Fermentas, St. Leon-Rot |
| Lachsspermien DNA | Sigma, Steinheim |
| Oligonukleotide (Primer) | Interactiva, Ulm |

2.9. Chemikalien

| | |
|--|-----------------------|
| Agar Agar | Carl Roth, Karlsruhe |
| Agarose (Peq Gold Universal Agarose) | Peqlab, Erlangen |
| Albumin aus Rinderserum (BSA Fraktion V) | Carl Roth, Karlsruhe |
| Ammoniumacetat | Carl Roth, Karlsruhe |
| Ammoniumchlorid | Merck, Darmstadt |
| Ammoniumsulfat | Carl Roth, Karlsruhe |
| Ampizillin Natriumsalz | Hartenstein, Würzburg |
| BCIP | Carl Roth, Karlsruhe |
| Bromphenolblau | Sigma, Steinheim |
| Calciumchlorid | Merck, Darmstadt |
| Chloroform | Carl Roth, Karlsruhe |
| CHAPS | Carl Roth, Karlsruhe |
| Coomassie Brilliantblau G250 | Carl Roth, Karlsruhe |
| DEPC | Carl Roth, Karlsruhe |
| DMF (Dimethylformamid) | Carl Roth, Karlsruhe |
| DTT (Dithiotreitol) | Carl Roth, Karlsruhe |
| EDTA (Ethylendiamintetraessigsäure) | Carl Roth, Karlsruhe |
| Essigsäure | Carl Roth, Karlsruhe |
| Ethidiumbromid | Sigma, Steinheim |
| Formaldehyd (37% p.a.) | Carl Roth, Karlsruhe |
| Formamid | Carl Roth, Karlsruhe |
| D(+)-Galaktose | Sigma, Steinheim |
| Gelatine | Carl Roth, Karlsruhe |
| D(+)-Glukose | Carl Roth, Karlsruhe |
| Glycerin p.a. | Carl Roth, Karlsruhe |
| Harnstoff | Carl Roth, Karlsruhe |
| Hefeextrakt (Bacto Yeast Extrakt) | Difco, Augsburg |
| Hefe-Stickstoffbasis ohne Aminosäuren (Yeast nitrogen base w/o Amino Acids) | Difco, Augsburg |
| Hefe-Stickstoffbasis ohne Aminosäuren, ohne Ammoniumsalze (Yeast nitrogen base w/o Amino Acids w/o Ammonium Salts) | Difco, Augsburg |

| | |
|----------------------------|----------------------|
| Hepes | Carl Roth, Karlsruhe |
| IPTG | Carl Roth, Karlsruhe |
| Isopropylalkohol | Carl Roth, Karlsruhe |
| Isopropanol | Carl Roth, Karlsruhe |
| Kaliumchlorid | Carl Roth, Karlsruhe |
| Kaliumdihydrogenphosphat | Carl Roth, Karlsruhe |
| Kaliumhydrogenphosphat | Carl Roth, Karlsruhe |
| Kaliumsulfat | Carl Roth, Karlsruhe |
| Kaliumchlorid | Carl Roth, Karlsruhe |
| Maleinsäure | Carl Roth, Karlsruhe |
| Magnesiumchlorid | Carl Roth, Karlsruhe |
| Magnesiumsulfat | Serva, Heidelberg |
| β -Mercaptoethanol | Carl Roth, Karlsruhe |
| Methanol | Carl Roth, Karlsruhe |
| N,N'-Methylen-Bisacrylamid | Carl Roth, Karlsruhe |
| Natriumacetat | Carl Roth, Karlsruhe |
| Natriumcarbonat | Carl Roth, Karlsruhe |
| Natriumchlorid | Carl Roth, Karlsruhe |
| Natronlauge Plätzchen | Carl Roth, Karlsruhe |
| tri-Natriumcitrat-Dihydrat | Carl Roth, Karlsruhe |
| Natriumcitrat | Carl Roth, Karlsruhe |
| Natriumdodecylsulfat | Carl Roth, Karlsruhe |
| Natriumhydrogencarbonat | Carl Roth, Karlsruhe |
| Natriumhydrogenphosphat | Carl Roth, Karlsruhe |
| Natriumhydroxid | Carl Roth, Karlsruhe |
| Natriumthiosulfat | Carl Roth, Karlsruhe |
| NBT | Carl Roth, Karlsruhe |
| N-Lauroylsarkosin | Carl Roth, Karlsruhe |
| PFA (Para-Formaldehyd) | Carl Roth, Karlsruhe |
| Phenol | Carl Roth, Karlsruhe |
| ortho-Phosphorsäure | Carl Roth, Karlsruhe |
| PMSF | Sigma, Steinheim |
| Polyethylenglycol 3350 | Carl Roth, Karlsruhe |

| | |
|--|----------------------|
| D(+)-Raffinose | Difco, Augsburg |
| D(+) Saccharose | Carl Roth, Karlsruhe |
| Salzsäure | Carl Roth, Karlsruhe |
| Sorbitol | Carl Roth, Karlsruhe |
| N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin | Carl Roth, Karlsruhe |
| Tri-Natriumcitrat | Carl Roth, Karlsruhe |
| Tris-(hydroxymethyl)-amino-methan (TRIS) | Carl Roth, Karlsruhe |
| Triton X-100 | Carl Roth, Karlsruhe |
| Trypton (Bacto-Trypton) | Difco, Augsburg |
| Xylencyanol FF | Carl Roth, Karlsruhe |
| X-Gal | Carl Roth, Karlsruhe |
| Roti Load® | Carl Roth, Karlsruhe |
| Saccharose | Carl Roth, Karlsruhe |
| SDS | Carl Roth, Karlsruhe |
| Tris-Cl | Carl Roth, Karlsruhe |
| Triton X-100 | Carl Roth, Karlsruhe |
| Tween-20 | Carl Roth, Karlsruhe |
| Xylencyanol | Sigma, Steinheim |

2.10. Medien zur Aufzucht von Bakterien, λ Phagen und Hefestämmen

2.10.1. Medien und Lösungen für die Bakterienkultur

Ampizillin - Stammlösung (50 mg/ml)

500 mg Ampizillin Na-Salz wurden in 10 ml H₂O gelöst, sterilfiltriert und bei -20°C gelagert (Endkonzentration im Medium: 50 - 100 µg / ml)

Glukose - Stammlösung (1M)

18,2 g Glukose wurden mit H₂O auf 100 ml aufgefüllt und gelöst. Die Lösung wurde sterilfiltriert und bei RT gelagert.

Kanamycin - Stammlösung (10 mg/ml)

100 mg Kanamycin wurden in 10 ml H₂O gelöst, sterilfiltriert und bei -20°C gelagert. (Endkonzentration im Medium: 30 µg / ml)

LB - Agarplatten

zu 1 l LB-Medium wurden 15 g Agar Agar zugegeben. Die Lösung wurde autoklaviert, auf ca. 70°C abgekühlt und in Petrischalen gegossen.

LB - Medium (Luria-Bertami Medium)

10 g Bakto-Trypton, 5 g Bakto-Hefe-Extrakt und 5 g NaCl wurden in 1 l H₂O, gelöst, auf pH 7,0- 7,5 eingestellt (mit NaOH) und autoklaviert.

M9 - Minimal Platten (Amp.)

Zur Herstellung von M9-Platten wurde zuerst eine 5x M9-Salzlösung hergestellt:

30 g Na₂HPO₄, 15 g KH₂PO₄, 5 g NH₄Cl, 2,5 g NaCl, 15 mg CaCl₂ wurden in 1 l H₂O gelöst und autoklaviert. Für M9-Selektionsplatten wurden 200 ml 5x M9-Salzlösung, 10 g Agar mit H₂O bidest auf 968 ml aufgefüllt und autoklaviert. Anschliessend wurden 20 ml einer 20%igen Glukoselösung, 1 ml Ampizillin-Stammlösung, 1 ml Thiamine-HCl Stammlösung, 10 ml 100x Urazil Lösung, 10 ml Histidin Lösung und 10 ml Leucin Lösung zugegeben. Die Lösung wurde in Petrischalen gegossen.

SOB - Medium

20 g Bakto-Trypton, 5 g Bakto-Hefe-Extrakt und 0,5 g NaCl wurden in 950 ml deionisiertem Wasser gelöst. Es wurden 10 ml einer 250 mM KCl-Stammlösung zugegeben (1,86 g KCl in 100 ml deionisiertem Wasser) und der pH-Wert mit 5 N NaOH auf 7,0 eingestellt. Das Volumen wurde auf 1 l aufgefüllt. Die Lösung wurde durch autoklavieren sterilisiert.

SOC - Medium

SOC-Medium ist identisch mit SOB-Medium, enthält aber 20 mM Glukose. Nach dem Autoklavieren wurde das SOB-Medium auf ca. 60°C abgekühlt. Anschliessend wurden 10 ml einer 1 M Glukoselösung zugegeben. Die SOC-Lösung wurde durch einen 0,22 µm Filter sterilfiltriert und in 15 ml Kulturröhrchen bei -20°C gelagert.

Tetrazyklin - Stammlösung (5 mg/ml)

50 mg Tetrazyclin wurden in 10 ml **Ethanol** gelöst und bei -20°C gelagert (Endkonzentration im Medium: 50 mg /ml)

Thiamin - HCl Stammlösung (1 M)

33,7 g Thiamin wurden in 100 ml H₂O gelöst, sterilfiltriert und bei -20°C gelagert.

X-Gal - Platten

Für X-Gal Platten (φ 9 cm) wurden 40 ml einer X-Gal Stammlösung (20 mg/ml in DMF) und 4 ml einer IPTG-Stammlösung (200 mg/ml in H₂O) mit einem Drigalski-Spatel auf der Oberfläche der Platten verteilt. Die Platten wurden ca. 4 h bei 37°C getrocknet.

2.10.2. Medien und Lösungen zur Zucht von λ Phagen

MgSO₄-Lösung (1 M)

Für eine 1 M Stammlösung wurden 24,65 g MgSO₄•7H₂O in 100 ml H₂O gelöst und sterilfiltriert.

Maltose-Stammlösung (20%)

20 g Maltose wurden in 80 ml H₂O gelöst und sterilfiltriert.

LB/MgSO₄ - Agar-Platten

Zu 1 l LB Medium wurden 15 g Agar zugegeben. Die Lösung wurde autoklaviert, anschließend wurden 10 ml einer 1 M MgSO₄ Lösung zugefügt und die Lösung in sterile Petrischalen gegossen.

LB/MgSO₄ - Medium

Zu 1 l LB Medium wurden 10 ml einer 1 M MgSO₄ Lösung nach dem Autoklavieren zugegeben.

LB/MgSO₄/Maltose - Medium

Zu 1 l LB Medium wurden nach dem Autoklavieren 10 ml einer 1M MgSO₄ Lösung und 10 ml einer 20% Maltose Stammlösung zugegeben.

LB/MgSO₄ - Topagarose

Zu 100 ml LB/MgSO₄ Medium (siehe oben) wurden 0,7 g Agarose zugegeben. Die Lösung wurde aufgekocht und sofort verwendet. Topagarose wurde immer frisch angesetzt.

SM-Puffer (λ Verdünnungspuffer)

0,1 M NaCl, 10 mM MgSO₄, 35 mM Tris-Cl, pH 7,5, 0,01% Gelatine.

2.10.3. Hefemedien und Lösungen

"Dropout"- Pulver

| Metabolit | Menge im "dropout" Pulver (g) | Endkonzentration im Medium ($\mu\text{g} / \text{ml}$) |
|-----------------|----------------------------------|---|
| Adenin | 2,5 | 40 |
| L-Arginin | 1,2 | 20 |
| L-Asparagin | 6,0 | 100 |
| L-Glutaminsäure | 6,0 | 100 |
| L-Isoleuzin | 1,8 | 20 |
| L- Lysin-HCl | 1,8 | 30 |
| L-Methionin | 1,2 | 20 |
| L-Phenylalanin | 3,0 | 50 |
| L-Serin | 22,5 | 375 |
| L-Threonin | 12,0 | 200 |
| L-Thyrosin | 1,8 | 30 |
| L-Valin | 9,0 | 150 |

CM - Hefe Selektionsmedium (complete minimal medium)

Für 1 l Flüssigmedium wurden 1,3 g Dropout Pulver, 1,7 g Hefe Stickstoff Basis (ohne Aminosäuren/Ammoniumsulfat), 5 g Ammoniumsulfat, 20 g Glukose (bzw. 20 g Galaktose und 10 g Raffinose) und je 10 ml der gewünschten Selektionsmetabolitlösung (100x) mit H₂O auf 100 ml aufgefüllt und gelöst. Die Lösung wurde durch einen Sterilfilter in 900 ml heißes H₂O hineinfltriert.

Für Platten wurden 20 g Agar und ein Natronlaugeplätzchen in 900 ml H₂O aufgeköcht und die Nährstofflösung durch einen Sterilfilter hinzugefügt. Anschließend wurde die Lösung in Petrischalen gegossen.

Bei der Benennung der Medien wird zuerst die Kohlenstoffquelle angegeben, gefolgt von der Art des Mediums und den Abkürzungen der Selektionsmetabolite, die diesem Medium fehlen. Ein Medium, das z.B. Galaktose und Raffinose als Kohlenstoffquelle enthält und dem die Selektionsmetabolite Urazil, Histidin und Tryptophan fehlen (Leucin ist enthalten) wird folgendermaßen bezeichnet:

Gal/Raff/CM -Ura,-His,-Trp

CM- X-Gal Platten

Vor dem Gießen der Platten wurde zu einem Liter CM- Hefe Selektionsmedium 7 g Na_2HPO_4 , 3 g NaH_2PO_4 und 4 ml einer X-Gal Stammlösung (20 mg/ml in DMF) zugegeben. Anschliessend wurden die Platten gegossen.

Selektions Metabolitlösungen

| Metabolit | Menge in 100x Stammlösung (g / 50 ml) | Endkonzentration im Medium (μg /ml) |
|--------------|--|--|
| L-Histidin | 0,1 | 20 |
| L-Leucin | 0,3 | 60 |
| L-Tryptophan | 0,2 | 40 |
| Urazil | 0,1 | 20 |

YPD - Flüssigmedium

Für 1 l Medium wurden 20 g Bakto-Trypton und 10 g Bakto-Hefe-Extrakt in 900 ml H_2O , gelöst und autoklaviert. Anschließend wurden 100 ml einer 20%igen Glucoselösung zugegeben.

YPD - Platten

Zu 1 l heißem YPD-Medium wurden 20 g Agar und ein Natronlaugeplättchen zugegeben und die Lösung in Petrischalen gegossen.

2.11. Geräte und sonstige Materialien

| | | |
|--|--|---|
| Autoklav | | |
| Binokular | | Leitz |
| Brutschrank für Bakterien | | Kirsch |
| Brutschrank für Hefe | BE 400 | Memmert |
| Elektrophorese und Blotting System (Proteingele) | Mini-Protean II Electrophoresis Cell and Blotting Apparature | Biorad |
| Elektroporator | Easy... | Peqlab |
| Feinwaage | PC 4400 | Mettler |
| Feinwaage | AC 100 | Mettler |
| Fluoreszenz-Messgerät | Fluoroscant Ascent | Labsystems |
| Gefriertrockner | Freeze Dryer Modulyo | Edwards |
| Gelelektrophoresesystem | Mupid2 | COSMO BIO CO., LTD |
| Geltrockner | Drystar L | Hölzel |
| Heizblock | 2099-DA | Gebr.Liebsch |
| Hybridisierungssofen | Mini 10 | Hybaid |
| Inkubationsrundschtüttler | CERTOMAT® | H, B.Braun |
| Kippschtüttler | REAX 2 | Heidolph |
| Magnetrührer | IKA-COMBI FERMENTASMAG | RCO |
| Magnetrührer | M21 | GWL |
| Mikroskope | Confocale-Laser-Scanning-Microscope (CLSM), Typ TCS SP | Leica, München |
| Mikrowellengerät | | previleg |
| Netzgerät | 500 V/0,2 mA | Desaga |
| Netzgerät | 500/500 | L.Fischer |
| pH-Meter | pH 523 | WTW |
| Semidry-Blotter | | CTI |
| Sequenziergerät | ABI PRISM®310 | Perkin Elmer, Rodgau-Jügesheim |
| Spektralphotometer | Bio Photometer | Eppendorf |
| Thermocycler | Progene | Techne |
| UV-Crosslinker | UV-Stratalinker 1800 | Stratagene, Heidelberg |
| UV-Transilluminator mit Videokamerasystem | UV-Transilluminator Typ IL-350-M, VL Vilber Lourmat, 320 nm | Bachhofer Laboratoriumsgeräte, Reutlingen |
| | CF-8 Videokamera | Firma Kappa |
| | SSM-121 CE-Monitor | Firma Sony, Japan |
| | UP-860 CE Video Graphic Printer | Firma Sony, Japan |
| Vakuumzentrifuge | | |
| Vortexer | Genie | Hartenstein, Würzburg, Laborbedarf |
| Wasserbad, mini | WTH5 | Assistent |
| Wasserbad, maxi | 11/18 | Braun |
| Zentrifuge, Tisch | Mikroliter | Hettrich |
| Zentrifuge, Tisch (kühlbar) | RMC 14 | Sorval |
| Zentrifuge | RC-5B; Rotoren: SS34, HB4, HB6 | Sorval |
| 3 mm Filterpapier | | |
| Nylon-Rundfilter | | Whatman |
| Nitrocellulose Blotting Membrane | | Quiagen COSTAR |

3. METHODEN

3.1. Mikro- und molekularbiologische Methoden

3.1.1. Kultur von *E.coli*

Plattenkultur

Um einzelne Bakterienklone aus einer Suspension zu gewinnen, z.B. nach Elektroporation (3.1.3.) oder in vivo Exzision (3.1.19), wurde eine kleine Menge (100-200 µl) auf eine Platte aufgetropft und mit einem sterilen Drigalski Spatel sorgfältig auf der Platte verteilt. Der Drigalski Spatel wurde anschließend in eine Ethanollösung getaucht und kurz abgeflammt. Die Petrischalen wurden mit der Agarseite oben bei 37°C über Nacht inkubiert.

Flüssigkultur

Bakterien werden mit einer sterilen Impföse von einer Platte oder von der Oberfläche einer gefrorenen Glycerinkultur gekratzt. Die Öse wurde dann in ein Gefäß mit dem entsprechenden Kulturmedium getaucht. Die Bakterien wurden über Nacht bei 37°C auf einem Schüttler (200-250 rpm) inkubiert.

Bestimmung der Bakteriendichte einer Flüssigkultur durch Messen der optischen Dichte (OD)

Um die Bakteriendichte in einer Flüssigkeit zu bestimmen, mißt man die Extinktion bei einer Wellenlänge von 600 nm. Hierbei gilt, dass eine OD von 1, bei einer Schichtdicke von 1cm, 8×10^8 Zellen/ml entspricht. Als Nullwert wurde das verwendete Wachstumsmedium verwendet.

Glycerinkultur

Um Bakterienstämme über einen längeren Zeitraum hinweg zu lagern wurde 1 ml einer Flüssigkultur mit 500 µl sterilem 86%igem Glycerin gemischt und bei -70°C eingefroren. Solche Glycerinkulturen sind mehrere Jahre lang haltbar.

3.1.2. Herstellung von elektrokompetenten *E.coli*-Zellen

Zur Herstellung von elektrokompetenten Zellen wurde von einer Platte eine 10-ml-Übernachtskultur angeimpft. Am nächsten Morgen wurden 4 ml dieser Kultur mit 200 ml vorgewärmtem LB-Medium verdünnt und bei 37°C für ca. 3 h geschüttelt. Wenn die Kultur eine OD₆₀₀ von 0,6 erreicht hatte wurde sie in Eis abgekühlt und in vier vorgekühlte 50 ml Kulturröhrchen überführt. Die Bakterien wurden bei 3000 rpm für 5 min abzentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet in je 25 ml eisgekühltem sterilem Wasser durch heftiges Schütteln resuspendiert. Der Inhalt von zwei Röhrchen wurde vereinigt und wie oben abzentrifugiert. Die beiden Pellets wurden erneut mit 25 ml eiskaltem Wasser resuspendiert, vereinigt und erneut abzentrifugiert. Der Überstand wurde sorgfältig entfernt und das Pellet in 400 µl Wasser aufgenommen. Das endgültige Volumen wurde durch Aufziehen in einer Pipette bestimmt und anschließend 10% Glycerin zugegeben. Die Zellen wurden in vorgekühlten Eppendorf Reaktionsgefäßen zu je 40 µl aliquotiert und bei -70°C gelagert.

3.1.3. Elektroporation von *E.coli*

Es wurde ein „Easyjet-Prima“-Elektroporator (Pepqlab) verwendet. Für *E.coli* Elektroporationen wurden 2-mm-Küvetten verwendet und ein 5-ms-Puls mit 2500 V.

Die Aliquots elektrokompetenter Zellen wurden auf Eis aufgetaut. 1 - 3 µl der zu transformierenden Plasmidlösung wurden zu den Zellen pipettiert, durch Umrühren gemischt und für ca. 1 min auf Eis inkubiert. Die Zellsuspension wurde in eine vorgekühlte 2 mm Küvette überführt. Die Küvette wurde sofort in den Elektroporator gesteckt und der elektrische Puls ausgelöst. Innerhalb der nächsten 30 s wurde 1 ml SOC-Medium (Raumtemperatur) zugegeben. Die Zellen wurden in einem 15 ml Röhrchen für 1 h bei 37°C geschüttelt und anschließend auf Platten mit dem entsprechenden Selektionsmedium ausplattiert.

3.1.4. Isolierung von Plasmid DNA aus *E.coli*

3.1.4.1. Plasmid Mini-Präparation (GTE-Methode)

Die GTE-Methode wurde für die Isolierung von kleineren Mengen Plasmid DNA verwendet. Pro Ansatz wurden ca. 1 µg Plasmid DNA gewonnen, die durch RNA verunreinigt war.

GTE-Puffer: 50 mM Glukose, 25 mM Tris-HCl (pH 8.0), 10 mM EDTA (pH 8.0)

Lysispuffer: 0,2 N NaOH, 1% SDS

Kaliumacetat-Puffer: 60 ml 5 M Kaliumacetat, 11,5 ml Eisessig, 28,5 ml H₂O

1,5 ml einer Übernachtskultur wurden in einem Eppendorf-Reaktionsgefäß abzentrifugiert (5 min, 3000 rpm, RT). Der Überstand wurde dekantiert und das Bakterienpellet in 100 µl GTE-Puffer durch vortexen resuspendiert. 200 µl Lysispuffer wurden zugegeben und das Gefäß mehrmals invertiert, bis die Lösung klar war. Anschließend wurden 150 µl Kaliumacetat-Puffer zugegeben und der Ansatz durch Schnippen gemischt. Es folgte ein Zentrifugationsschritt (5 min, 13 000 rpm, RT). Der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß dekantiert und das Pellet verworfen. Zum Überstand wurde 1 Volumen eiskaltes Ethanol (-20°C) gegeben und durch Invertieren gemischt. Der Ansatz wurde sofort zentrifugiert (5 min, 13 000 rpm, RT), der Überstand mit einer Pipette sorgfältig entfernt und das Pellet 5 min vakuumgetrocknet. Die Plasmid-DNA wurde in 30 µl H₂O gelöst.

3.1.4.2. Plasmid-Mini-Präparation (Methode Qiagen)

Die Qiagen-Methode für die Isolierung von Plasmid-DNA beruht auf dem Prinzip der alkalischen Lyse. In einem bestimmten hohen pH Bereich (pH 12-12,5) denaturiert lineare DNA, während zirkuläre kovalent geschlossene DNA in Lösung bleibt. Die DNA-Lösung wird erst einem alkalischen pH ausgesetzt und anschließend wieder neutralisiert, worauf die genomische DNA als unlösliches Netzwerk aus der Lösung ausfällt. Dieses Präzipitat kann nun zusammen mit Protein-SDS-Komplexen abzentrifugiert werden. RNA wird durch die Zugabe von RNase-A verdaut. Eine Qiagensäule ist eine Anionenaustauschersäule. Sie enthält großporige Silikagelkugeln (Porendurchmesser im Durchschnitt ca. 100 µm) umhüllt von hydrophilen Substanzen. Mit Hilfe geeigneter Puffer kann man die Plasmid-DNA zuerst an die Säule binden lassen und dann durch Waschen der Säule von Verunreinigungen trennen. Anschließend wird das Plasmid in sehr hohem Reinheitsgrad wieder eluiert.

Puffer P1, Puffer P2, Puffer N3, Puffer PB, Puffer PE, Puffer EB wurden vom Hersteller geliefert.

Zur Isolierung von Plasmid-DNA für sensible Anwendungen (Ligationen, Sequenzierungen u.s.w.) wurde der QIAprep-Spin-Mini-prep-Kit benutzt. Es wurden zwischen 3 und 10 ml einer Übernachtskultur bei 3000 rpm, 4°C abzentrifugiert, der Überstand dekantiert und das Pellet in 250 µl Puffer P1 durch Rühren und auf- und abpipettieren resuspendiert. Die Suspension wurde in 1,5-ml-Eppendorf Reaktionsgefäße überführt. Die Lyse der Bakterien erfolgte durch Zugabe von 250 µl Puffer P2. Die Reaktionsgefäße wurde mehrmals invertiert, wenn nötig kräftig geschüttelt, bis die Lösung klar war. Die Lysisreaktion soll nicht länger als 5 min bei RT inkubieren. Nun wurden 350 µl Puffer N3 zugegeben und die Gefäße kräftig geschüttelt, bis sich ein grobflockiger weißer Niederschlag gebildet hatte. Durch eine Zentrifugation in der Tischzentrifuge (10 min, 13 000 rpm, RT) wurde der Niederschlag pelletiert. Während der Zentrifugation wurden die Deckel des QIAvac-24-Vakuumadapters entfernt und QIAprep-Säulchen aufgesteckt. Der Überstand wurde in ein QIAprep-Säulchen gegossen und (durch Anschalten einer Wasserstrahlpumpe) ein Vakuum angelegt. Wenn der Überstand vollständig durch das Säulchen gezogen worden war, wurde die Pumpe abgeschaltet. Anschließend wurden nacheinander 500 µl Puffer PB und 750 µl Puffer PE durch das Säulchen gezogen. Die Säulchen wurden in Mikrozentrifugenröhrchen gesteckt und trocken zentrifugiert (1 min, 13000 rpm, RT). Anschließend wurden die Säulchen in sauberen 1,5-ml-Reaktionsgefäßen platziert und 50 µl Puffer EB zugegeben. Die Säulchen wurden 1 min stehengelassen und anschließend abzentrifugiert (1 min, 13 000 rpm, RT). Die Konzentration der Plasmid-DNA in den 50 µl Elutionspuffer betrug in der Regel zwischen 50 bis 300 ng/µl. Die Zusammensetzung der Puffer ist im Protokoll nicht angegeben.

3.1.4.3. Plasmid-Maxi-Präparation (Methode Qiagen)

Die Maxi-Präparation dient der Isolierung von präparativen Mengen Plasmid-DNA z.B. für Two-Hybrid-Bibliotheken. Sie erfolgt nach demselben Prinzip und mit denselben Reagenzien wie die Qiagen-Mini-Präparation. Es wurde der Qiagen-Plasmid-Maxi-Kit verwendet.

3.1.5. DNA-Konzentrationsbestimmung

Photometrische Konzentrationsbestimmung

Nukleinsäuren absorbieren UV-Licht der Wellenlänge 260 nm. Die Konzentration von Nukleinsäuren wurde durch die Messung der Extinktion bei 260 nm bestimmt. Dabei entspricht eine OD_{260} von 1 ca. 50 μg DNA/ml Lösung bzw. ca. 33 μg RNA/ml. Verunreinigungen durch Proteine oder Lösungsmittel können durch die Messung der Extinktion bei 230 bzw. 280 nm abgeschätzt werden.

Zur photometrischen Konzentrationsbestimmung wurde ein Aliquot der DNA-Lösung mit H_2O verdünnt. Die Verdünnung richtet sich nach der erwarteten Nukleinsäurekonzentration. Anschließend wurde die optische Dichte (OD) bei 260 und 280 nm photometrisch bestimmt. Der Quotient OD_{260}/OD_{280} sollte bei gereinigter DNA (und RNA) größer als 1,8 sein.

DNA-Konzentrationsbestimmung über ein Agarosegel

Diese Methode eignet sich besonders gut zur Konzentrationsbestimmung von DNA-Lösungen, die stark durch RNA verunreinigt sind.

Ein Aliquot DNA-Lösung wurde auf ein 1%iges Agarosegel (mit Ethidiumbromid) aufgetragen. Daneben wurde ein Aliquot einer DNA-Lösung bekannter Konzentration aufgetragen. Nach einer kurzen Gelelektrophorese wurde unter UV-Licht die DNA-Menge der Probe abgeschätzt.

3.1.6. DNA-Fällung

DNA wurde in einer 70%igen Ethanollösung in Gegenwart von Natriumionen aus einer wässrigen Lösung präzipitiert. Die Alkalisalze der DNA sind in 70%igem Ethanol praktisch unlöslich, da die geladenen Phosphat- und Phosphodiestergruppen nicht mehr ausreichend hydratisiert vorliegen. Die zugegebenen Salze verstärken diesen Effekt, da sie zusätzlich mit der DNA um Hydrathüllen konkurrieren.

Ethanol: 100%

Natriumacetat: 3M, pH 5,2

Die Menge der wässrigen DNA-Lösung wurde bestimmt und 2 Volumen Ethanol und 1/10 Volumen 3 M Natriumacetat (pH 5,2) zugegeben. Es folgte eine Inkubation für mindestens 30 min bei -70°C oder über Nacht bei -20°C . Anschließend wurde die gefällte DNA abzentrifugiert (30 min, 13 000 rpm, RT). Die pelletierte DNA wurde zweimal mit 70%igem Ethanol gewaschen und durch jeweils 5 min Zentrifugation (13 000 rpm, RT) pelletiert.

Die DNA wurde kurz (1-2 min) in der Lyophylle getrocknet und in einem geeigneten Volumen H_2O aufgenommen.

3.1.7. Reinigung von DNA durch Phenol/Chloroform-Extraktion

Um DNA nach Restriktionsverdauen oder Ligationen aufzureinigen und die Enzyme zu deaktivieren wurde eine Phenol/Chloroform-Extraktion durchgeführt.

Dabei wurde die DNA-Lösung mit 1 Vol. Phenol 5 min bei RT kräftig ausgeschüttelt und anschließend abzentrifugiert (5 min, 13 000 rpm, RT). Die obere, wässrige Phase, welche die DNA enthielt, wurde in ein frisches Reaktionsgefäß überführt und mit 1 Vol. Chloroform ausgeschüttelt. Es folgte eine Zentrifugation (1 min, 13 000 rpm, RT). Dieser Schritt wurde wiederholt, bis die Lösung nicht mehr nach Phenol roch. Anschließend wurde die DNA mit Ethanol präzipitiert (3.1.6).

3.1.8. Agarose-Gelelektrophorese

Laufpuffer für Mupid[®]-2-Gelelektrophoresesystem (TAE-Puffer):

4,8 g Tris, 0,74 g EDTA · 2Na, 1,14 ml Essigsäure mit H_2O auf 1 l auffüllen

Ethidiumbromidlösung: 10 mg/ml

6x Probenpuffer: 50% Glycerin, 0,25% Bromphenolblau, 0,25% Xylencyanol in TE

Herstellung von sechs 1%igen Gelen für das Mupid[®]-2-Gelelektrophoresesystem

1,2 g Agarose wurde mit 120 ml Laufpuffer auf einem Magnetrührer aufgeköcht. Die Lösung wurde auf 70°C abgekühlt und 3 μl Ethidiumbromid hinzugegeben. Anschließend wurde das heiße Gel in die Formen gegossen (große Gele: 25 ml, kleine Gele: 15 ml).

Die Kämme wurden eingesetzt und das Gel mindestens 40 min bei RT abgekühlt. Anschließend wurden die Kämme aus dem Gel gezogen und die Oberfläche mit Laufpuffer überschichtet. Agarosegele wurden so bis zu 1 Woche bei 4°C gelagert.

Elektrophorese

Das Gel wurde auf dem Schlitten in die mit Laufpuffer gefüllte Elektrophoresekammer überführt. Die Proben wurden mit 0,16 Vol 6x Laufpuffer versetzt und in die Taschen pipettiert. Die Auftrennung der Moleküle erfolgte bei wird bei 50 oder 100 V ca. 60 bzw. 20 min.

3.1.9. Isolierung von DNA aus Agarosegelstücken (Methode Qiagen)

Zur Isolierung von DNA-Fragmenten definierter Größe aus einer Mischung von Fragmenten wurden die Fragmente gelelektrophoretisch aufgetrennt und die gewünschte Bande unter UV-Licht mit einem sauberen Skalpell ausgeschnitten. Dabei wurde die UV-Exposition der DNA möglichst kurz gehalten. Die Isolierung von DNA aus Agarosegelen wurde mit dem QIAquick-Gel-Extraktions-Kit der Firma Qiagen durchgeführt.

| | |
|----------------|----------------------------|
| Schmelzpuffer | QG |
| Waschpuffer | PE |
| Elutionspuffer | EB (10 mM Tris-Cl, pH 8,5) |

Das ausgeschnittene Gelstück wurde in einem Eppendorf Reaktionsgefäß gewogen und 3 Vol Puffer QG zugegeben. Die Lösung wurde 10 min bei 50°C inkubiert und alle 2 min kurz gevortext. Wenn das Gelstück komplett in Lösung gegangen war wurde 1 Vol. Isopropanol zugegeben. Um die DNA zu binden wurde die Lösung in ein QIAquick Säulchen überführt, das auf den QIAvac24-Vakuuadapter gesteckt wurde. Durch Anlegen eines Vakuums wurde die Lösung durch das Säulchen gezogen. Es folgten zwei Waschschrte mit 500 µl QG (optional) und 750 µl PE. Anschließend wurde das Säulchen in ein Eppendorf Reaktionsgefäß gesteckt und trocken zentrifugiert (1 min, 13 000 rpm, RT). Das Säulchen wurde in ein frisches Reaktionsgefäß transferiert und bei 50°C für mehrere Minuten getrocknet. Zur Elution der DNA wurden 30 bis 50 µl Elutionspuffer EB (50°C) in die Mitte des Säulchens pipettiert. Das Säulchen wurde 1 min bei 50°C inkubiert und anschließend abzentrifugiert (1 min, 13 000 rpm, RT). Die Ausbeute lag bei ca. 50% der eingesetzten DNA.

3.1.10. DNA-Modifikationen

Verdau von DNA mit Restriktionsendonukleasen

Restriktionsendonukleasen sind eine Klasse von bakteriellen Enzymen, die beide Stränge eines DNA-Moleküls durch Hydrolyse der Phosphodiester-Bindungen spalten. Doppelsträngige DNA kann durch Restriktionsendonukleasen der Klasse II in spezifische Fragmente zerlegt werden. Die Nukleasen erkennen innerhalb der DNA spezifische Zielsequenzen, meist Palindrome einer Länge von 4 - 8 bp. Je nach Enzym erfolgt die Spaltung der DNA-Stränge auf gleicher Höhe. Dann entstehen „blunt-end“-Fragmente. Oder die Spaltung erfolgt um 2 - 6 bp versetzt, dann entstehen „sticky end“-Fragmente, wobei je nach Enzym 3'-Überhänge oder 5'-Überhänge zurückbleiben. Die Aktivität der Enzyme wird in Einheiten (U) angegeben, wobei eine Einheit der Enzymmenge entspricht, die bei optimalen Bedingungen (pH-Wert, Temperatur, Ionenstärke) 1 µg einer Vergleichs-DNA (meist genomische DNA des λ-Phagen) in einer Stunde spaltet.

Das Volumen der Enzymlösung im Restriktionsansatz sollte nicht höher als 10% liegen, da die Reaktion sonst durch das Glycerin, das in der Enzymlösung enthalten ist, inhibiert werden kann.

Die Puffer für die Restriktionsverdau werden von den Herstellern mitgeliefert. Bei Verdauen mit zwei verschiedenen Restriktionsenzymen muß die Aktivität der Enzyme in den jeweiligen Puffern überprüft werden. Doppelverdau wurden mit Y^{Tango} Puffer (Fermentas) durchgeführt. Die optimale Verdautemperatur liegt bei den meisten Restriktionsendonukleasen bei 37°C. Ausnahmen sind Sfi I (50°C) und Sma I (30°C).

Restriktionsenzymlösung

10x Restriktionspuffer

Die DNA-Lösung wurde mit 1/10 Volumen des entsprechenden 10fach-Restriktionspuffers gemischt. Die Reaktion wurde durch die Zugabe des Enzyms gestartet, der Verdau bei der optimalen Temperatur mindestens 1 h lang durchgeführt.

Die Reaktion wurde durch 5 min Erhitzen auf 68°C gestoppt.

Auffüllen zurückgesetzter 3'-Enden (blunting)

Zurückgesetzte 3'-Enden („sticky ends“), die bei einer Restriktionsverdau mit bestimmten Restriktionsenzymen (z.B. Xho I) entstehen können, können in einer Reaktion mit dem Klenow-Fragment der DNA-Polymerase I aufgefüllt und somit „geglättet“ („blunt end“) werden.

Klenow-Fragment (1 U/μl)

dNTP-Mix: je 2,5 mM (Endkonzentration: je 50 μM)

10xPuffer für Klenow-Enzym

Für einen 20 μl Reaktionsansatz wurden 0,2 bis 5 μg DNA-Fragment in 16,5 μl H₂O aufgenommen, mit 2 μl 10xKlenow-Reaktionspuffer und 0,5 μl dNTP-Mix (je 2,5 mMol) gemischt. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 1 μl Klenow-Fragment (1U/μl) gestartet und 10 min bei 37°C inkubiert und anschließend durch 10 min Erhitzen auf 75°C abgestoppt.

Abverdau überhängender 3'-Enden (blunting)

Überstehenden 3'-Enden entstehen bei Restriktionsverdauen mit bestimmten Restriktionsenzymen (z.B. Nsi I). Sie können in einer Reaktion mit einer DNA-Polymerase, die eine 3'-5'-Exonukleaseaktivität besitzt, abverdaut werden. Für diese Reaktion eignet sich die Pfu-DNA-Polymerase besonders gut, da sie eine hohe 3'-5'-Exonukleaseaktivität besitzt (höher als z.B. das Klenow-Fragment). Die Reaktion muß in Anwesenheit von dNTPs durchgeführt werden, da sich der Verdau ansonsten in den doppelsträngigen Bereich hinein fortsetzt.

Pfu-DNA-Polymerase (0,5 U/μl)

10x blunting Puffer

dNTP-Mix: je 2,5 mM (Endkonzentration: 1 μM)

Für einen 20 μl Ansatz wurde ca. 1 μg DNA-Fragment in 16,5 μl H₂O aufgenommen und mit 2 μl 10x blunting Puffer und 1 μl dNTP-Mix gemischt. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 0,5 μl Pfu-DNA-Polymerase gestartet und 30 min bei 72°C inkubiert.

Phosphorylierung von 5'-Enden mit Polynukleotidkinase (PNK)

Chemisch synthetisierte Oligodesoxynukleotide, die als Primer in der Polymerase-Kettenreaktion (PCR - s.u.) verwendet werden, haben am 5'-Ende eine OH-Gruppe. Nach erfolgreicher PCR müssen die entstandenen DNA-Fragmente vor einer Ligation in einen dephosphorylierten Vektor an den 5'-Enden phosphoryliert werden, ebenso müssen große PCR-Fragmente vor einer Autoligation (Zirkularisierung) phosphoryliert werden.

Dazu wurde die T4-Polynukleotidkinase (PNK) verwendet, ein Enzym, das die Übertragung des γ -Phosphat-Restes von ATP auf 5'-Hydroxy-Gruppen von DNA, RNA und Oligodesoxynukleotiden katalysiert. Das Enzym wird auch oft zur spezifischen Markierung von 5'-Enden eingesetzt.

Die T4-Polynukleotidkinase hat in den üblichen Restriktions- und Ligasepuffern eine zufriedenstellende Aktivität.

10x Restriktions- oder Ligasepuffer

ATP-Lösung: 10 mM

T4-Polynukleotidkinase: 10 U/ μ l

Ansatz der Phosphorylierungsreaktion:

45 μ l DNA-Lösung (ca. 1 μ g)

5 μ l 10x Puffer

2,5 μ l ATP-Lösung (10 mM)

1,0 μ l T4-Polynukleotidkinase (10 U/ μ l)

Die Reaktion wird durch Zugabe des Enzyms gestartet und läuft 30 min bei 37°C. Anschließend wird die PNK durch 10 min Erhitzen auf 75°C inaktiviert.

Dephosphorylierung von 5'-Enden mit alkalischer Phosphatase

Ein Vektor, der für eine Ligation eingesetzt wird, sollte möglichst wenig Autoligation zeigen. Daher wurde der Vektor nach erfolgter Restriktionshydrolyse mit alkalischer Phosphatase behandelt, ein Enzym, das im alkalischen Milieu (pH 9,5-10,5) die 5'-Phosphat-Gruppen von DNA, RNA und Ribo- bzw. Desoxyribonukleotiden abspaltet. Die innerhalb eines Nukleinsäuremoleküls gelegenen Phosphodiesterbindungen werden nicht angegriffen.

Ein so behandeltes DNA-Molekül kann durch die DNA-Ligase (s.u.) nicht zirkularisiert werden.

Für die 5'-Dephosphorylierungsreaktion wurde alkalische Shrimp Phosphatase (SAP) verwendet. Gegenüber alkalischer Phosphatase aus Kälberdarm (CAP) hat diese den Vorteil, dass sie durch 15 min Erhitzung auf 65°C vollständig inaktiviert werden kann; eine Reinigung des Ansatzes durch Phenolisieren entfällt.

10x Dephosphorylierungspuffer

Alkalische Shrimp Phosphatase (SAP, 1U/μl)

Für eine 20 μl-Reaktion wurden ca. 100 ng Vektor-DNA mit 2 μl 10x Dephosphorylierungspuffer gemischt und mit H₂O auf 19 μl aufgefüllt. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 1 μl SAP-Lösung (1U) gestartet und inkubiert 10 min bei 37°C (wenn „blunt-end“ Fragmente dephosphoryliert werden sollen, wurde die Reaktionszeit auf 60 min verlängert).

Durch Erhitzen auf 65°C für 15 min wurde die alkalische Phosphatase inaktiviert.

Ligation von DNA-Fragmenten

Für die in vitro-Rekombination von DNA-Fragmenten aus Restriktionsverdauen oder Polymerase-Kettenreaktionen werden diese in entsprechende Vektoren ligiert. Für die katalysierte Neubildung von Phosphodiesterbindungen wird das Enzym T4-DNA-Ligase eingesetzt, das ATP als Kofaktor benötigt.

Entscheidend für den Erfolg der Ligation ist das Verhältnis von Vektor zu Fragment. Für eine Ligation mit komplementären Einzelstrangüberhängen („sticky ends“) wurde ein Verhältnis von 1:3 bis 1:4 angestrebt. Bei der Ligation von „blunt-end“-DNA-Fragmenten wurde das Verhältnis auf 1:5 bis 1:8 erhöht.

10x Ligase Puffer

T4-DNA-Ligase: 5U/μl

ATP: 10 mM

T4-PNK-Lösung: 10 U/μl

Ligation von DNA-Fragmenten in Vektoren

Das zu ligierende Fragment wurde mit der Vektor-DNA gemischt und in einem möglichst geringen Volumen Ligase-Puffer aufgenommen (10 bis 20 μl), mit 1 bis 2 Weiss-Units T4-DNA-Ligase gemischt und über Nacht bei 16°C inkubiert. Alternativ wurde 2h bei RT inkubiert (nur bei „sticky end“-Ligationen).

Selbstligation

Bei der Selbstligation oder Zirkularisierung kommt es zu einem intramolekularen Ringschluß, bei dem sich die Enden eines linearen DNA-Moleküls zusammenlagern. Bei der Selbstligation eines PCR-Fragments, das keine 5'-Phosphatgruppen besitzt, kann die Phosphorylierung von 5'-Enden und die Ligrationsreaktion gleichzeitig erfolgen.

Ansatz für die Zirkularisierung eines PCR-Fragments:

- 20 μl DNA-Fragment (linear)
- 4 μl 10x Ligase Puffer
- 2 μl ATP 10 mM
- 2 μl PNK
- 1,5 μl T4-Ligase (7,5 Weiss-Units)
- ad H₂O auf 40 μl

Die Reaktion wurde über Nacht bei 16°C inkubiert.

3.1.11. Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die PCR wurde zur Amplifikation definierter DNA-Sequenzen durchgeführt. An den Enden des gewählten Bereichs liegen zwei Oligonukleotid-Primer („Oligos“) in gegensinniger Orientierung, die jeweils zu den Sequenzen eines Stranges der DNA komplementär sind und nach einer Denaturierung zu ssDNA an diese Stellen hybridisieren. Dieser kurze doppelsträngige Bereich dient nun als Startpunkt (Primer) für eine DNA-Polymerase, die den fehlenden Strang synthetisiert.

Die PCR besteht aus drei Schritten, die jeweils bei verschiedenen Temperaturen erfolgen:

1. Erzeugung einzelsträngiger DNA (melting, 96°C)
2. Anhybridisierung (annealing) des Primers (T abhängig vom Primer)
3. DNA-Synthese (72°C)

Diese Schritte werden 25 bis 35 mal wiederholt (Zyklen). Die Zahl der dsDNA-Moleküle definierter Länge wächst exponentiell nach 2^n (n = Anzahl der Zyklen). Um die Fehlerrate in den amplifizierten Fragmenten niedrig zu halten, wurde eine Polymerase mit „proofreading“-Aktivität eingesetzt (Pfu-DNA-Polymerase, Stratagene). Die Reaktionsbedingungen wurden den Ansprüchen der jeweiligen DNA-Polymerase entsprechend geändert.

3.1.11.1. Konzeption von Primern für die PCR

Bei der Konzeption eines Primerpaares für die Amplifikation ist es wichtig, dass beide dieselbe Schmelztemperatur besitzen. Folgende Formel wurde zur Abschätzung der Schmelztemperatur für Oligodesoxynukleotide von mehr als 10 Basen verwendet:

$$T_m = 67,5 + 0,34 \times (\%GC) - \frac{395}{\text{Basenzahl}_{(Oligo)}}$$

Der GC-Gehalt eines Primers sollte bei ca. 50% liegen.

3.1.11.2. Durchführung und Optimierung der PCR

Für eine PCR mit Pfu-DNA-Polymerase wurden in einer 100 μ l - Reaktion eingesetzt:

- 10 μ l Primer-Mix (Endkonz. 0,5 μ M je Primer)
- 2 μ l dNTP-Mix (Endkonzentration: 250 μ M jedes dNTP)
- x μ l dsDNA (Template, ca. 100 ng)
- 2 μ l Pfu-DNA-Polymerase (5 U)
- 10 μ l 10x Pfu-Reaktionspuffer
- y μ l H₂O auf 100 μ l

Die Reaktion wurde mit einem Denaturierungsschritt gestartet (1 min, 96°C). Es folgten 25 bis 40 Zyklen mit je drei Segmenten:

1. 45 s 96°C Denaturierung
2. 45 s Primer annealing; die optimale Temperatur liegt ca. 5°C unter der errechneten Schmelztemperatur des Primers
3. 2 min pro Kilobase des erwarteten Amplifikationsprodukts Elongation bei 72°C

Anschließend folgt ein 10-15 min Schritt bei 72°C, in dem alle Stränge fertigsynthetisiert werden.

Folgende Parameter sind wichtig für den Erfolg der PCR:

Mg⁺⁺-Konzentration, Annealing-Temperatur, Elongationszeit, Denaturierungstemperatur, Enzymkonzentration, Zahl der Amplifikationszyklen.

3.1.12. Klonierung von PCR-Fragmenten mit dem pCRScript-Cloning Kit

Pfu-DNA Polymerase erzeugt blunt end DNA Fragmente in der PCR. Um solche Fragmente effektiv zu klonieren wurde das pCRScript-Cloning Kit (Stratagene) verwendet. Dabei wird das PCR-Fragment in die Srf I Schnittstelle des pCRScript Amp SK(+) Vektors kloniert. Srf I schneidet die Palindromsequenz GCCC|GGGC. Diese Sequenz kommt in eukaryontischer cDNA statistisch äußerst selten vor. Zusammen mit der Ligationsreaktion wird ein Srf I Verdau durchgeführt, was für eine hohe Konzentration verdauter Vektor DNA sorgt und so die Autoligation des Vektors unterdrückt. Durch blau/weiß Selektion können echt positive erkannt werden.

Das Pfu-PCR-Produkt wurde über Gelextraktion (3.1.8.) aufgereinigt und die Konzentration über ein Agarosegel abgeschätzt.

Die Ligationsreaktion wurde in einem 1,5 ml Eppendorf Reaktionsgefäß durchgeführt.

- 1 µl pCRScript Amp SK(+) cloning Vektor (10 ng/µl)
- 1 µl PCR-Script 10x Reaktionspuffer
- 0,5 µl 10 mM rATP
- 2 - 5,5 µl blunt end PCR-Produkt
- 1 µl Srf I Restriktionsenzym (5 U/µl)
- 1 µl T4 DNA Ligase
- ad H₂O auf 10 µl

Der Ansatz wurde gemischt und 1 h bei RT inkubiert. Anschließend wurde die Reaktion durch 10 min erhitzen auf 65°C gestoppt.

Die DNA wurde bei -20°C bis zur Transformation (3.1.3.) gelagert.

3.1.13. Herstellung einer mit Digoxigenin-markierten RNA Sonde

Um DIG markierte RNA Sonden für Southern- und Northern-blots bzw. „whole mount“- in-situ-Hybridisierungen herzustellen wurde die klonierte DNA in vitro mit T7 oder T3 Polymerase in der Anwesenheit von DIG-UTP transkribiert. Dazu wurde das „DIG RNA Labeling Kit (SP6/T7)“ der Firma Roche verwendet.

Die Template-DNA wurde vor der Reaktion „downstream“ des klonierten Inserts durch ein Restriktionsenzym geschnitten. Nach dem Restriktionsverdau wurde die linearisierte DNA durch Phenol/Chloroform Extraktion (3.1.7.) gereinigt, mit Ethanol präzipitiert (3.1.6.) und die Konzentration bestimmt (3.1.5.).

4 M LiCl

0,2 M EDTA

Für eine Standard Markierungsreaktion wurden folgende Reagenzien in ein 1,5 ml Eppendorf Reaktionsgefäß pipetiert und gemischt:

1 µg linearisierte Template DNA

2 µl NTP labeling-mix (Gefäß 7)

2 µl Transkriptionspuffer (Gefäß 8)

1 µl RNase-Inhibitor (Gefäß 10)

ad H₂O auf 18 µl

2 µl RNA-Polymerase (T7, T3 oder SP6)

Die Reaktion wurde 2 h bei 37°C durchgeführt. Durch Zugabe von 2 µl 0,2 M EDTA wurde die Reaktion gestoppt. Die DNA wurde durch Zugabe von 1/10 Vol µl 4 M LiCl und 2 Vol 100%igem Ethanol bei -20°C (über Nacht) oder bei -70°C (mindestens 30 min) ausgefällt. Die DNA wurde abzentrifugiert (30 min, 13 000 rpm, RT) und mit 250 µl 70%igem Ethanol gewaschen. Das Pellet wurde kurz in der Lyophylle getrocknet und in 100 µl H₂O aufgenommen und bei -70°C gelagert.

3.1.14. Southern-Analyse genomischer DNA

Der Name der Technik leitet sich vom Namen des Erfinders, Edwin Southern, ab. Als Southern-blotting bezeichnet man ein Verfahren, bei dem DNA-Fragmente zuerst durch Gelelektrophorese (3.1.8) ihrer Größe nach aufgetrennt werden und anschließend aus der Gelmatrix des Trenngels auf eine geeignete Trägermembran aus Nitrozellulose oder Nylon übertragen und dort immobilisiert werden (z.B. durch UV-Quervernetzung). Einen derartigen Filter, der eine exakte Replik des ursprünglichen Gels ist nennt man DNA-Blot. Bei Verwendung von genomischer DNA spricht man von **genomischen Blots**.

Isolierung genomischer DNA

| | |
|---------------------|---|
| DNA-A Lösung | 10 mM Tris-Cl, pH 7,0, 60 mM NaCl, 10 mM EDTA, 150 mM Spermine, 15 mM Spermidine, 5% Saccharose |
| DNA-B Lösung | 0,2 M Tris-Cl, pH 9,0, 30 mM EDTA, 2% SDS, 5% Saccharose, 220 µg/ml Proteinase-K |
| PCIA-Lösung | |
| Proteinase-K-Lösung | 20 mg/ml in H ₂ O (Lagerung bei -20°C) |
| RNaseA-Lösung | |

Zur Isolierung von genomischer DNA aus *Galleria* Larven wurde eine ganze Larve in einem 1,5 ml Eppendorf Reaktionsgefäß in 250 µl DNA-A Lösung zerquetscht (nicht homogenisiert). Es wurden 250 µl DNA-B Lösung und 5 µl Proteinase-K-Lösung hinzugegeben und über Nacht bei 50°C inkubiert. Es wurden 500 µl PCIA-Lösung zugegeben, 5 min geschüttelt (nicht vortexen) und abzentrifugiert (5 min, 8000 rpm, RT). Die obere wässrige Phase wurde abgenommen und erneut mit 500 µl PCIA extrahiert. Die DNA wurde durch Zugabe von 1/10 Vol 3 M Natriumacetat und 2 Vol eiskaltem Ethanol präzipitiert. Die DNA wurde auf ein Glasstäbchen aufgerollt, getrocknet und in H₂O resuspendiert. RNaseA (600 µg) wurde zugegeben und 1 h bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde Proteinase-K-Lösung (Endkonzentration: 200 µg/µl) und SDS (Endkonzentration: 0,5% w/v) zugegeben und für weitere 4 h bei 50°C verdaut. Die Probe wurde dreimal mit PCIA-Lösung extrahiert. Zu der wässrigen Phase wurden 2 Vol eiskaltes Ethanol zugegeben und die präzipitierte DNA auf ein Glasstäbchen gewickelt. Die DNA wurde luftgetrocknet und in 100 µl H₂O gelöst. Aus einer *Galleria* Larve wurden so zwischen 50 und 200 µg genomische DNA isoliert.

Restriktionsverdau genomischer DNA

Für Southern-Blot-Experimente wurden jeweils 20 µg genomische DNA in einem 50 µl Restriktionsverdau geschnitten:

X µl DNA-Lösung (20 µg)
 5 µl Restriktionsenzym (50 U)
 5 µl 10x Restriktionspuffer
 ad H₂O auf 50 µl

Der Verdau wurde durch die Zugabe des Enzyms gestartet und bei entsprechender Temperatur über Nacht durchgeführt. Die Reaktion wurde durch 15 min Erhitzen auf 68°C abgestoppt. Die geschnittene DNA wurde mit Ethanol präzipitiert (3.1.6.) und in H₂O gelöst.

Gelelektrophorese von genomischer DNA und Transfer auf eine Nylonmembran („Southern blotting“)

| | |
|------------------------|---|
| Depurinisierungslösung | 0,25 N HCl |
| Denaturierungslösung | 0,5 M NaOH, 1,5 M NaCl |
| Neutralisierungslösung | 1 M Tris-Cl, pH 7,0, 1,5 M NaCl |
| 20x SSC | 3 M NaCl, 0,3 M Trinatriumcitrat-Dihydrat pH 7,0 |

Für Southern-Blot-Experimente wurden 100 ml Agarosegele verwendet (siehe 3.1.8.). Die Proben wurden mit 6x Probenpuffer versetzt und aufgetragen. Die Elektrophorese wurde im Kühlraum bei konstant 100 V 5 bis 8 h durchgeführt. Das Gel wurde anschließend fotografiert. Es folgten 10 min Inkubation in Depurinisierungslösung, 2x 20 min Inkubation in Denaturierungslösung, 2x 20 min in Neutralisierungslösung. Der Blot wurde so aufgebaut:

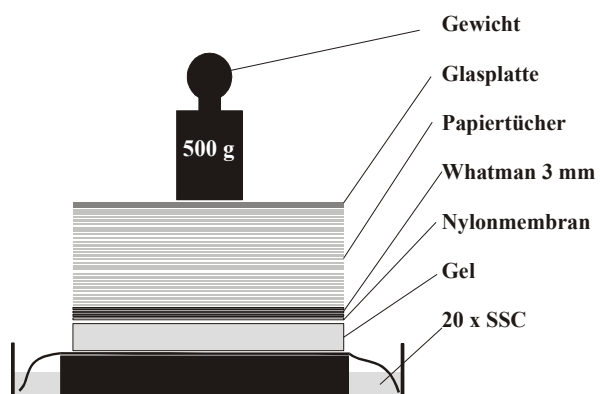


Abb. 8 Aufbau „Southern-Blot“

Der Transfer mit 20x SSC erfolgte über Nacht. Die Membran wurde anschließend kurz in 6x SSC Lösung geschüttelt. Die DNA wurde durch „UV-Crosslinking“ irreversibel am Filter fixiert. Der Blot wurde in Aluminiumfolie verpackt bei -20°C gelagert.

Hybridisierung mit Digoxigenin-markierter RNA-Sonde

ULTRAhyb-Hybridisierungslösung (Ambion)

Die ULTRAhyb-Hybridisierungslösung wurde bei 68°C verflüssigt. Der Filter wurde mit der DNA-Seite innen mit einem Kunststoffnetz zusammengerollt und in eine Hybridisierungsröhre überführt, pro cm² wurden 0,2 ml ULTRAhyb-Hybridisierungslösung zugegeben. Die Röhre wurde (nicht zu fest) verschlossen und für länger als 2 h in einem Hybridisierungsofen bei 50°C prähybridisiert. Die Sonde wurde anschließend direkt in die Prähybridisierungslösung pipettiert, die Hybridisierungsreaktion lief über Nacht bei 50°C.

Immunologische Detektion von Digoxigenin-markierter RNA

| | |
|-------------------------------------|---|
| Waschpuffer 1 | 2x SSC, 0,1% SDS |
| Waschpuffer 2 | 0,1x SSC, 0,1% SDS |
| DIG Puffer 1 | 0,1 M Maleinsäure, 0,15 M NaCl, pH 7,5 |
| DIG Puffer 2 | DIG Puffer 1 + 1% Blocking Reagenz (Roche) |
| DIG Puffer 3 | 100 mM Tris-Cl, pH 9,5, 100 mM NaCl, 50 mM MgCl ₂ |
| Anit-Digoxigenin-AP-Konjugat Lösung | 1:5000 in DIG Puffer 2 |
| Farbsubstratlösung | 10 ml DIG Puffer 3, 66 µl NBT (50 mg/ml in 70% DMF), 33 µl BCIP (50 mg/ml in DMF) |

Die Membran wurde 2x 5 min in Waschpuffer 1 bei RT auf einem Kippschüttler gewaschen. Es folgten zwei Waschschrte mit Waschpuffer 2, 15 min bei 50°C. Anschließend wurde die Membran kurz in DIG Puffer 1 geschwenkt und dann 30 min in DIG Puffer 2 bei RT geschüttelt. Das Anti-Digoxigenin-AP-Konjugat wurde kurz vor Gebrauch verdünnt. Die Membran wurde 30 min bei RT in der Antikörperlösung inkubiert. Es folgten 2 Waschschrte a 15 Minuten in DIG Puffer 1. Die Membran wurde 2 min in DIG Puffer 3 äquilibriert und anschließend in die Farbsubstratlösung überführt. Die Membran wurde so lange inkubiert, bis

die gewünschte Signalintensität erreicht war (1 h bis über Nacht). Die Reaktion wurde durch Waschen mit Leitungswasser gestoppt.

3.1.15. Northern-Analyse

Die Northern-Blot-Technik dient der qualitativen und quantitativen Bestimmung von **RNA**-Molekülen. Analog zur Southern-Blot-Technik wird die RNA gelelektrophoretisch aufgetrennt und auf eine Trägermembran übertragen. Die Detektion erfolgte über Digoxigenin-markierte antisense-RNA-Sonden.

Isolierung von RNA

Gesamt-DNA wurde mit einem TRIreagenz isoliert, das ist eine monophasische Lösung, bestehend aus Phenol und Guanidinisothiocyanat. Diese Mischung denaturiert effektiv Proteine und inhibiert RNasen. Es wurde ein Produkt der Firma Peqlab verwendet:

peqGOLD TriFast™

In einem 1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß wurden ca. 50 mg Gewebe mit einem Teflonhomogenisator homogenisiert und mindestens 5 min bei RT inkubiert.

Pro 500 µl TriFast-Reagenz wurden eingesetzt:

1 Fettkörper (*Galleria*- oder *Calliphora*-Larve)

40 Larvengehirne (*Galleria* oder *Calliphora*).

Das homogenisierte Gewebe kann bei 4°C mehrere Monate lang gelagert werden. Da die verwendeten Gewebe relativ viel Fettbestandteile enthielten, wurde an dieser Stelle ein zusätzlicher Reinigungsschritt eingefügt - das Homogenat wurde zentrifugiert (10 min, 13 000 rpm, RT). Zwischen einer schaumartigen Fettschicht und einem Pellet aus unlöslichen Substanzen wurde die rote RNA-haltige Lösung mit einer Pipette abgenommen. Pro eingesetztem ml peqGOLD TriFast™ wurden 200 µl Chloroform zugegeben und die Probe kräftig 15 s geschüttelt. Nach einer Inkubation bei RT für 10 min folgte eine Zentrifugation (5 min, 13 000 rpm, RT), die zur Entstehung von drei Phasen führte: eine obere wässrige Phase, eine weiße Interphase und eine untere, rote, phenolhaltige Phase. Die wässrige Phase wurde abgenommen und zweimal mit 1 Vol. Chloroform ausgeschüttelt. Die wässrige Phase wurde in ein frisches Reaktionsgefäß überführt und pro eingesetztem Mililiter peqGOLD TriFast™ wurde 0,5 ml Isopropanol zugegeben. Die Probe wurde gemischt und für 15 min bei RT inkubiert. Im Anschluss folgte eine Zentrifugation (10 min, 13 000 rpm, 4°C). Der

Isopropanolüberstand wurde vorsichtig mit einer Pipette entfernt und das weißliche Pellet mit 70%igem Ethanol gewaschen. Die RNA wurde kurz in der Lyophylle getrocknet und in H₂O bidest aufgenommen.

Elektrophorese von RNA auf Agarosegelen

Für die Gelelektrophore von RNA wurden Formaldehydgele verwendet (Vol. 100 ml).

| | |
|-----------------------|--|
| 5x RNA-Laufpuffer | 0,1 M MOPS, 50 mM Natriumacetat 5 mM EDTA pH 8,0, der pH Wert wurde auf 7,0 eingestellt. (Für 1 l: 20,9 g MOPS, 16,6 ml 3 M NaAc, 10 ml 0,5 M EDTA, pH 8,0) |
| Ethidiumbromid-Lösung | 400 µg/ml in H ₂ O |
| 6x DNA-Probenpuffer | |

Vorbereitung eines RNA-Gels:

Für ein 100 ml Gel wurden 1 g Agarose in 61,8 ml H₂O auf einem Magnetrührer aufgeköcht. Nach Abkühlung auf 60°C wurden 19,5 ml 5x Laufpuffer, 17,7 ml Formaldehyd (37%) zugegeben und das Gel in den Schlitten gegossen. Die Polymerisierung des Gels erfolgte mindestens 45 min bei RT. Das Gel wurde mit dem Schlitten in Frischhaltefolie gewickelt und bis zu 2 Tagen im Kühlschrank aufbewahrt.

Probenvorbereitung:

| | |
|---------|-----------------------|
| 2,2 µl | RNA-Lösung |
| 1 µl | 5x RNA-Laufpuffer |
| 1,75 µl | Formaldehyd |
| 5 µl | Formamid |
| 1 µl | Ethidiumbromid-Lösung |

Die RNA wird 10 min bei 68°C linearisiert. 2 µl 6x DNA Probenpuffer wurde zugegeben und die Proben auf Eis aufbewahrt.

Elektrophorese

Das Gel wurde in die Kammer gestellt und mit 1x RNA-Laufpuffer überschichtet. Pro cm Gellänge wurde 8 V Spannung angelegt.

Transfer von RNA aus Agarosegelen auf Nylonmembran („Northern blotting“)

Das Gel wurde unter UV-Licht fotografiert und ausgemessen. Das Gel wurde 5 min in H₂O geschwenkt und anschließend 45 min in 20x SSC. Der Aufbau der Transferapparatur entsprach dem beim Southern Blot (3.1.14.). Der Transfer erfolgte über Nacht.

Im Anschluss wurde die RNA durch UV-Crosslinking mit der Membran verbunden. Die Membran wurde 5 min in 2x SSC geschwenkt.

Hybridisierung und Detektion

Die Prähybridisierungs-, Hybridisierungs- und Detektionsprozedur entsprach der beim Southern-Blotting. Die Hybridisierung erfolgte bei 50°C über Nacht.

3.1.16. Totalpräparat-in-situ-Hybridisierung

Durch die „Whole mount“-in-situ-Hybridisierung wurden spezifische mRNAs in den Zellen von Geweben durch Hybridisierung mit einer mit Digoxigenin-markierten-, „antisense“-Sonde nachgewiesen. Es wurde eine Methode verwendet, die für *Xenopus* Embryos entwickelt worden ist (Harland, 1991)

Präparation der Organe/Gewebe

| | |
|-----------------------------|---|
| Ungepufferte Insektensaline | 130 mM NaCl, 5 mM KCl, 1 mM MgCl ₂ , 0,5 mM CaCl ₂ |
| MEMFA | 0,1 M MOPS, 2 mM EGTA, 1 mM MgSO ₄ , 3,7% Formaldehyd |
| Methanol | pa. |

Eine *Galleria* Larve wurde auf Eis betäubt. Hirne und Zentralnervensysteme wurden in ungepufferten Insektensaline herauspräpariert und in MEMFA Puffer 2 h bei RT fixiert. Anschließend wurde 1 Vol Methanol zum Fixierungspuffer hinzugegeben und 2-3 min inkubiert. Der Überstand wurde vorsichtig mit einer Pipette entfernt und durch 100%

Methanol ersetzt. Präparierte Gewebe können in Methanol bei -20°C für Monate gelagert werden.

In-situ-Hybridisierung (1. Tag)

| | |
|-----------------------|--|
| PBS | 137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 7 mM Na ₂ HPO ₄ , 1,5 mM KH ₂ PO ₄ , pH 7,4-7,6 |
| PBSw | PBS mit 0,1% Tween20 |
| 4% PFA | 4% Paraformaldehyd in PBS auf 60°C erhitzen, bis PFA vollständig gelöst ist |
| 20x SSC | 3 M NaCl, 0,3 M Natriumcitrat, pH 7,0 |
| Proteinase K Lösung | 10 µg/ml in PBSw |
| Hybridisierungslösung | 0,5 g Blocking Reagenz (Roche), 25 ml Formamid, 12,5 ml 20x SSC auf 65°C erhitzen, bis alles gelöst ist (ca. 30 min), 9,75 ml H ₂ O, 500 µl Hefe-tRNA (100 mg/ml), 100 µl Heparin (50 mg/ml), 250 µl Tween-20 (20%), 500 µl CHAPS (10%), 1250 µl EDTA (0,2 M) |

Die fixierten Gewebe wurden in einer absteigenden Methanolreihe je 5 min bei RT inkubiert - 75%, 50%, 25% Methanol in PBSw - und 3 mal 5 min in PBSw gewaschen. Im Anschluß wurden die Gewebe 30 min in Proteinase-K-Lösung verdaut. Die Gewebe wurden in PBSw gespült und 2x 5 min in PBSw gewaschen. Es folgte eine Inkubation für 3 min in einer 1:1 Mischung aus PBSw und Hybridisierungslösung. Danach wurden die Gewebe 3 min in Hybridisierungslösung gewaschen. Um endogene Phosphatasen zu inaktivieren, wurden die Gewebe 1 h bei 65°C in einem Wasserbad inkubiert. Es folgte eine Prähybridisierung in 500 µl Hybridisierungslösung für 2-3 h im Wasserbad bei 55°C. 1 µl RNA-Sonde (100 ng) wurden in 3 µl Hybridisierungslösung 5 min bei 95°C in einem Heizblock denaturiert, anschließend wurden 100 µl vorgewärmte Hybridisierungslösung (55°C) zugegeben. Der Sonden/Hybridisierungsmix wurde zu den Geweben in 500 µl Hybridisierungspuffer zugegeben (Endkonzentration Sonde: 100 ng/ 600 µl). Die Hybridisierung erfolgte über Nacht bei 55°C in einem Wasserbad.

2. Tag

| | |
|-----------------------|---|
| 20x SSC | 3 M NaCl, 0,3 M Natriumcitrat, pH 7,0 |
| 2x SSC / 0,1% CHAPS | 10 ml 20x SSC, 0,1 g CHAPS, 90 ml H ₂ O |
| 0,2x SSC / 0,1% CHAPS | 10 ml 2x SSC, 0,1 g CHAPS, 90 ml H ₂ O |
| TBS | 10 mM Tris-Cl, 150 mM NaCl, pH 7,4 |
| TBSx | TBS mit 0,1% Triton X-100 |
| Antikörperpuffer | 12,75 ml TBSx, 2,25 ml Ziegen-Serum (hitzeinaktiviert, 30 min bei 56°C) |

Die 2x SSC / 0,1% CHAPS Lösung wurde auf 37°C vorgewärmt, die 0,2x SSC / 0,1% CHAPS Lösung auf 60°C. Die Gewebe wurden in folgenden Lösungen gespült:

- a) Hybridisierungslösung
- b) 1:1 Mix aus Hybridisierungslösung und 2x SSC / 0,1% CHAPS
- c) 2x SSC / 0,1% CHAPS.

Anschließend wurde 2x 15 min in 2x SSC / 0,1% CHAPS bei 37°C gewaschen und dann mit 0,2x SSC / 0,1% CHAPS gespült. Es folgten zwei Waschschrte mit 0,2x SSC / 0,1% CHAPS bei 60°C und eine Spülung in 50% TBS / 50% 0,2x SSC / 0,1% CHAPS bei RT. Es wurde 5 min in TBS bei RT gewaschen und die Gewebe in TBSx überführt. Zum Abblocken von unspezifischen Bindungsstellen wurde für 2 h bei RT in Antikörperpuffer inkubiert. Der Anti-Dig-AP-Antikörper (Roche) wurde 1:500 in Antikörperpuffer verdünnt. Der Antikörperpuffer wurde durch die Antikörperlösung ersetzt und die Gewebe über Nacht bei 4°C inkubiert.

3. Tag

| | |
|------------------------------------|--|
| AP (alkalische Phosphatase)-Puffer | 100 mM Tris, 100 mM NaCl, 50 mM MgCl ₂ , pH 9,5 |
| Stopp-Puffer | 100 mM Tris-Cl, 1 mM EDTA, pH 7,4 |
| Färbelösung | NBT (66 µl), BCIP (33 µl) in 10 ml AP Puffer, frisch ansetzen |
| BABB | Benzylalkohol : Benzylbenzoat, 2:1 |
| Methanolreihe | 33%, 66%, 100% |

Die Antikörperlösung wurde durch TBSx ersetzt und die Gewebe dreimal 10 min mit TBSx bei RT gewaschen. Anschließend wurde 15 min in AP Puffer gewaschen. Die Gewebe wurden in der Färbelösung inkubiert, bis die gewünschte Signalintensität erreicht war (5 - 30 min). Die Reaktion wurde durch 2x Waschen in Stopp-Puffer beendet. Die Präparate wurden ausgewertet und fotografiert und in einer aufsteigenden Methanolreihe entwässert (je 1 min). Anschließend wurde mit BABB aufgehellt und erneut ausgewertet.

3.1.17. Herstellung einer lambda-Triplex2-Phagen-Bibliothek

Der „SMART™-cDNA-Library-Construction-Kit“ (Clontech) wurde eingesetzt, um aus geringen Mengen gesamt-RNA, hochwertige cDNA Bibliotheken herzustellen und einen hohen Anteil an vollständigen cDNAs zu erhalten.

Als Start Oligonukleotid für die Erststrangsynthese dient hierbei ein modifizierter Oligo(dT) Primer (CDS III/3'PCR Primer). Über diesen Primer wird bei der Erststrangsynthese eine spezifische Smart III Sequenz mit einer Sfi I B Restriktionsschnittstelle an das 5'-Ende des Erststranges angehängt. Ein SMART III Oligo mit Sfi I A Restriktionsschnittstelle dient als kurzes erweitertes Template am 5'-Ende der mRNA. Reverse Transkriptasen hängen, wenn das Ende des mRNA-Templates erreicht ist, dCytosine an das 3'-Ende des cDNA Erststrangs an (dC tailing). Das Smart III Oligo hat am 3'-Ende drei Guanidinreste, die sich an solche polyC-Schwänze anlagern. Die Reverse Transkriptase wechselt das Template (Template switch) und synthetisiert das SMART III Oligo zuende. Die entstehende cDNA enthält die komplette cDNA und zusätzlich die komplementäre Sequenz des SMART III Oligos. Diese

Sequenz und die SMART Sequenz des oligo(dT) Primers dient als universelle „Priming site“ für die folgende PCR Amplifikation.

Die so entstandenen doppelsträngigen cDNAs haben am 5'-Ende eine Sfi I A

Restriktionsschnittstelle und am 3'-Ende eine Sfi I B Schnittstelle. Das erlaubt ein gerichtetes Klonieren in den λTriplex2 Vektor.

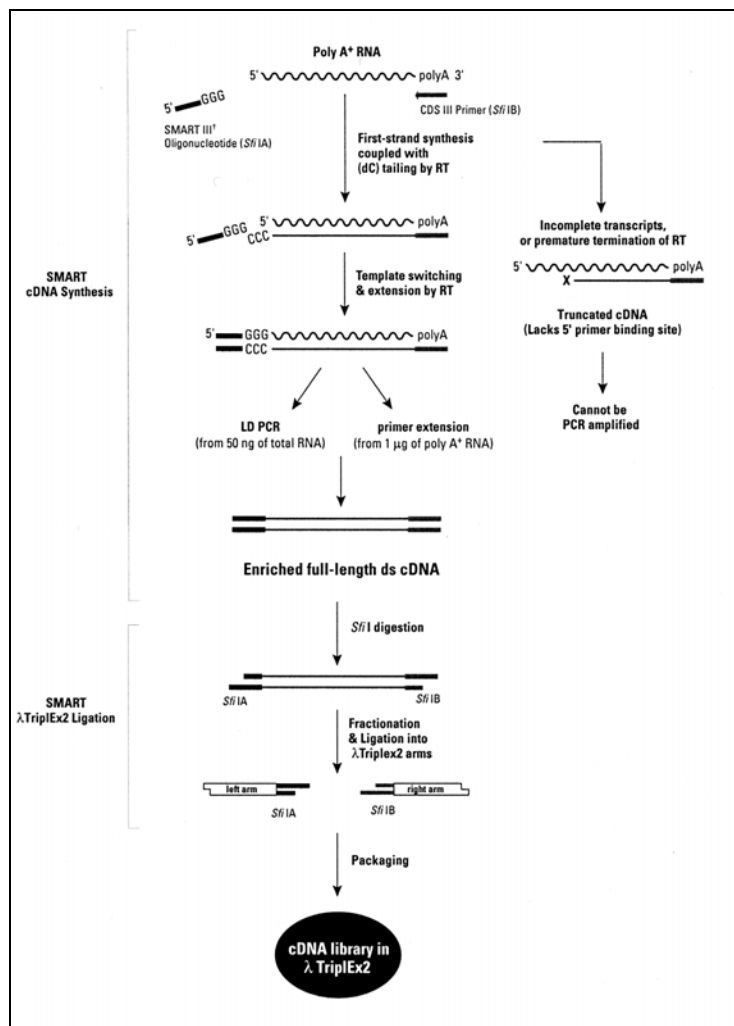


Abb. 9 Das Smart-Prinzip (Clontech), Erläuterungen siehe Text

Isolierung von gesamt RNA

Gesamt RNA wurde mit der TRIreagenz Methode isoliert (3.1.15.1.).

Erststrang-cDNA-Synthese (RT-PCR)

Alle eingesetzten Reagenzien waren Teil des „Library Construction Kits“.

Für die Erststrangsynthese wurden folgende Reagenzien in einem 200 µl Reaktionsgefäß gemischt:

| | | |
|-------------------------|-------|----------------------------------|
| 1-3 | µl | gesamt RNA Lösung (1 µg) |
| 1 | µl | SMART III Oligonukleotid (10 µM) |
| 1 | µl | CDS III/3`PCR-Primer (10 µM) |
| ad H ₂ O auf | 5 µl. | |

Die Komponenten wurden gemischt und in einem Thermocycler 2 min bei 72°C erhitzt. Anschließend wurde das Reaktionsgefäß 2 min auf Eis abgekühlt und folgendes hinzugegeben:

| | | |
|-----|----|---|
| 2,0 | µl | 5x Erststrangpuffer |
| 1,0 | µl | DTT (20 mM) |
| 1,0 | µl | dNTP-Mix (10 mM) |
| 1,0 | µl | Superscript Reverse Transkriptase (Gibco) |

Die Reagenzien wurden gemischt und 1 h bei 42°C in einem Thermocycler inkubiert. Die Reaktion wurde durch Abkühlen auf Eis gestoppt. Erststrang Reaktionsgemische wurden bei -20°C gelagert.

cDNA-Amplifikation durch LD-PCR (long distance PCR)

Folgende Reagenzien wurden in einem 200 µl Reaktionsgefäß gemischt:

| | | |
|-----|----|-------------------------|
| 2,0 | µl | Erststrang-cDNA-Lösung |
| 80 | µl | H ₂ O |
| 10 | µl | 10x cDNA-PCR-Puffer |
| 2 | µl | dNTP Mix (10 mM) |
| 2 | µl | 5` - PCR-Primer (10 µM) |

| | | |
|---|----|-----------------------------------|
| 2 | µl | CDS III/3` - PCR-Primer |
| 2 | µl | 50x Advantage-cDNA-Polymerase-Mix |

Das Reaktionsgemisch wurde durch Auf- und Abpipettieren gemischt. Es folgte die Amplifikation durch PCR:

95°C 1 min
20 Zyklen:
95°C 15 s
68°C 6 min

Nach Abschluss der Amplifikation wurden 5 µl der Probe auf einem Agarosegel analysiert. Eine typische cDNA besteht aus einem Schmier im Bereich von 1-4 kbp mit einigen helleren Banden. Das Bandenmuster korrespondiert mit den häufigen mRNAs in den analysierten Geweben oder Spezies. Einige typische cDNAs sind auf Bild 10 abgebildet.

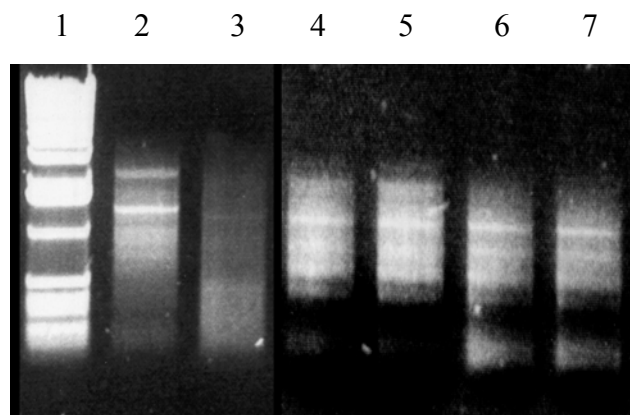


Abb. 10 Ergebnisse von cDNA-Synthesen mit dem Smart-System (Spur 1, Marker; Spur 2-7, cDNAs)

Proteinase K Verdau

Zu 50 µl der amplifizierten cDNA (2-3 µg) wurden 2 µl Proteinase-K (20 µg/µl) zugegeben. Der Ansatz wurde gemischt und 20 min bei 45°C inkubiert. Im Anschluss wurden 50 µl H₂O zugegeben und die Probe mit 100 µl PCIA 2 min ausgeschüttelt. Es folgte ein Zentrifugationsschritt (5 min, 13 000 rpm, RT). Die obere wässrige Phase wurde in ein frisches Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt 2x mit 100 µl Chloroform ausgeschüttelt. Der wässrige Überstand wurde in ein frisches Reaktionsgefäß überführt und 10 µl 3 M

Natriumacetat (pH 4,7), 1,3 μl Glykogen (20 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) und 260 μl Ethanol (RT, 100%) zugegeben. Die ausgefallene cDNA wurde sofort abzentrifugiert (20 min, 13 000 rpm, RT). Der Überstand wurde vorsichtig mit einer Pipette abgenommen und das Pellet mit 100 μl 75%igem Ethanol gewaschen. Das Pellet wurde 15 min luftgetrocknet und in 79 μl H₂O aufgenommen.

Verdau der cDNA mit Sfi I

Die folgenden Komponenten wurden in einem frischen Eppendorf Reaktionsgefäß vereinigt:

| | | |
|----|---------------|---|
| 79 | μl | cDNA-Lösung |
| 10 | μl | 10x Sfi I- Puffer |
| 10 | μl | Sfi I- Restriktionsenzym (10 U/ μl) |
| 1 | μl | 100x BSA |

Der Ansatz wurde gemischt und 2 h bei 50°C in einem Heizblock inkubiert. Es wurden 2 μl 1% Xylencyanol zugegeben und gemischt.

Größenfraktionierung der cDNA

Es wurde eine Größenfraktionierung mit CHROMA SPIN-400 Säulchen durchgeführt, um kurze cDNA Fragmente (>400 bp) abzutrennen).

CHROMA SPIN-400 Säulchen
Säulen-Puffer

Das Säulenmaterial der CHROMA SPIN-400 Säulchen wurde durch Invertieren gründlich resuspendiert. Das Säulchen wurde mit einer Klammer fixiert und die untere Verschlusskappe abgedreht. Der Säulen Puffer lief nun durch das Säulchen. Wenn die Oberfläche des Säulenmaterials sichtbar wurde, wurde das Säulchen mit Säulenmaterial aus einem zweiten Säulchen aufgefüllt, bis die Oberfläche der Gelmatrix auf Höhe der 1 ml Markierung war. Nachdem der Säulenpuffer vollständig abgetropft war, wurden 700 μl Säulen-Puffer vorsichtig an die Innenwand des Säulchens pipettiert. Nach 15 bis 20 min, wenn der Säulenpuffer vollständig durchgelaufen war, wurden 100 μl des Gemischs aus Sfi I- verdauter cDNA und Xylencyanol Farbstoff in die Mitte der Säulenmatrix pipettiert. Nachdem die Probe vollständig absorbiert war, wurde das Reaktionsgefäß, das die cDNA Lösung enthielt,

mit 100 μl Säulenpuffer gewaschen und der Puffer auf die Säule pipettiert. Nachdem die Lösung vollständig in die Säulenmatrix eingezogen war, wurden 650 μl Säulenpuffer vorsichtig auf die Säule pipettiert. Nun wurden die nächsten 17 Tropfen, die aus der Säule kamen, in einem einzelnen Eppendorf Reaktionsgefäß aufgefangen. Jeder Tropfen hat ein Volumen von etwa 35 μl . Von jeder Fraktion wurden 3 μl separat auf ein Agarosegel aufgetragen. Die Fraktionen, die cDNA mit ausreichender Länge enthielten (in der Regel Fraktion 7 bis 11), wurden vereinigt. Dazu wurden 1/10 Vol. Natriumacetat (3M, pH 5,2), 1,3 μl Glykogen (20 mg/ml) und 2,5 Vol Ethanol (100%) gegeben und über Nacht ausgefällt. Im Anschluß folgte ein Zentrifugationsschritt (20 min, 13 000 rpm, RT), der Überstand wurde vorsichtig abpipettiert und das Pellet 10 min luftgetrocknet. Die Sfi I geschnittene, größenfraktionierte cDNA wurde in 7 μl H₂O gelöst und bei -20°C gelagert.

Quantifizierung der cDNA

Für die Quantifizierung wurden Ethidiumbromid-Platten verwendet. Zunächst wurde von einer Standard-DNA (λ DNA 0,5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) eine Konzentrationsreihe erstellt (10 ng/ μl bis 200 ng/ μl). Von jeder Konzentrationsstufe wurden 0,5 μl auf eine vorbereitete EtBr-Agarose-Platte pipettiert. Parallel dazu wurde 0,5 μl der cDNA-Lösung auf die gleiche Platte gegeben. Nach 10 min, in denen das EtBr in die DNA interkalieren konnte, wurde unter UV-Licht die Konzentration der cDNA-Lösung durch den Vergleich mit der Verdünnungsreihe der Standard-DNA bestimmt.

Ligation der Vektorarme

Die Ligation der Vektorarme erfolgte mit folgendem Ansatz:

| | | |
|---------------------------------|-----|---------------|
| cDNA (1 μg) | 1,0 | μl |
| Vektor (500 ng/ μl) | 1,0 | μl |
| 10x Ligations Puffer | 0,5 | μl |
| ATP (10 mM) | 0,5 | μl |
| T4 DNA Ligase | 0,5 | μl |
| H ₂ O | 1,5 | μl |

Die Reaktion wurde über Nacht bei 16°C inkubiert.

In vitro Verpackungsreaktion

Es wurde der „Gigapack® III Gold Packaging Extract Kit“ verwendet.

| | | | |
|---|-----------------------------|----|---------------------|
| SM - Puffer (λ -Verdünnungspuffer) für 1 l : | 5,8 | g | NaCl |
| | 2,0 | g | Glukose |
| | 50 | ml | 1 M Tris-Cl, pH 7,5 |
| | 5 | ml | 2% Gelatine |
| | ad H ₂ O auf 1 l | | |

Ein Verpackungsextrakt wurde aus der -70°C Gefriertruhe geholt und auf Eis gestellt. Der Extrakt wurde schnell zwischen den Fingerspitzen angetaut. Die 5 μ l Ligationsansatz wurden zu dem Extrakt dazupipettiert und umgerührt. Die Reaktion wurde 2 h bei RT inkubiert und anschließend durch die Zugabe von 500 μ l SM Puffer gestoppt. Es wurden 20 μ l Chloroform zugegeben und durch invertieren gemischt. Der Ansatz wurde abzentrifugiert (5 min, 13 000 rpm, RT). Der Überstand stellt die unamplifizierte Bibliothek dar und ist bei 4°C mehrere Jahre haltbar.

Titerbestimmung der unamplifizierten Bibliothek und Bestimmung des Prozentsatzes der rekombinanten Phagen

| | |
|-------------------|---|
| SM-Medium | siehe 2.10.2 |
| LB/Maltose-Medium | 10 ml 1M MgCl ₂ , 10 ml 20% Maltose, ad LB auf 1 l |
| LB/-Topagarose | 7 g Agarose, 10 ml 10 % Maltose ad LB-Medium auf 1 l |
| IPTG | 100 mM in H ₂ O, filtersterilisiert |
| X-Gal | 100 mM in DMF |

Zur Titration einer Phagenbibliothek wurden zwei Verdünnungen des unamplifizierten λ Lysats mit SM-Medium angefertigt (1:5, 1:20).

Eine isolierte Kolonie XL1-Blue Zellen wurde von einer Platte gepickt und in 15 ml LB/Maltose Medium bei 37°C über Nacht geschüttelt. Die Zellen wurden abzentrifugiert (5

min, 13 000 rpm, 4°C) und in 7,5 ml 10 mM resuspendiert. Eine entsprechende Anzahl LB-Platten wurde mindestens 2 h bei 37°C vorgewärmt. 1 µl unverdünntes Phagenlysat und je 1 µl der Verdünnungen wurde mit 200 µl der Bakteriensuspension gemischt und in einem 15 ml Kulturröhrchen 15 min bei 37°C inkubiert (Adsorption der Phagen). Die Topagarose wurde währenddessen aufgeköcht und in einem Wasserbad auf 50°C eingestellt. 2 ml der Topagarose, 50 µl IPTG Lösung und 100 µl X-Gal Lösung wurden zu den Bakterien pipettiert, das Gefäß schnell verschlossen, zweimal vorsichtig invertiert (keine Blasen) und schnell auf die vorgewärmten LB-Platten gegossen. Durch Schwenken wurde die Agarose auf der Plattenoberfläche gleichmäßig verteilt. Die Platten wurden 10 min bei RT gekühlt, bis die Agarose vollständig ausgehärtet war und anschließend umgekehrt bei 37°C über Nacht inkubiert. Die Zahl der Plaques pro Platte wurde gezählt. Der Titer (pfu/ml) wurde nach folgender Formel bestimmt:

$$\text{pfu/ml} = \frac{\text{Zahl der Plaques} \times \text{Verdünnung} \times 10^3 \text{ µl/ml}}{\text{µl ausplattiertes verdünntes Phagenlysat}}$$

Phagen, die eine blaue Färbung aufwiesen, hatten kein cDNA-Insert (nicht rekombinant). In der Regel war der Anteil dieser Phagen unter 1%.

3.1.18. Immunoscreening einer Phagenbibliothek

Einer der großen Vorteile des λ-TripleX2-Vektors ist, dass die gerichtet klonierte cDNA in allen drei Leserastern abgelesen wird. Außerdem enthalten die Transkripte die 5' untranslatierte Region (UTR) des *E.coli* ompA Gens, was die mRNA stabilisiert und zu einer erhöhten Expression führt.

cDNA, die in den λ-TripleX2-Vektor kloniert wurde, wird als Fusionsprotein exprimiert, dessen N-Terminus durch die Vektorsequenz und dessen C-Terminus durch einen ORF in der cDNA kodiert wird. Nach dem Ausplattieren der λ-Expressionsbibliothek werden die Fusionsproteine auf Nitrozellulosefiltern immobilisiert und die Zielproteine mit spezifischen Antikörpern identifiziert.

| | |
|-----------------------|--|
| IPTG | 10 mM in H ₂ O, filtersterilisiert |
| TBST | 10 mM Tris-Cl, pH 8,0, 150 mM NaCl, 0,05% Tween 20 |
| Blockinglösung | 1% Gelatine in TBST |
| Erstantikörperlösung | Anti-ATTH, 1:5000 in TBST |
| Zweitantikörperlösung | Anti-Rabbit-POD 1: 10000 in TBST |
| Entwicklungslösung | Tris-Cl, pH 9,5, 100 mM NaCl, 5 mM MgCl ₂ |
| NBT | 75 mg/ml in DMF |
| BCIP | 50 mg/ml in DMF |
| Stop-Puffer | 20 mM Tris-Cl, pH 8,0, 5 mM EDTA |

Die gewünschte Anzahl von 15-cm-LB-Agarplatten wurde bei 37°C vorgewärmt, bis keine Flüssigkeitstropfen auf der Oberfläche zu erkennen waren (2-4 h). Die Top-Agarose wurde aufgeköcht in ein 50°C Wasserbad überführt.

Eine isolierte Kolonie XL1-Blue-Zellen wurde von einer Platte gepickt und in 15 ml LB/Maltose-Medium bei 37°C über Nacht geschüttelt. Die Zellen wurden abzentrifugiert (5 min, 13 000 rpm, 4°C) und in 7,5 ml 10 mM MgCl₂-Lösung resuspendiert. Die Phagen-Bibliothek wurde so mit SM-Puffer verdünnt, dass in 5 µl 1,2x 10⁴ pfus enthalten waren. Je 5 µl der Phagensuspension wurden mit 200 µl der XL1-Blue Übernachtskultur gemischt und in einem 15 ml Kulturröhrchen 15 min bei 37°C inkubiert (Adsorption der Phagen). 5 ml Topagarose wurden zu den Bakterien pipettiert, das Gefäß schnell verschlossen, zweimal vorsichtig invertiert (keine Blasen) und schnell auf die vorgewärmten LB-Platten gegossen. Durch Schwenken wurde die Agarose auf der Plattenoberfläche gleichmäßig verteilt. Die Platten wurden 10 min bei RT gekühlt, bis die Agarose vollständig ausgehärtet war und anschließend umgekehrt bei 42°C inkubiert, bis die ersten Plaques zu erkennen waren (4-6 h). Die Nitrocellulose Rundfilter (Ø 12 cm) wurden in 10 mM IPTG Lösung eingeweicht und zwischen zwei Whatman-Papierstreifen kurz angetrocknet. Mit einer sauberen Pinzette wurden die Nitrozellulose-Rundfilter auf die Platten gelegt. Mit einer sterilen Kanüle wurde ein Markierungsmuster in die Filter und den darunterliegenden Agar gestochen. Die Filter wurden bei 37°C, 5 h lang inkubiert. Im Anschluß wurden die Platten für 30 min bei 4°C abgekühlt und die Filter mit einer Pinzette vorsichtig von der Agaroseoberfläche abgezogen und in TBST überführt. Die Filter wurden 5 mal 5 min in TBST bei RT gewaschen und über Nacht in Blockinglösung bei 4°C auf einem Kippschüttler (60 rpm) inkubiert (Blockierung von unspezifischen Bindungsstellen). Am nächsten Morgen wurden die Filter 5x 5 min mit TBST bei RT gewaschen. Der Erstantikörper wurde in TBST verdünnt. Alle Filter wurden in

eine Petrischale gelegt, jeweils 5 ml der Erstantikörperlösung wurde zwischen zwei „Vorderseiten“ pipettiert (keine Blasen!). Die Inkubation mit dem Erstantikörper wurde 1 h bei RT auf einem Kippschüttler (60 rpm) durchgeführt. Im Anschluß wurden die Filter 5 mal 5 min mit TBST bei RT gewaschen. Der Zweitantikörper wurden in TBST verdünnt und die Filter für 2 h auf einem Kippschüttler (60 rpm) bei RT inkubiert. Anschließend wurden die Filter erneut 5 mal 5 min bei RT in TBST gewaschen. 200 µl NBT und 150 µl BCIP Lösung wurden mit 50 ml Entwicklungspuffer verdünnt. Die Filter wurden in die Substratlösung überführt und die Farbentwicklung beobachtet. Plaques, die eine rasche Färbung zeigten wurden mit Bleistift markiert. Der Entwicklungsprozeß dauerte in der Regel 1 h und wurde durch Zugabe von Stop-Puffer abgebrochen. Die Filter wurden mit H₂O gewaschen und getrocknet. Durch Vergleich der markierten positiven Plaques auf den Filtern, mit den Plaques auf der Platte wurden die positiven Klone identifiziert. Mit einer abgeschnittenen blauen Pipettenspitze wurden diese gepickt. Jeder ausgestochene Agarzylinder wurde in 500 µl SM- Puffer überführt, gevortext und über Nacht bei 4°C aufbewahrt.

Diese primär positiven Klone wurden für eine zweite Runde im Immunoscreening verwendet. In der zweiten Runde wurde darauf geachtet, dass auf den Platten nur isolierte Plaques zu sehen waren. Die Positiven aus der zweiten Runde wurden für die in-vivo-Exzission verwendet.

3.1.19. In-vivo-Exzission des pTriplEX2 aus der Phagen DNA

Die Umwandlung eines λ-TriplEx2-Klons in pTriplEx2 geschieht durch Ausschneiden und Zirkularisieren eines kompletten Plasmids aus dem rekombinanten Phagen. Das Plasmid wird durch cre-Rekombinase vermittelte Rekombination an loxP-Sequenzen erzeugt. Die Freisetzung erfolgt automatisch, wenn der rekombinante Phage in einen bakteriellen Wirt eingeschleust wird, der cre-Rekombinase exprimiert. Im verwendeten System zeigt der Bakterienstamm BM25.8 cre-Rekombinase Aktivität, wenn er bei 31°C gezogen wird. Höhere Temperaturen sind schädlich für diesen Bakterienstamm. Das erzeugte Plasmid ist stabil in E.coli, muß aber in der Regel in XL1-Blue Zellen transformiert werden, um größere Mengen brauchbare Plasmid-DNA zu erhalten.

Eine isolierte Kolonie BM25.8 Zellen wurde von einer Platte gepickt. Eine 10 ml LB-Übernachtskultur wurde in einem 50 ml Kulturgefäß bei 31°C auf einem Schüttler inkubiert. 100 µl einer 1 M MgCl₂ Lösung wurden zu der Kultur gegeben (10 mM MgCl₂ Endkonzentration). 150 µl einer Phagensuspension aus der zweiten Runde des Screenings

wurden mit 200 µl der Übernachtskultur gemischt und bei 31°C 30 min ohne Schütteln inkubiert. Anschließend wurden 400 µl LB Medium zugegeben und 1 h bei 31°C auf einem Schüttler (250 rpm) inkubiert. 10 µl der Zellsuspension wurde auf einer 9 cm LB/Ampizillin-Platte ausgestrichen und über Nacht bei 31°C inkubiert. Einzelne Kolonien wurden von den Platten gepickt und für Plasmidisolationen verwendet. Die Plasmide wurden in XL1-Blue-Zellen transformiert und analysiert.

3.1.20 Sequenzierung von DNA

DNA-Sequenzierungsreaktionen wurden mit dem Big-Dye-Terminator-Cycle-Sequencing-Ready-Reaction-Kit (Fa. Perkin Elmer) durchgeführt und mit einem ABI-Prism-Sequencer (Fa. Perkin Elmer) ausgewertet.

Die Sequenzierungs-PCR-Reaktion wurde in 200 μ l Reaktionsgefäßen durchgeführt.

Sequenzieransatz:

2 μ l Terminator ready reaction Mix

400 ng Plasmid (Template)

10 pm Primer

ad H₂O auf 10 μ l

PCR-Protokoll:

2 min 96°C

25 Zyklen

30 s 96°C

15 s 50°C (45°C)

4 min 60°C

dann 4°C.

Nach Beendigung der PCR wurden 90 μ l H₂O zu dem Ansatz dazupipettiert und die Lösung in ein 1,5-ml-Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt. Die DNA wurde durch Zugabe von 10 μ l 3 M Natriumacetat pH 5,2 und 250 μ l Ethanol p.a. gefällt. Die Probe wurde zentrifugiert (15 min, 13 000 rpm, RT) und der Überstand dekantiert. Das meist unsichtbare Pellet wurde mit 250 μ l 70%igem Ethanol gewaschen und abzentrifugiert (5 min, 13 000 rpm, RT). Der Überstand wurde mit einer Pipette entfernt und das Pellet in einer Vakuumzentrifuge getrocknet.

Das DNA-Pellet wurde in 20 μ l „Template suppression reagent“ (Perkin Elmer) gelöst. Die Lösung wurde 2 min auf 95°C erhitzt und anschließend bis zur Auswertung bei 4°C gelagert.

3.1.21 Computergestützte DNA-Sequenzanalyse

Folgende öffentlich zugängliche Sequenzanalyseprogramme wurden im Rahmen dieser Arbeit verwendet.

| Name | Anwendung | Adresse |
|------------------------------|--|---|
| BLAST | Suche nach ähnlichen Sequenzen (DNA, Protein) | http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/ |
| BLASTX | Übersetzt eine Nukleotidsequenz in allen sechs Leserastern und vergleicht die so erzeugten Peptide mit einer Datenbank | http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/blast.cgi?Jform=1 |
| Clustal W | Vergleich mehrerer DNA- oder Proteinsequenzen miteinander | http://www2.ebi.ac.uk/clustalw/ |
| BLASTN | Durchsucht DNA Datenbanken nach ähnlichen Sequenzen (DNA) | http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/blast.cgi?Jform=1 |
| BLAST2 SEQUENCES | Vergleicht zwei Sequenzen miteinander (DNA, Protein) | http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/bl2.html |
| Expasy Translate Tool | Übersetzt eine Nukleinsäure-sequenz in allen sechs Leserastern in eine Proteinsequenz | http://expasy.proteome.org.au/tools/dna.html |
| ORF-Finder | Sucht in allen sechs Leserastern einer DNA-Sequenz nach offenen Leserastern. Es ist möglich für einzelne gefundene ORFs eine BLAST Suche durchzuführen | http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/gorf.html |
| ScanProsite | Durchsucht eine Protein-Sequenz nach Mustern, die in der PROSITE Datenbank gespeichert sind. | http://www.expasy.ch/tools/scnpsit1.html |
| Search Pfam | Durchsucht eine Protein-Sequenz nach Mustern, die in der Pfam-Datenbank gespeichert sind. | http://www.sanger.ac.uk/Pfam/search.shtml |
| WWW Invert | Werkzeug zum Invertieren einer DNA-Sequenz. | http://bir.biology.washington.edu/Invert/invert1.htm |

3.2. Two-Hybrid-Methoden

3.2.1. Kultivierung von *Saccharomyces cerevisiae*

Wie *Escherichia coli* kann die Bierhefe *Saccharomyces cerevisiae* sowohl in Flüssigmedium, als auch auf der Oberfläche von Agarplatten gezogen werden. Die optimale Temperatur zur Inkubation von Bierhefe liegt bei 30°C. Hefen wachsen gut auf **Minimalmedium** mit Glukose als Kohlenstoffquelle und verschiedenen Salzen als Lieferanten für Stickstoff, Phosphor und Spurenelemente. Ein viel stärkeres Wachstum zeigen sie bei Gabe von Protein- und Hefe-Zellextrakten, die Aminosäuren, Nukleotidvorstufen, Vitamine und andere Metaboliten enthalten, die Zellen normalerweise de novo synthetisieren (**Vollmedium**). Während der exponentiellen Wachstumsphase (log-Phase) teilen sich Hefezellen alle 90 min, wenn sie im Vollmedium gezogen werden. Nach der Rate der Zellteilungen oder dem Anteil von knospenden Hefezellen in einer Kultur kann die log-Phase in drei Stadien unterteilt werden:

- | | |
|---|---|
| 1. frühe logarithmische Phase; Zelldichten | $< 10^7$ Zellen/ml |
| 2. mittlere logarithmische Phase; Zelldichten | 1 - 5×10^7 Zellen/ml |
| 3. späte logarithmische Phase; Zelldichten | 5×10^7 bis 2×10^8 Zellen/ml |

Bei Erreichen einer Zelldichte von 2×10^8 Zellen/ml spricht man von gesättigten Kulturen, die Zellen gehen in die stationäre oder G_0 -Phase über. Über die Messung der Absorption bei 600 nm kann die Zelldichte einer Flüssigkultur ermittelt werden. Für den Hefestamm EGY48 entspricht eine OD_{600} von 1,0 einer Zelldichte von ca. 3×10^8 Zellen/ml.

Flüssigkultur von *Saccharomyces cerevisiae*

Die Kultivierung des untransformierten Hefestammes EGY 48 erfolgte in **YPD-Vollmedium** (auch YEPD). Dieses „reiche, komplexe“ Medium wird üblicherweise für das Wachstum von Hefen benutzt, wenn keine besonderen Selektionsanforderungen an das Medium gestellt werden. Plasmid-transformierte Hefen wurden in **Minimalmedium (SD)** kultiviert. Minimalmedien eignen sich für die Selektion auf spezielle auxotrophe Fähigkeiten der Hefezellen. Der Hefestamm EGY48 ist defizient für die Synthese von Uracil, Histidin, Tryptophan und Leuzin. Die Histidin-, Tryptophan- und Uracil-Auxotrophie wird innerhalb des Two-Hybrid-Systems durch plasmidkodierte Gene komplementiert. Die Leuzin-Auxotrophie kann durch die Interaktion von „Köder“- und „Beute“-Protein aufgehoben werden.

Um auf den Erhalt eines bestimmten Plasmids (oder auf Interaktionen) zu selektionieren, wurde die entsprechende Komponente im Minimalmedium weggelassen. Es ist empfehlenswert, die Medien nicht zu autoklavieren, sondern sterilzufiltrieren oder die Kohlenstoffquelle nach dem Autoklavieren zuzugeben, um ein Karamellisieren von Glukose oder Galaktose zu verhindern.

Plattenkultur von *Saccharomyces cerevisiae*

Die Nährstoffe in Agar-Platten entsprachen denen in Flüssigmedium. Zusätzlich wurden 2% (w/v) Agar und 1 Natronlaugeplättchen pro Liter Medium vor dem Autoklavieren zugegeben. Die Natronlauge erhöht den pH-Wert der Lösung, so dass es nicht zu einem Zusammenbruch des Agars beim Autoklavieren kommt. Es bietet sich an, die Nährstoffe und besonders die Kohlenstoffquelle erst nach dem Autoklavieren zuzugeben.

Hefen wurden mit der Impföse auf den Platten ausgestrichen oder in nicht mehr als 200 µl Medium auf eine vorgewärmte Platte aufgetropft und mit dem Drygalski-Spatel verteilt.

Agarplatten mit Hefekulturen wurden mit Parafilm umwickelt, um ein Austrocknen zu vermeiden und 2-5 Tage bei 30°C inkubiert.

Für X-Gal-Plattenmedium, es dient dem Nachweis von β -Galaktosidaseaktivität, wurde dem Medium zusätzlich Natriumphosphat (Endkonzentration 70 mM) und Xgal in DMSO (Endkonzentration 80 mg/l) zugegeben.

Glycerinkultur von *Saccharomyces cerevisiae*

Hefestämme können bei -70°C in 15% Glycerin mehr als fünf Jahre lang gelagert werden. 210 µl Glycerin (86%, sterilfiltriert) wurden mit 1 ml einer späten logarithmischen oder frühen stationären Hefe-Flüssigkultur gründlich durch Invertieren gemischt, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -70°C gelagert.

3.2.2. Transformation von von *Saccharomyces cerevisiae*

Kompetente Hefezellen können sowohl zirkuläre als auch lineare DNA aufnehmen. Die verwendeten Two-Hybrid-Plasmide sind sogenannte „Shuttle Vektoren“, die sowohl in Hefen als auch in Bakterien episomal repliziert werden können. Sie tragen Selektionsmarker, mit denen Auxotrophien in Hefen komplementiert werden.

Das verwendete Hefe-Transformationsprotokoll ist die Lithiumacetat-Methode. Sie ist schnell und erreicht Transformationseffizienzen von 10^5 - 10^6 Transformanden pro µg Plasmid-DNA.

Die Lithiumacetat-Methode basiert auf der Tatsache, dass Alkali-Kationen Hefen zur Aufnahme von DNA kompetent machen können. Nachdem die Hefen in gepuffertem Lithiumacetat inkubiert wurden, wird die zu transformierende DNA zusammen mit einer „Carrier-DNA“ in die Zelle transportiert. Zugabe von Polyethylenglykol (PEG) und ein Hitzeschock verstärkten die DNA-Aufnahme. Die Hefen wurden anschließend auf Selektionsmedium ausplattiert.

Standard-Transformation (Gietz und Woods 1994)

Für alle Hefe Transformationen, mit Ausnahme der Transformation von Bibliotheksplasmiden, wurde diese Methode verwendet. In der Regel wurde 1 µg Plasmid DNA eingesetzt. Mit dieser Methode können auch bis zu drei Plasmide gleichzeitig transformiert werden.

Polyethylenglykol, 50% (w/v), MW 3350 in H₂O, sterilfiltriert

Lithiumacetat, 1 M in H₂O, sterilfiltriert

Lithiumacetat, 0,1 M in H₂O, sterilfiltriert

ssSS-DNA (2,0 mg/ml): Lachsspermien DNA (Origene)

Eine 10 ml Hefe-Übernachtskultur wurde abzentrifugiert (5 min, 3000 rpm, 4°C), der Überstand verworfen. Das Pellet wurde in 1 ml 100 mM Lithiumacetat aufgenommen und 5 min bei 30°C inkubiert. 100 µl der Hefesuspension wurden in ein 1,5 ml Eppendorf Reaktionsgefäß überführt und in der Tischzentrifuge abzentrifugiert (2 min, 3000 rpm, RT). Der Überstand wurde mit einer Pipette vollständig abgenommen. In dieser Reihenfolge wurden nun folgende Reagenzien über das Pellet geschichtet:

240 µl PEG (50% w/v)

36 µl 1 M Lithiumacetat

25 µl ssSS-DNA (2mg/ml)

~5 µl Plasmid DNA (100 ng bis 5 µg)

45 µl H₂O

Der Ansatz wurde mindestens 1 min gründlich gevortext. Es folgte ein Hitzeschock von 20 min bei 42°C. Im Anschluß wurde der Ansatz abzentrifugiert (2 min, 3000 rpm, RT), der

Überstand abgenommen und das Pellet in ca. 200 µl H₂O gelöst. Der Transformationsansatz wurde nun auf vorgewärmten Selektionsplatten ausplattiert, die Platten mit Parafilm umwickelt und bei 30°C 2-5 Tage inkubiert.

Hocheffizienz-Transformation von Bibliotheksplasmiden (Finley und Brent, 1996)

Dieses Transformationsprotokoll wurde für die Transformation von Two-Hybrid-cDNA-Bibliotheken in den Hefestamm EGY48 verwendet, der das Reporterplasmid pSH18-34 enthielt.

50% (w/v) Polyethylenglykol MW 3350 in H₂O, sterilfiltriert

1 M Lithiumacetat in H₂O, sterilfiltriert

0,1 M Lithiumacetat in H₂O, sterilfiltriert

ssSS-DNA (2,0mg/ml, Origene)

DMSO

Selektionsplatten (9 cm): Glu/CM -Ura, -His

Selektionsplatten (15 cm): Glu/CM -Ura, -His, -Trp

In einem 50 ml Kulturgefäß wurde eine 20 ml Übernackkultur des Hefestamms EGY48 / pSH18-34 in Glu/CM -Ura, -His Medium angelegt. Am nächsten Morgen wurde die Kultur in 100 ml Glu/CM -Ura, -His Medium auf eine OD₆₀₀ von 0,1 verdünnt, was ca. 1×10^7 Zellen/ml entspricht. Die Kultur wurde auf einem Rundschtüttler inkubiert (30°C, 225 rpm) bis eine OD₆₀₀ von 0,5 erreicht war. Die Zellen wurden abzentrifugiert (5 min, 3000 rpm, RT) und in 10 ml H₂O resuspendiert. Die Hefesuspension wurde erneut abzentrifugiert (5 min, 3000 rpm, RT) und in 0,5 ml 0,1M Lithiumacetat aufgenommen. In zehn sterilen 1,5-ml-Eppendorf-Reaktionsgefäßen wurden folgende Reagenzien vereinigt:

1 µg Bibliotheksplasmide (cDNA in pJG4-5)

10 µl ssSS-DNA (50 µg)

50 µl Hefesuspension

240 µl 50% PEG

30 µg 1M Lithiumacetat

Die Ansätze wurden 30 min bei 30°C inkubiert. In jedes Gefäß wurden 40 µl DMSO pipettiert (10% Endkonzentration) und durch Invertieren gemischt. Es folgte ein Hitzeschock bei 42°C für 10 min in einem Heizblock. Die Ansätze wurden abzentrifugiert, der Überstand vorsichtig mit einer Pipette entfernt und die Pellets in 100 µl H₂O resuspendiert. Der Inhalt jedes Reaktionsgefäßes wurde auf einer 15-cm-Hefe-Selektionsplatte (Glu/CM -Ura,-His,-Trp) mit einem Drygalski-Spatel ausgestrichen.

3.2.3. Charakterisierung eines „Köder“-Proteins

3.2.3.1. Immunologischer Nachweis des „Köder“-Proteins in Hefeklonen

Um nachzuweisen, dass in einem mit einem „Köder“-Plasmid transformierten Hefestamm das gewünschte LexA-Fusionsprotein gebildet wird, wurde eine Western-Blot-Analyse durchgeführt (s.o.). Als primärer Antikörper wurde ein kommerziell erhältlicher Antikörper gegen die LexA-Bindungsdomäne (Santa Cruz Inc.) verwendet.

3.2.3.2. Test auf Aktivierung der Reportergene durch das „Köder“-Protein

Ein LexA-Fusionsprotein, das als „Köder“ in einem Two-Hybrid-Experiment verwendet werden soll, darf nicht von sich aus die Transkription der Reportergene aktivieren. Dies wurde vor Beginn des eigentlichen Experiments überprüft, indem der Hefestamm EGY 48 mit dem lacZ - Reporterplasmid pSH18-34 und dem zu testenden „Köder“-Plasmid kotransformiert wurde. Als Positiv- bzw. Negativkontrolle wurden pSH17-4 und pRFHM1 verwendet.

Test auf lacZ-Genaktivierung

Um zu überprüfen, ob ein Hefestamm β-Galaktosidaseaktivität (lacZ⁺-Phänotyp) hat, wurde ein „Filter assay“ durchgeführt. Stark aktivierte Kolonien (z.B. mit pSH17-4) zeigten schon nach 5-10 min eine Blaufärbung. Ein „Köder“-Protein, das sich so verhält, ist für das Two-Hybrid-Experiment nicht geeignet. Schwache Aktivatoren produzieren nach 2-6 h eine leichte Blaufärbung. Sie wurden mit der Negativkontrolle (pRFHM1) verglichen und kommen für den „Interaction trap“ in Frage.

Z-Puffer: 60 mM Na₂HPO₄·7 H₂O, 40 mM NaH₂PO₄·H₂O, 10 mM KCl, 1 mM MgSO₄·7 H₂O, 50 mM β-Mercaptoethanol, pH 7,0, nicht autoklavieren!

| | |
|-------------------|-----------------|
| X-Gal | 20 mg/ml in DMF |
| Z-Puffer mit Xgal | 1mg/ml |

Ein runder Nylonfilter wurde auf die Platte mit den zu untersuchenden Hefeklonen gelegt und 1 min dort belassen. Die Membran wurde vorsichtig abgenommen und mit der Kolonieseite nach oben 5 min luftgetrocknet. Anschließend wurde sie mindestens 2x 10 min bei -70°C eingefroren und wieder aufgetaut. Die Membran wurde nun, mit der Kolonieseite nach oben, auf ein Stück Whatman-3MM-Filterpapier gelegt, das vorher im Z-Puffer mit Xgal getränkt wurde. Der Filter wurde bei 30°C inkubiert und nach 20 min, 2h und 6 h auf Farbentwicklung überprüft.

Nachweis der Leuzinabhängigkeit von „Köder“-Hefestämmen

Die Selektion im eigentlichen Two-Hybrid-Experiment basiert auf der Fähigkeit des „Köder“-Proteins, zusammen mit einem anderen „Beute“-Fusionsprotein die Transkription des LexA-Operator-LEU2-Gens zu aktivieren und so ein Wachstum auf Leuzin-Mangelmedium zu ermöglichen. Ein „Köder“-Protein allein darf diese Fähigkeit nicht besitzen. Der Test auf Leuzinabhängigkeit ist der wichtigste Test, um zu überprüfen, ob ein „Köder“-Protein einen zu hohen Hintergrund produziert. Der LEU2-Reporter in EGY 48 ist sensitiver als der pSH18-34-Reporter, so dass ein Stamm, der im Test auf lacZ-Aktivierung kein oder nur ein schwaches Signal gegeben hat, trotzdem ein Wachstum auf Leuzin-Defizienzmedium zeigen kann.

Gal/Raf/CM -Ura,-His Selektionsplatten

Gal/Raf/CM -Ura,-His,-Leu Selektionsplatten

Eine Kolonie EGY48 / pSH18-34 / bait wurde mit einer Impföse abgenommen und in 500 µl H₂O suspendiert. Daraus wurde eine Serie von 1:10 Verdünnungen in H₂O hergestellt, die drei Potenzen abdeckten.

Je 100 µl jeder Verdünnung wurden auf Gal/Raff/CM-Ura,-His und Gal/Raf/CM -Ura,-His,-Leu Selektionsplatten ausplattiert. Die Platten wurden bei 30°C inkubiert, das Wachstum der Klone über 5 Tage hinweg beobachtet und protokolliert.

3.2.4 „Repression assay“

Mit diesem Experiment wurde nachgewiesen, dass ein LexA-Fusionsprotein in der Hefe synthetisiert wird, welches in der Lage ist, in den Zellkern der Hefe zu gelangen und dort an LexA-Operatorsequenzen zu binden.

Das „Shuttle“-Reporter-Plasmid pJK101 enthält eine „GAL upstream activating sequence“ (UAS_{GAL}) gefolgt von LexA-Operatoren upstream der lacZ-kodierenden Sequenz.

Hefen, die pJK101 enthalten, zeigen signifikante β -Galaktosidaseaktivität, wenn sie auf Medium gezogen werden, das Galaktose als Kohlenstoffquelle enthält, da endogenes Hefe-GAL4 an die UAS_{GAL} bindet. LexA-Fusionsproteine, die gebildet werden, gelangen in den Zellkern und binden an die LexA-Operatorsequenzen zwischen UAS_{GAL} und dem lacZ-Gen und behindern dessen Aktivierung von der UAS_{GAL} (Repression). Die β -Galaktosidaseaktivität wird um den Faktor 3 bis 20 reprimiert. Auf Medium, das Glukose als Kohlenstoffquelle enthält, sollten Hefen, die pJK101 enthalten, sehr viel langsamer blau werden, da die endogene GAL4-Transkription/Translation durch Glukose reprimiert wird.

Glu/CM -Ura Selektionsplatten

Glu/CM -Ura,-His Selektionsplatten

Glu/CM -Ura,-His XGal-Platten

Glu/CM -Ura XGal-Platten

Gal/Raf/CM -Ura,-His XGal-Platten

Gal/Raf/CM -Ura XGal-Platten

EGY48 wurde mit folgenden Kombinationen von Plasmiden transformiert:

| | | |
|-----------------|---|--|
| „Köder“-Plasmid | + | pJK101 (Test) |
| pRFHM1 | + | pJK101 (Positivkontrolle für Repression) |
| pSH17-4 | + | pJK101 (Negativkontrolle für Repression) |
| pJK101 | | allein (Negativkontrolle für Repression) |

Die Transformationen wurden auf Glu/CM-Ura Selektionsplatten bzw. auf Glu/CM-Ura,-His Selektionsplatten ausplattiert und bei 30°C 2 bis 3 Tage inkubiert bis Kolonien erschienen. Diese wurden auf den entsprechenden Platten ausgestrichen und über Nacht bei 30°C inkubiert. Die β -Galaktosidaseaktivität wurde durch einen Plattentest überprüft. Dazu wurden

die Kolonien auf Gal/Raff/CM-Ura,-His XGal-Platten bzw. auf Gal/Raff/CM-Ura XGal-Platten und auf Glu/CM-Ura,-His XGal-Platten und Glu/CM-Ura XGal-Platten ausgestrichen und bei 30°C inkubiert. Die Farbentwicklung wurde über mehrere Tage beobachtet und protokolliert.

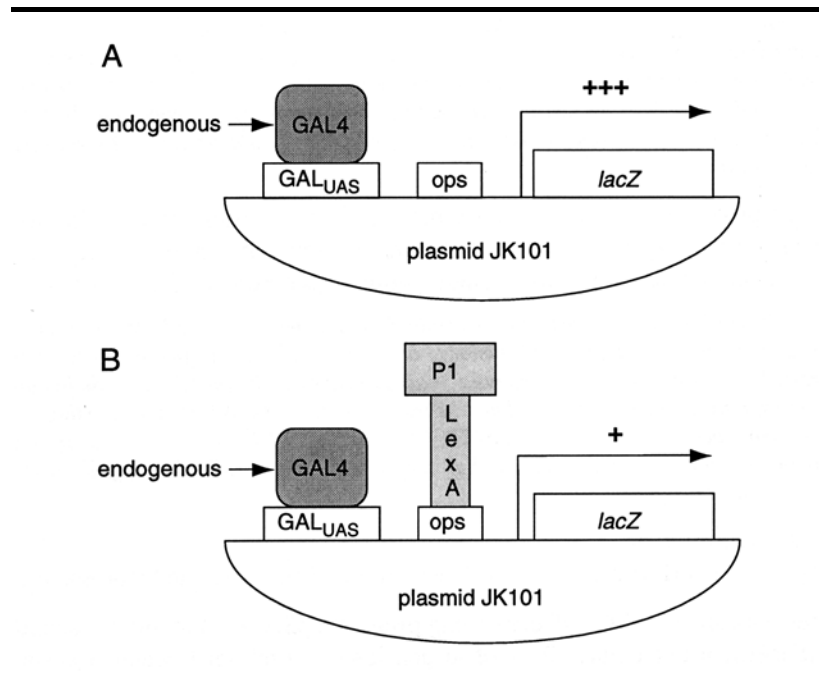


Abb. 11 „Repression assay“ zum Nachweis der DNA-Bindung des Fusionsproteins.

- (A) Aufgrund der Bindung von endogenem GAL4 an die GAL_{UAS} zeigen Hefen, die pJK101 enthalten und mit Galaktose als einziger Kohlenstoffquelle gezogen werden signifikant hohe β -Galaktosidaseaktivität.
- (B) LexA-Fusionsproteine (P1-LexA), die synthetisiert werden, gelangen in den Kern, binden an die LexA-Operator Sequenzen (ops), blockieren die Aktivierung durch die GAL_{UAS} und reprimieren so die β -Galaktosidaseaktivität um Faktor 3 bis 20.

3.2.5. Nachweis einer Interaktion zwischen „Köder“- und „Beute“-Fusionsprotein

3.2.5.1. Galaktose-induzierter, Glukose-reprimierter - Leu⁺-Phänotyp

Der Nachweis einer Interaktion zwischen „Köder“- und „Beute“-Fusionsprotein wird durch die Galaktose-abhängige Aktivierung des LEU2-Reporters geführt. Hefen, die also ein interagierendes Paar von Fusionsproteinen haben, können auf Leuzin-Defizienzmedium mit Galaktose als Kohlenstoffquelle wachsen, wogegen das Wachstum dieser Stämme auf Glukose-Nährmedium deutlich schwächer ist, weil die Transkription des „Beute“-Fusionsproteins durch Glukose reprimiert wird (das „Beute“-Fusionsprotein-Gen steht unter der Kontrolle des GAL1-Promotors, der durch Glukose reprimiert wird).

Ein Hefeklon, der eine „echte“ Interaktion zwischen „Beute“- und „Köder“-Fusionsprotein aufweist, wird auf Gal/Raff/CM -Ura,-His,-Trp,-Leu Selektionsplatten Wachstum zeigen, wogegen auf Glu/CM -Ura,-His,-Trp,-Leu Selektionsplatten das Wachstum im Vergleich deutlich reprimiert ist.

Glu/CM -Ura,-His,-Trp Flüssigmedium

Gal/Raff/CM -Ura,-His,-Trp Flüssigmedium

Glu/CM -Ura,-His,-Trp Selektionsplatten

Glu/CM -Ura,-His,-Trp,-Leu Selektionsplatten

Gal/Raff/CM -Ura,-His,-Trp,-Leu Selektionsplatten

Der Hefestamm EGY48 wurde nacheinander mit dem LacZ-Reporterplasmid pSH18-34, dem „Köder“- und dem „Beute“-Plasmid transformiert und anschließend auf Glu/CM -Ura,-His,-Trp Selektionsplatten ausplattiert und bei 30°C inkubiert bis Kolonien erschienen. Einzelne Kolonien wurden mit der Impföse abgenommen und damit eine Übernacht-Flüssigkultur in Glu/CM -Ura,-His,-Trp angelegt. Die Zellen wurden abzentrifugiert (10 min, 3000 rpm, RT) und in Gal/Raff/CM -Ura,-His,-Trp Flüssigmedium aufgenommen und 4 h bei 30°C geschüttelt. Dieser Schritt dient der Induktion der Synthese des „Beute“-Fusionsproteins und kann nicht ausgelassen werden. Die Hefen wurden abzentrifugiert (5 min, 3000 rpm, RT) und in H₂O aufgenommen. Die Zellen wurden anschließend auf Glu/CM -Ura,-His,-Trp,-Leu Selektionsplatten und Gal/Raff/CM -Ura,-His,-Trp,-Leu Selektionsplatten ausplattiert und bei 30°C 2 bis 5 Tage inkubiert bis Kolonien erschienen. Zur Bestätigung der Ergebnisse wurden Hefeklone von den Gal/Raff/CM -Ura,-His,-Trp,-Leu Selektionsplatten mit der Impföse abgenommen und erneut auf Glu/CM -Ura,-His,-Trp,-Leu Selektionsplatten und Gal/Raff/CM -Ura,-His,-Trp,-Leu Selektionsplatten ausgestrichen. Das Wachstum der Klone auf den verschiedenen Selektionsmedien wurde eine Woche lang jeden Tag kontrolliert und protokolliert.

3.2.5.2. LacZ-Expression

Zur Bestätigung der im Leuzin-Wachstumstest gewonnenen Daten wurde die Aktivierung des LacZ-Reporters in den entsprechenden Hefeklonen untersucht. Hefestämme, die eine echte Interaktion zwischen Köder und Beuteprotein zeigen, sollten in diesem Test eine durch Galaktose induzierbare, durch Glukose reprimierbare β -Galaktosidase-Aktivität zeigen.

| | |
|--------------------|----------------------------------|
| Flüssigmedium: | Glu/CM -Ura,-His,-Trp |
| Selektionsplatten: | Glu/CM -Ura,-His,-Trp X-Gal |
| Selektionsplatten: | Gal/Raff/CM -Ura,-His,-Trp X-Gal |

Die zu testenden Hefestämme EGY48/pSH18-34/bait/prey wurden in Gal/Raff/CM -Ura,-His,-Trp Flüssigmedium zwei Tage lang bei 30°C geschüttelt. Die Hefen wurden abzentrifugiert (5 min, 3000 rpm, RT) und zweimal mit H₂O gewaschen. Die Zellen wurden in einer geringen Menge H₂O resuspendiert und auf Glu/CM -Ura,-His,-Trp X-Gal- und Gal/Raff/CM -Ura,-His,-Trp X-Gal Platten aufgetropft. Die Blaufärbung der Kolonien wurde über eine Woche hinweg beobachtet und protokolliert.

3.2.5.3. EGFP/RFP-Expression

Mit neu entwickelten Reporter Plasmiden (siehe Ergebnisteil) wurde ein Interaktion von „Köder“- und „Beute“-Proteinen über die Expression von „enhanced green fluorescent protein“ (EGFP, Clontech) und „red fluorescent protein“ (RFP, Clontech) nachgewiesen und quantifiziert.

| | |
|----------------|----------------------------|
| Flüssigmedium: | Gal/Raff/CM -Ura,-His,-Trp |
|----------------|----------------------------|

EGY48 Hefestämme, die mit den Reporterplasmiden p8op-EGFP oder p8op-RFP und einer bait/prey Kombination transformiert waren, wurden in Gal/Raff/CM -Ura,-His,-Trp Flüssigmedium über Nacht bei 30°C geschüttelt. Die Hefezellen wurden abzentrifugiert (5 min, 3000 rpm, RT) und in frischem Gal/Raff/CM -Ura,-His,-Trp Flüssigmedium auf eine OD₆₀₀ von 0,1 verdünnt. Anschließend wurden die Zellen bei 30°C auf einem Schüttler so lange inkubiert, bis sie eine OD₆₀₀ von 1,0 aufwiesen. Je 100 µl Hefesuspension wurde in einen Reaktionsraum einer schwarzen 384-well-Plate (Nunc) pipettiert. Die relative Fluoreszenz wurde durch Messung mit einem Fluorocan Ascent Fluoreszenz Messgeräts bestimmt. Für RFP wurde ein Anregungsfilter mit 510 nm und ein Emissionsfilter mit 590 nm verwendet, für EGFP ein Anregungsfilter mit 485 nm und ein Emissionsfilter mit 520 nm.

3.2.6. „Screening“ einer Two-Hybrid-Bibliothek („Interactor hunt“)

Eine Two-Hybrid-Screening-Prozedur besteht aus zwei großen Ausplattierungen von Hefezellen, die LexA fusionierte „Köder“- , LacZ-Reporter- und pJG4-5 Bibliotheksplasmide enthalten, deren cDNA-Sequenzen unter der Kontrolle des GAL Promotors stehen. Bei der ersten Ausplattierung wurden die Hefeklonen auf Glu/CM -Ura,-His,-Trp Selektionsplatten ausgestrichen, um auf das Bibliotheksplasmid zu selektionieren. In der zweiten Ausplattierung - hier wurde nach Hefen gescreent, die interagierende Proteine enthielten - wurde eine Suspension der primären Transformanden auf Gal/Raff/CM -Ura,-His,-Trp,-Leu Selektionsplatten ausgestrichen. Hefeklonen, die in diesem Test als positiv identifiziert wurden, wurden auf LacZ-Expression getestet. Bibliotheksplasmide von Hefeklonen, die in der zweiten Runde identifiziert wurden, wurden isoliert und identifiziert.

Transformation der cDNA-Bibliotheksplasmide

Die Bibliotheksplasmide wurden durch eine Hocheffizienz-Transformation (3.2.2.) in den Hefestamm EGY48 transformiert.

Selektionsplatten (15 cm): Glu/CM -Ura,-His,-Trp

Die Hefezellen wurden auf Glu/CM -Ura,-His,-Trp Selektionsplatten ausplattiert und 3 bis 4 Tage bei 30°C inkubiert, bis Kolonien gut sichtbar waren (0,5 - 2 mm).

Herstellung einer Suspension der primären Transformanden

In diesem Arbeitsschritt wurde eine Aufschlämmung erzeugt, in der die Zellen der primären Transformanden homogen gemischt wurden. Diese Suspension wurde anschließend zur Selektion interagierender Proteine benutzt.

Gal/Raff/CM -Ura,-His,-Trp,-Leu Selektionsplatten

Die Agarplatten mit den primären Transformanden wurden mehrere Stunden bei 4°C im Kühlschrank vorgekühlt. Auf jede 15-cm-Platte wurden 5 ml H₂O pipettiert und die Hefekolonien mit Hilfe eines sterilen Glasobjektträgers (mit geschliffenen Kanten) abgeschabt. Die Hefezellen wurden in ein 50 ml Kulturgefäß überführt und durch Invertieren vollständig resuspendiert. Im Anschluß wurden die Zellen abzentrifugiert (5 min, 3000 rpm, 4°C), der Überstand dekantiert und die Zellen 2x mit ca. 40 ml H₂O gewaschen. Die Zellen

wurden anschließend sofort auf Gal/Raff/CM -Ura,-His,-Trp,-Leu Selektionsplatten (15 cm Ø) ausplattiert. Für jedes µg eingesetztes Bibliotheksplasmid wurde eine Platte verwendet. Die Platten wurden 2 - 5 Tage bei 30°C inkubiert bis Kolonien erschienen. Geeignete Kolonien wurden mit einer Impföse gepickt und auf einer Gal/Raff/CM -Ura,-His,-Trp,-Leu Selektions-Stammplatte ausgestrichen und 2 bis 3 Tage bei 30°C inkubiert.

Überprüfung der Interaktion

Die folgenden Tests (Galaktoseabhängigkeit des Leu+- und LacZ-Phänotyps) wurden durchgeführt, um zu bestätigen, dass diese Eigenschaften von der Expression eines Proteins abhängig sind, das durch ein Bibliotheksplasmid kodiert wird.

Von der Stammplatte wurden die zu testenden Hefeklone mit einer Impföse gepickt und auf einer Glu/CM -Ura, -His, -Trp Selektionsplatte ausgestrichen und über Nacht bei 30°C inkubiert. Die Klone wurden auf folgenden Selektionsplatten ausgestrichen:

- Glu/CM -Ura,-His,-Trp Xgal
- Gal/Raf/CM -Ura,-His,-Trp Xgal
- Glu/CM -Ura,-His,-Trp,-Leu
- Gal/Raf/CM -Ura,-His,-Trp,-Leu

Das Wachstum und die Farbentwicklung der Kolonien wurde über mehrere Tage hinweg beobachtet und protokolliert. Klone, die einen durch Galaktose induzierbaren Leu+- bzw. LacZ-Phänotyp zeigten, wurden weiter analysiert.

Isolierung von „Beute“-Plasmiden aus Hefezellen durch Transfer in *E.coli*

Hefe-Plasmid-DNA wurde mit diesem Protokoll zusammen mit chromosomaler DNA isoliert. Der isolierte Überstand wurde direkt in kompetente *E.coli* KC8-Zellen transformiert. Kolonien, die aus dieser Transformation hervorgingen, wurden auf M9-Minimal-Amp-Platten ausgestrichen. Diese Platten enthalten kein Tryptophan. Bakterienklone, die das Bibliotheksplasmid enthalten, können auf diesen Platten wachsen und sind so gut von Kolonien zu unterscheiden, die Köder oder Reporterplasmide enthalten.

| | |
|--|--|
| Glu/CM -Trp | Flüssigmedium |
| Breaking buffer | 2% Triton X-100, 1% SDS, 100 mM NaCl, 10 mM Tris-Cl, pH 8,0, 1 mM EDTA, pH 8,0, Lagerung bei RT |
| PCIA-Lösung | |
| 0,5 mm-Glaskügelchen, autoklaviert | |
| 3 M Natriumacetat | |
| Elektrokompetente <i>E.coli</i> KC8 Zellen | |
| LB-Amp-Platten | |
| M9-Minimal-Platten (Amp.) | |

Eine 2 ml Glu/CM -Trp Flüssigkultur wurde in einem 15 ml Reaktionsgefäß mit den ausgewählten Hefeklonen aus dem Interaktionsscreen angeimpft und über Nacht bei 30°C geschüttelt. 1,5 ml dieser Kultur wurden in ein steriles Eppendorf Reaktionsgefäß überführt und abzentrifugiert (5 s, 13 000 rpm, RT). Der Überstand wurde dekantiert und das Hefepellet in 200 µl Breaking buffer durch Vortexen resuspendiert. In das Reaktionsgefäß wurden 4 Glaskügelchen und 200 µl PCIA Lösung gegeben, das Gefäß sorgfältig verschlossen und mindestens 2 min gevortext. Es folgte ein Zentrifugationsschritt (5 min, 13 000 rpm, RT). Anschließend wurde die obere wässrige Phase in ein frisches 1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt. Das Volumen wurde durch Pipettieren bestimmt und 1/10 Vol 3 M Natriumacetat und 2 Vol Ethanol zugegeben. Der Ansatz wurde 20 min auf Eis inkubiert und abzentrifugiert (15 min, 13 000 rpm, RT). Der Überstand wurde abgenommen und das Pellet mit 70% Ethanol gewaschen. Das Pellet wurde 2 min in der Lyophylle getrocknet und in 5 µl H₂O resuspendiert. 1 µl dieser Lösung wurde für die Elektroporation von elektrokompetenten *E.coli* KC8-Zellen verwendet (siehe 3.1.3). Die transformierten Bakterien wurden auf LB-Ampizillin-Platten ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert. 10 einzelne Kolonien von jeder Transformation wurden mit einer Impföse gepickt und auf M9-Minimal-Amp.-Platten ausgestrichen. Nach einer Inkubation über Nacht wurden Klone, die auf Minimalplatten gewachsen waren, gepickt und zur weiteren Analyse verwendet.

Analyse

Bibliotheksplasmide, die durch die oben beschriebene Prozedur identifiziert wurden, wurden über Plasmid-Minipräp (3.1.4.1) aufgereinigt und anschließend sequenziert (3.1.20).

3.3. Proteinbiochemische und immunologische Methoden

3.3.1. Immunoblotting („Western blotting“)

Herstellung eines Hefe-Proteinextrakts

Hefe-Selektionsmedium

Roti Load[®]-Probenpuffer

Der zu analysierende Hefestamm wurde im entsprechenden Flüssig-Selektionsmedium unter Selektion der relevanten Plasmide über Nacht bei 30°C im Rundschüttler bei 222 rpm angezogen. Von der Übernachtskultur wurde eine frische 5-ml-Kultur angelegt mit einer Start-OD₆₀₀ ~ 0,15 und bei 30°C bis zu einer OD₆₀₀ von 0,45 bis 0,7 geschüttelt. Im Anschluß wurden 1,5 ml in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt und abzentrifugiert (3 min, 13 000 rpm, RT). Der Überstand wurde vollständig abgenommen. Zum Hefe-Pellet wurden 50 µl Roti Load[®]-Probenpuffer hinzugegeben, der Ansatz gründlich gevortext und bei -70°C eingefroren, um die Hefen aufzubrechen. Die gefrorenen Proben wurden direkt in einen 100°C heißen Heizblock überführt und 5 min erhitzt, anschließend kurz zentrifugiert, um die großen Zellbestandteile zu sedimentieren.

Die Proben wurden für die SDS-PAGE eingesetzt.

Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford

Die Proteinkonzentration in einer wässrigen Lösung wurde nach der Methode von Bradford bestimmt (BRADFORD et al. 1976). Der Farbstoff Coomassie-Brilliant Blue G-250 bildet mit Proteinen in saurem Milieu Komplexe, wobei sich das Absorptionsmaximum des Farbstoffes von 465 auf 595 nm verschiebt. Diese Reaktion beruht auf ionischen und hydrophoben Wechselwirkungen zwischen dem Farbstoff und Arginin-Resten bzw. den N-terminalen Aminogruppen der gelösten Proteine. Die Farbentwicklung ist von der Temperatur und der Anwesenheit von Detergentien abhängig, wird aber durch die meisten Puffersubstanzen, Kationen, Kohlenhydrate oder reduzierende Substanzen kaum gestört. Die Methode ist sehr sensitiv und eignet sich gut zum Abschätzen kleiner Proteinmengen zwischen 0,02 und 0,5 mg/ml.

Bradford-Reagenz: 100 mg Coomassie-Brilliant Blue G-250, 50 ml 95% Ethanol, 100 ml 85% Phosphorsäure ad 1 l H₂O

100 µl einer Proteinlösung wurden mit 1 ml Bradford-Reagenz gemischt und 5 min bei RT im Dunkeln inkubiert. Die Extinktion wurde anschließend in Einmalküvetten bei 595 nm photometrisch bestimmt. Zur Bestimmung der Proteinkonzentration muß eine Eichgerade erstellt werden, als Standard diente Rinderserumalbumin (BSA).

SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

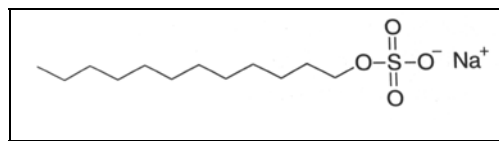


Abb. 12 SDS-Molekül

In diesem Elektrophoresesystem werden Proteine in Gegenwart eines Überschusses Natriumlaurylsulfat und Denaturierungsreagenzien (Mercaptoethanol reduziert Disulfidbrücken) elektrophoretisch aufgetrennt. Das negativ geladene SDS lagert sich dabei in konstanten Verhältnissen an die Proteine an und kompensiert mögliche positive Ladungen, so dass alle Proteine zur Anode wandern; die Eigenladung der Proteine kann somit vernachlässigt werden. Die Proteine werden gleichzeitig vollständig denaturiert und können so in einem geeigneten Gel mit der richtigen Porösität entsprechend ihrem Molekulargewicht wandern. Die Porengröße des Gels kann durch den Vernetzungsgrad der Polymere (durch die Menge des eingesetzten N,N'-Methylen-bisacrylamid) eingestellt werden. Große Proteine wandern relativ langsam durch das Polyacrylamid-Maschenwerk, kleinere entsprechend schneller. Das hier benutzte Gelsystem ist das **Laemmli-System**, bei dem die aufzutragenden Proben zuerst in einem Sammelgel konzentriert werden und anschließend in das eigentliche Trenngel einwandern (Laemmli, 1970). Das **Sammelgel** bewirkt eine Fokussierung der Proteinbanden, so dass die gesamte Proteinmenge einer Tasche gleichzeitig in das **Trenngel** einläuft. Der pH des Sammelgels entspricht dem IP von Glyzin. Dieses liegt daher als nach außen ungeladenes Zwitterion vor. Als negative Ladungsträger bleiben praktisch nur noch Chloridionen übrig. Das Sammelgel hat somit einen höheren elektrischen Widerstand als das Trenngel, in dem Glyzin als Glyzinat vorliegt.

Wegen $U = R \cdot I$ und $I = \text{konstant}$ ergibt sich ein besonders hoher Spannungsabfall und damit eine hohe lokale Feldstärke im Sammelgel. Die Proteine können somit im Sammelgel

schneller wandern, als im Trenngel. Dieser Effekt wird durch den geringen Bisacrylamidanteil im Sammelgel unterstützt. Die Proteine werden so zunächst auf der Trennlinie zwischen Sammel- und Trenngel konzentriert, bevor sie in das Trenngel eintreten. Als **Marker** wurden Mischungen von Proteinen mit bekannter Molmasse als Eichsubstanzen verwendet. Diese wurden mit den Proben auf das Gel aufgetragen. Die Molmasse eines unbekanntes Proteins kann so relativ genau bestimmt werden.

Lösung A: 30 % Acrylamid, 0,8 % Bisacrylamid (gebrauchsfertig von Applichem)

Lösung B: 1,5 M Tris/HCl, pH 8,8

Lösung C: 10% SDS

Lösung D: 0,5 M Tris/HCl, pH 6,8

Lösung F: 0,1 g/ml Ammoniumperoxidsulfat (immer frisch ansetzen!)

TEMED (Roth)

Probenpuffer: Rotiload (Roth)

Laufpuffer: Für 1 L : 6 g TRIS, 28,8 g Glycin, 1 g SDS pH 8,3 - 8,5

Für die Gelelektrophorese wurde das System „MiniProtean II“ der Firma Biorad verwendet. Das System beinhaltet einen sogenannten Casting Stand, in dem das Gel gegossen werden kann, ohne dass man vorher die Glasplatten, zwischen die das Gel gegossen wird, abdichten muß. Die Glasplatten wurden mit den „Spacern“ fest in eine Halterung geschraubt. Diese Halterung wurde dann in den „Casting Stand“ eingespannt. Die Unterseite der Glasplatten wurde nun so auf einen flexiblen Untergrund gedrückt, so dass bei korrektem Aufbau nichts auslaufen kann. Vor dem Gießen des Gels wurde die Apparatur aufgebaut und die Höhe des Trenngels auf den Glasplatten markiert. Das Trenngel sollte so hoch sein, dass unter den Enden des Kammes noch etwa 0,5 bis 1 cm Sammelgel Platz haben. Dann wurden die Lösungen, je nach gewünschter Trenngel-Konzentration, zusammenpipettiert. Die angegebenen Mengen sind ausreichend für 2 Minigele:

| | 8% | 10 % | 12 % |
|-----------------------|-----------|-------------|-------------|
| Lösung A | 2,0 ml | 2,5 ml | 3,125 ml |
| Lösung B | 5,0 ml | 5,0 ml | 5,0 ml |
| Lösung C | 100 µl | 100 µl | 100 µl |
| Lösung F | 100 µl | 100 µl | 100 µl |
| TEMED | 10 µl | 10 µl | 10 µl |
| H₂O | 2,8 ml | 2,3 ml | 1,665 ml |

Die Lösungen wurden in ein Plastikröhrchen pipettiert, wobei zuletzt APS und TEMED zugegeben wurden, welche die Polymerisation starten. Die Gellösung wurde durchmischt und mit einer Pasteurpipette etwa 4 mm bis über die Markierung für die Höhe des Trenngels gegossen. Danach wurde sofort mit destilliertem Wasser überschichtet, da die Polymerisation am besten unter Luftabschluß abläuft. Das Trenngel sollte vor dem Gießen des Sammelgels etwa 30 min polymerisieren. Nach Ablauf der 30 min wurde das Wasser mit Hilfe einer Wasserstrahlpumpe abgesaugt und das Sammelgel (6%) konnte vorbereitet werden.

| | |
|-----------------------|---------|
| Lösung A | 1,5 ml |
| Lösung D | 2,55 ml |
| Lösung C | 100 µl |
| Lösung F | 100 µl |
| TEMED | 10 µl |
| H₂O | 5,8 ml |

Das Sammelgel wurde mit einer Pasteurpipette auf das Trenngel gegossen und dann der Kamm eingesetzt. Luftblasen in den Geltaschen wurden durch Rütteln am Kamm entfernt. Sollen besonders große Probenmengen aufgetragen werden, so empfiehlt es sich, die doppelte Menge von APS und TEMED zu verwenden, da sich stabilere Taschen ergeben, die bis oben

befüllt werden können. Das Gel konnte nach ca. 30 min beladen werden, oder, um eine bessere Trennschärfe zu erreichen, mehrere Stunden bei 4°C aufbewahrt werden. Vor dem Beladen wurde der Kamm entfernt und die Taschen mit Laufpuffer ausgespült, um Gelreste zu entfernen. Als Größenstandard wurde teils ein vorgefärbter „broad range“-Marker, teils „low“- und „high-range“-Marker der Firma BioRad verwendet.. Die Proben wurden mit 1 Vol. 2x Roti Load[®]-Probenpuffer gemischt, 5 min bei 95°C denaturiert, kurz abzentrifugiert und in die Taschen aufgetragen. Die Gelelektrophorese erfolgte für 2 bis 2,5 h bei 100 V (U konstant). Danach wurde das Gel entweder mit Coomassie gefärbt oder geblottet.

Coomassie-Färbung von Proteingelen

Diese Methode beruht auf der Bindung des Farbstoffs Coomassie-Brilliant-Blue an Proteine. Es können Banden ab ungefähr 0,5 µg sichtbar gemacht werden.

| | |
|-----------------|--|
| Entfärbelösung: | 100 ml Eisessig, 450 ml Methanol technisch, 450 ml H ₂ O |
| Färbelösung: | 1,25 g Coomassie Brilliant Blue R-250, 225 ml Methanol technisch, 225 ml H ₂ O, 50 ml Eisessig |

Das Gel wurde 30 min in Entfärbelösung auf dem Kippschüttler geschüttelt, anschließend 1 h in Färbelösung. Das Entfärben erfolgte durch langsames Schütteln in Entfärbelösung. Die Lösung wurde mehrmals gewechselt. Alternativ wurde auch über Nacht in 50% Entfärbelösung entfärbt. Wenn das Gel zu stark geschrumpft war, wurde es durch Schütteln in Wasser wieder vergrößert. Das Gel wurde auf Whatman-Papier überführt und auf dem Gelrockner bei 80°C unter Vakuum getrocknet.

„Western blotting“ (Proteintransfer auf eine Membran)

| | |
|---|------------------------------------|
| Blottingpuffer: | 50 mM CAPS, 10 % Methanol; pH 10 |
| TBS: | 150 mM NaCl, 10 mM Tris-Cl, pH 7,4 |
| TBST: | TBS + 0,1 % Tween |
| 10 % Milchpulver in TBS/TBST pH 7,4-7,6 | |
| Ponceau-S | (Sigma) |

Nachdem die Lauffront des Gels bis kurz vor das Ende gelaufen war, wurde die Elektrophorese gestoppt und das Gel abgebaut. Das Sammelgel wurde mit Hilfe eines Spatels entfernt und entsorgt. Das Gel wurde nun 5-10 min in Blottingpuffer inkubiert. Währenddessen konnten Nitrozellulose und Whatmanpapier mit Hilfe einer Schablone auf Gelgröße zugeschnitten werden. Der Western-Blot wurde im Mini-TransBlot System der Firma BioRad durchgeführt. Es können 2 Gele gleichzeitig geblottet werden. Die folgende Grafik zeigt den Aufbau eines Blot-Sandwichs für einen Transfer in der Mini-TransBlot Kammer:

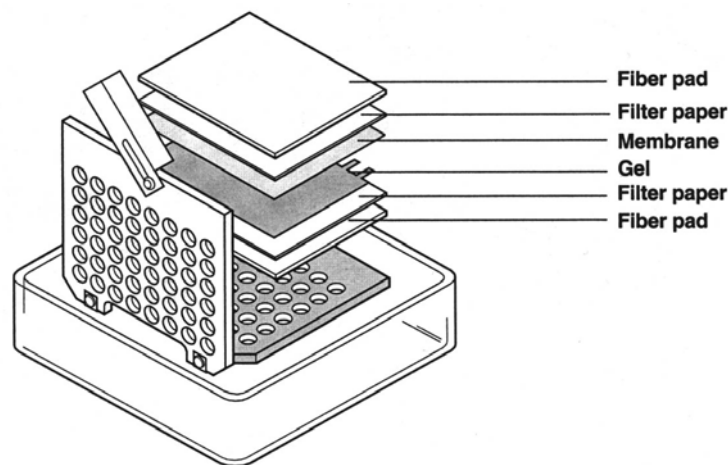


Abb. 13 Aufbau des Western-Blots

Filterpapier und Nitrozellulose wurden mit Blottingpuffer getränkt, dann wurde der Blot wie abgebildet aufgebaut. Das Gel wurde verkehrt herum auf das untere Whatman gelegt, damit die Reihenfolge der Banden im Blot anschließend der auf dem Gel entspricht. Luftblasen wurden mit Hilfe eines Corex-Röhrchens aus dem Aufbau gedrückt. Das Sandwich wurde zusammen mit einem Kühlakku in die Blotkammer gegeben (Orientierung beachten!) und die Kammer mit Blottingpuffer gefüllt. Der Transfer erfolgte 30 - 45 min bei 50 V (U konstant)

und 170 mA. Danach wurde der Blot abgebaut und die Nitrozellulose gut mit H₂O gespült. Der Transfer wurde durch eine Färbung mit Ponceau-S überprüft. Dazu wurde der Blot in einer Glasküvette mit Ponceau-S bedeckt und kurz unter Schütteln inkubiert (1-2 min). Ungebundenes Ponceau S wurde mit Wasser abgespült. Die Markerbanden wurden mit einem weichen Bleistift markiert und der Blot in 10 % Milch pH 7,4 bis 7,6 entweder 1 h bei RT oder über Nacht bei 4°C abgesättigt.

Immundetektion und Farbreaktion mit alkalischer Phosphatase

| | |
|----------------------------|---|
| Blockpuffer: | 10 % (w/v) Magermilchpulver, 0,3 % (v/v) Tween 20 in TBS |
| TBS: | 10 mM Tris/HCl pH7,4, 140 mM NaCl, |
| TBS/1M NaCl | |
| TBS/1%BSA | |
| Entwicklungspuffer für AP: | 10 mM Tris/HCl, pH 9,5, 100 mM NaCl, 5 mM MgCl ₂ |
| NBT-Lösung: | 50 mg/ml in 70%DMF |
| BCIP-Lösung: | 50 mg/ml in DMF |

Die Nitrozellulosemembran wurde über Nacht bei 4°C in Blockpuffer geschwenkt und dann kurz in TBS gewaschen. Der erste Antikörper wurde in TBS/1%BSA verdünnt. Die Membran wurde 2-6 h bei RT oder über Nacht bei 4°C mit dem ersten Antikörper inkubiert. Anschließend wurde 3x 10 min in TBS, 20 min in TBS/1 M NaCl und wieder 3x 10 min in TBS gewaschen. Es folgte die Inkubation mit dem 2. Antikörper in TBS/1%BSA bei RT für 45 bis 60 min. Anschließend wurden die sieben Waschschritte von oben wiederholt. Für die Farbreaktion wurden 66 µl NBT- und 33 µl BCIP-Lösung mit 10 ml Entwicklungspuffer gemischt und die Nitrozellulose damit überschichtet. Es wurde bis zur gewünschten Signalintensität im Dunkeln entwickelt, dann wurde die Reaktion durch Waschen mit Leitungswasser abgebrochen.

3.3.2. Immunokopräzipitation

Protein-A-Sepharose CL-4B (Pharma Biotech, Freiburg)
PBS/0,05% Phenylthioharnstoff
Probenpuffer: Rotiload (Roth)

Protein-A-Sepharose CL-4B wurde in PBS gelöst, das resultierende Gel bei 1000 rpm abzentrifugiert und anschließend in einem Volumen PBS resuspendiert (=SL). Fettkörpergewebe von acht Tage alten *Calliphora* Larven wurde in PBS/0,05% Phenylthioharnstoff homogenisiert und 5 min bei 8 000 g, 4°C abzentrifugiert. Der Überstand wurde für die Immunokopräzipitation verwendet. 50 µl SL wurden in einem Eppendorf-Reaktionsgefäß mit 5µg Antikörper bei 4°C 4h lang inkubiert. Anschließend wurden 500 µl Überstand der Homogenisierung dazugegeben und über Nacht bei 4°C inkubiert. Das Inkubationsgemisch wurde abzentrifugiert (1000 rpm, 4°C) und acht mal mit 500 µl PBS gewaschen. Das verbleibende Pellet wurde in 30 µl RotiLoad aufgenommen, 2 min bei 95°C erhitzt und abzentrifugiert. 15 µl Überstand wurden für einen Western-Blot verwendet (siehe 3.3.1.)

3.3.3. Immunolokalisation an ganzen *Galleria* Gehirnen

Mit diesem Protokoll wurden Immunofluoreszenzen von Gehirnen und anderen Geweben angefertigt.

| | |
|---------|---|
| 10x PBS | 12,46 g Na ₂ PO ₄ , 4,68 g NaH ₂ PO ₄ , 75,97 g NaCl, pH 7,4 |
| PAT 0,5 | 1x PBS, 1% BSA, 0,5% Triton X-100 |
| 2% FA | 0,5 g PFA, 9 ml H ₂ O, vortexen, auf 60°C erhitzen, Zugabe 50 µl 1 N NaOH, abkühlen, 12,5 ml 1/15 M Na ₂ HPO ₄ , mit 1/15 M KH ₂ PO ₄ auf pH 7,4 einstellen. |

Die Gewebe wurden in ungepufferter Insektensaline präpariert und in 2% FA über Nacht auf einem Kippschüttler bei 4°C fixiert. Es wurde 3x 20 min bei RT in PAT 0,5 gewaschen und anschließend 2 h mit 3% Ziegen Serum in PAT 0,5 bei RT geblockt. Es wurde 3x 20 min bei RT in PAT 0,5 gewaschen. Der primäre Antikörper wurde in PAT 0,5 verdünnt und die Proben über Nacht bei 4°C inkubiert. Im Anschluß wurde 3x 1 h bei RT in PAT 0,5 gewaschen. Der Zweitantikörper wurde in PAT 0,5 verdünnt, die Inkubation erfolgte über Nacht bei 4°C. Die Proben wurden 3x 1 h bei RT in PAT 0,5 gewaschen, auf einen Objektträger transferiert und unter dem Fluoreszenzmikroskop ausgewertet und fotografiert.

3.3.4. Immunolokalisation an Gefrierschnittenschnitten

Anfertigen von Gefrierschnitten aus *Galleria* Puppen- bzw. Larvenköpfen

| | |
|-------------------|--|
| 10x PBS | 70 mM Na ₂ HPO ₄ , 30 mM NaH ₂ PO ₄ , 1,3 M NaCl, pH 7,4 |
| Fixierlösung | 4% PFA in 1x PBS |
| Drosophila Ringer | 7,48 g NaCl, 0,35 g KCl, 0,2 g CaCl ₂ , 0,105 g NaH ₂ PO ₄ , 0,048 g KH ₂ PO ₄ , pH 7,4 |
| Saccharose Ringer | 25% Saccharose in Drosophila Ringer |

Die Larven- bzw. Puppenköpfe mit Teilen des Thorax wurden bei 4°C 3 h in Fixierlösung inkubiert. Anschließend wurden die Präparate über Nacht in Saccharose Ringer aufgeweicht. Die Präparate wurden in Tissuetec-Parafin eingebettet, auf einem Objektisch ausgerichtet und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. 20 µm Gefrierschnitte wurden mit einem Kryostat angefertigt und auf mit Gelatine beschichteten Objektträgern aufgenommen. Die Schnitte wurden bei -20°C gelagert.

Immunfluoreszenz

| | |
|--------------------------------|-----------------------------------|
| PAT 0,5 | 1x PBS, 1% BSA, 0,5% Triton X-100 |
| Blockierungs Lösung | 3% Ziegen Serum in PAT 0,5 |
| DD`s Fluoreszenz Eindeckmittel | |

Die Schnitte wurden 30 min bei RT aufgetaut und 2 h bei RT mit Blockierungslösung überschichtet. Die Blockierungslösung wurde entfernt und durch verdünnte Erstantikörperlösung (Erstantikörper in PAT 0,5) ersetzt. Es wurde über Nacht bei 4°C in einer feuchten Kammer inkubiert. Anschließend wurde 3x mit 1x PBS gewaschen. Der in PAT 0,5 verdünnte Zweitantikörper wurde aufgetropft und 2 h bei RT inkubiert. Es folgten drei Waschschrte in 1x PBS. Die Schnitte wurden mit DD`s-Fluoreszenz-Eindeckmittel eingedeckelt und unter dem Fluoreszenzmikroskop ausgewertet.

4. ERGEBNISSE

4.1. Suche nach allatotropen Substanzen im Hirn von *Galleria mellonella*

Für die Suche nach einem larvalen Allatotropin wurden Antikörper eingesetzt, die gegen eine allatotrope Fraktion aus Gehirnen von *Galleria* gerichtet sind (Bogus and Scheller, 1996). Diese Antikörper wurden für ein Immunoscreening verwendet.

4.1.1. Herstellung einer *Galleria*-„cooled brain“-Phagen-Bibliothek

Werden frisch geschlüpfte Letztlarven von *Galleria* einem Kälteschock ausgesetzt, reagieren die Tiere mit einer Aktivierung der *Corpora allata*. Das hat eine Ausschüttung von Juvenilhormon und daraus resultierend eine zusätzliche Larvalhäutung und die Bildung einer „Superlarve“ zur Folge. Dieser Effekt wird auf die vermehrte Produktion bzw. Ausschüttung eines allatotropen Faktors zurückgeführt. Für die Suche nach einem larvalen Allatotropin wurde eine Expressionsbibliothek aus Gehirnen von Tieren hergestellt, die mit einem Kälteschock behandelt wurden.

Als Ausgangsmaterial für die „cooled brain“-Bibliothek wurden 100 Hirne von frisch geschlüpfen Letztlarven 2 bis 20 h nach einem Kälteschock (2h, Eiswasser) präpariert und gesamt-RNA mit der Trizol-Methode isoliert (siehe 3.1.15).

Die cDNA-Expressionsbibliothek wurde mit dem SMART III-cDNA-Library-Construction Kit (Clontech) hergestellt (siehe 3.1.17.).

Der Titer der fertigen Library betrug $3,7 \times 10^6$ pfu/ml, die durchschnittliche Größe der Inserts betrug ca. 1,2 kbp. 99% der Phagen waren rekombinant.

4.1.2. Immunoscreening der Bibliothek mit α -Allatotropin Antikörpern

Vier monoklonale Antikörper (Maus, Hybridomaüberstände), die gegen eine allatotrope Fraktion aus *Galleria* Gehirnen gerichtet sind (Bogus and Scheller, 1996) wurden verwendet, um die λ -cDNA-Expressionsbibliothek zu screenen (siehe 3.3.4.). Es wurde eine Mischung aus allen vier Antikörpern verwendet:

| | | | |
|-------|------|---|-----------|
| AF3 | 2 ml | | |
| AF43 | 2 ml | | |
| AF137 | 2 ml | | |
| AF139 | 2 ml | + | 4 ml TBST |

Zwölf positive Plaques wurden isoliert und in einer zweiten Runde nochmals analysiert. Mit sechs positiven Phagenklonen wurde eine *in vivo* Exzision durchgeführt (siehe 3.1.19). Die gewonnenen Plasmide wurden in XL1-Blue-Zellen vermehrt und von beiden Enden her sequenziert (Primer S1, S2).

Die gefundenen cDNA-Sequenzen wurden mit der BlastX-Software analysiert.

| Klon Nr. | höchste Identität |
|-------------|--|
| IH01 | 88% Identität mit einem Typ I-Serin-Threonin-Kinase-Rezeptor aus <i>Rattus norvegicus</i> (Genbank-Zugriffsnummer I53417) |
| IH02 | 99% Identität mit Immunophilin-FκB-binding-protein-12 aus <i>Rattus norvegicus</i> (Genbank-Zugriffsnummer AAB48933) |
| IH03 | 100% Identität mit Gallerin aus <i>Galleria mellonella</i> (Genbank-Zugriffsnummer AAA85089) |
| IH04 | kein ORF |
| IH05 | kein ORF |
| IH06 | 88% Identität mit Corazonin-Vorläuferpeptid aus <i>Drosophila melanogaster</i> (Genbank-Zugriffsnummer Q26377) |

Tab. 1 Ergebnisse des Immunoscreenings mit anti-ATTH-Antikörpern, angegeben ist die prozentuale Identität auf AS-Ebene zwischen der translatierten cDNA und dem gefundenen homologen Protein.

- Die analysierten Klone **IH04** und **IH05** enthalten nur kurze cDNA-Inserts (ca. 300 bp) mit einem polyA-Schwanz. Sie enthalten keine ORF mit Homologie zu bekannten Proteinen und stellen mit hoher Wahrscheinlichkeit 3'-untranslatierte Bereiche dar.
- Der Klon **IH01** weist eine hohe Identität auf AS Ebene mit einem Typ I Serin-Threonin-Kinase-Rezeptor der Ratte auf. Ein *Drosophila*-Homolog dieses Proteins ist auch bekannt („babo“-Genprodukt, Genbank-Zugriffsnummer AAF59011). Diese membranständigen Rezeptoren binden TGFβ.
- Die abgeleitete Aminosäuresequenz des cDNA-Klons **IH02** entspricht einem FκB-binding protein-12 aus *Rattus norvegicus*. Ein *Drosophila*-Homolog ist bekannt: FK506-bp2. Es kodiert für eine Peptidylprolyl-Isomerase, die vermutlich eine Komponente des endoplasmatischen Retikulums ist und bei der Faltung von Proteinen eine Rolle spielt.
- Der cDNA-Klon **IH03** ist identisch mit dem Insekticyanin Gallerin aus der Wachmotte. Dieses Protein gehört zu der großen Gruppe der Lipocaline, kleiner, sekretierter Proteine, denen eine Vielzahl von Funktionen zugeschrieben wird (Flower, 1996). Da Gallerin ein

Produkt des Fettkörpers ist (Sehnal, mündliche Mitteilung) stellt es mit hoher Wahrscheinlichkeit kein Allatotropin dar.

- Der Klon **IH05** enthält die kodierende cDNA-Sequenz für das Neuropeptid Corazonin. Die Funktion dieses Peptids ist noch weitgehend unbekannt. Bekannt ist die cardioaktivierende Wirkung bei Schaben (Veenstra, 1989), und ein Einfluß auf die Farbentwicklung bei Heuschrecken (Tawfik et al., 1999).

Zusammenfassung: Die isolierten cDNA-Klone IH04 und IH05 besitzen kein offenes Leseraster. Die cDNA-Klone IH01, 02 und 03 kodieren für bekannte Proteine, die aufgrund ihrer Eigenschaften (Lokalisation und Funktion) als allatotroper Faktor nicht in Frage kommen. Aufgrund der vorhandenen Daten stellte Corazonin einen interessanten Kandidaten für ein Allatotropin dar. Die Expression des Corazonin-Gens (CRZ) und die Lokalisation des Peptids wurden deshalb weiter untersucht.

4.1.3. Die Corazonin-cDNA

Die Corazonin-cDNA wurde vollständig sequenziert (Primer S3, S4, S5). Die Sequenz wurde unter der Genbank-Zugriffsnummer AAF87082 veröffentlicht.

Die cDNA hat eine Länge von 948 bp. Nach dem erstem möglichen Start-Codon folgt eine offenes Leseraster (ORF), das ein 110 AS langes Vorläuferpeptid kodiert.

Die ersten 19 AS stellen ein typisches Signalpeptid dar mit einer Reihe hydrophober Aminosäuren. Eine basische Aminosäure nahe dem N-Terminus, typisch für Signalpeptide, fehlt.

Es folgt die Sequenz: Gln-Thr-Phe-Tyr-Ser-Arg-Gly-Trp-Thr-Asn-Gly gefolgt von einem Paar dibasischer Aminosäuren.

Das 80 AS lange C-terminale Peptid („corazonin precursor related peptide“, CPRP) weist keine Ähnlichkeit zu bekannten Peptiden in den öffentlichen Datenbanken auf.

```

001          TAGTCAACGATTGCTCCTTTGAACGTTAATACAGGATCGGGTTCGAA
048 CTTAAAATAATAAGGGTTCGATATTCGAAATTTAAAAGTTTTATTTTTATCGACAGC
105 CAGTGAGTGGATTAGTGACATTAATAAAAAGTTATCGCATCACAAAACAGTTATCAAA

162 ATGGCGACGAATATAACTATGTTTTTAAATCGTCATTACCCTCACGTCAGTAGCAGCG
MetAlaThrAsnIleThrMetPheLeuIleValIleThrLeuThrSerValAlaAla
    <-----SP----->
    -19                                                    -1
219 CAGACCTTCCAGTACTCTAGGGGATGGACGAACGGTAAAAGAGACGGCCACAAGACA
GlnThrPheGlnTyrSerArgGlyTrpThrAsnGlyLysArgAspGlyHisLysThr
    <-----Corazonin-----> <----->
    1                11                1
276 GAAGATATTAGAGATCTTACCAACAACCTGGAAAGGATCTTGAGCCCATGTCAGATG
GluAspIleArgAspLeuThrAsnAsnLeuGluArgIleLeuSerProCysGlnMet
    -----CPRP-----

333 AACAAACTCAAATATGTGCTCGAAGGGAAACCTTTGAATGAAAGGTTACTCGGTCCC
AsnLysLeuLysTyrValLeuGluGlyLysProLeuAsnGluArgLeuLeuGlyPro

390 TGCGATACATCGAAGACGAGGTCGACAACCAACCCAAGCGATACAAACACGAGCGCA
CysAspThrSerLysThrArgSerThrThrAsnProSerAspThrAsnThrSerAla

444 GTCAAGACACCTTGTTTCGACGCATTTCAATAAACATTGCTATTCTTTTAGTTATTAA
ValLysThrProCysSerThrHisPheAsnLysHisCysTyrSerPheSerTyrEnd
    ----->80

504 AAAAAATGTGCCAAAGAAAATTTGACATTAAATATATTTATTATTGTTACTTCATATA
561 CCATCTTCGGTAACCGTATTTGGTACCTATTATTATATAAATAAAGTTCAATTTTCAT
618 AGGTGTTGTTCAATGCATAATTCGGCTGGATTTATGCATTGGTAAATTTTAAATGC
675 CTATGTATTGAATAATAAAAAAGTAAAGAAAAAATCTAATATTTTGAACAGTTAAA
732 AGTCATGTGGTGTGATTTTCGATATATATTATTATTGATCTTAGATTAATTAAATTGG
789 TCACGAAATGAGTAATGTATATGTCAAATAAAAAAATAATGAAAATTATATAAAAT
846 GTAAAAGTGCATTTTGAATGTTGACAACAATGTTGTATTGTACTATAATTATTTA
903 AATATTATTGATGATTAATCCTTCAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA          948

```

Abb. 14 Die Nukleotid- und daraus abgeleitete Aminosäuresequenz des Corazonins von *Galleria mellonella*. Die Sequenzen des Signalpeptids, des Corazonins und eines Corazonin-precursor-related peptide (CPRP) sind unterstrichen. Die mögliche dibasische proteolytische Spaltstelle ist kursiv markiert, das mögliche Polyadenylierungssignal ist fett gedruckt.

4.1.4. Vergleich der abgeleiteten Aminosäuresequenz des Arg⁷-Corazonin-Präprohormons von *Galleria mellonella* mit dem von *Drosophila melanogaster*

Abb. 15 zeigt einen Vergleich der Aminosäuresequenzen der beiden bekannten Corazonin-Präprohormone von *G. mellonella* (Genbank-Zugriffsnummer AAF87082) und *D. melanogaster* (Genbank-Zugriffsnummer JC2384, Veenstra, 1994) erstellt mit ClustalW.

```

Gm  MATNITMFLIVITLTSVAAQTFQYSRGWTNGKRDGHKTEDIRDLT
Dm  MLRLLLLLFLFLTLSCMGQTFQYSRGWTNGKR SFNAASPL--LA

Gm  NNLERILSPQMNLKYVLEGGKPLNERLLGPCDTSKTRSTTNP
Dm  NGHLHRASELGLTDL-YDLQDWSSDRRLER

Gm  SDTNTSAVKTPCSTHFNKHCFYSFSY
    
```

Abb. 15 Sequenzvergleich der Corazonin Vorläuferpeptide von *G. mellonella* (Gm) und *D. melanogaster* (Dm)

Der Vergleich zeigt einen ähnlichen strukturellen Aufbau der Peptide. Beide bestehen aus einem 19 AS langen putativen Signalpeptid (19 AS), Arg⁷-Corazonin (11 AS), einem Gly, das für die C-terminale Amidierung des Peptids notwendig ist, einer Lys-Arg Spaltstelle, und einem „Corazonin-Precursor-related-Peptide“ (CPRP) von 80 AS bei *G. mellonella* und 39 AS bei *D. melanogaster*.

Während die Aminosäuresequenz des Corazonins und der daran anschließenden proteolytischen Spaltungsstelle identisch sind, sind das Signalpeptid und das CPRP bis auf einige wenige AS völlig verschieden.

4.1.5. Expression der Corazonin-mRNA

Um Gewebe zu identifizieren, welche die Corazonin-mRNA exprimieren, wurde eine Northern-Blot-Analyse durchgeführt. Das Plasmid pTriplEx2 mit der Corazonin-cDNA wurde mit NotI linearisiert und eine Digoxigenin-markierte-antisense-RNA-Sonde hergestellt (mit T7-DNA-Polymerase, siehe 3.1.15.). Die Sonde stellt eine vollständige antisense-Corazonin-mRNA dar.

Verschiedene Gewebe wurden aus Larven, die in der Wanderphase waren, präpariert, und die gesamt-RNA mit der Trizol-Methode isoliert (siehe 3.1.15.).

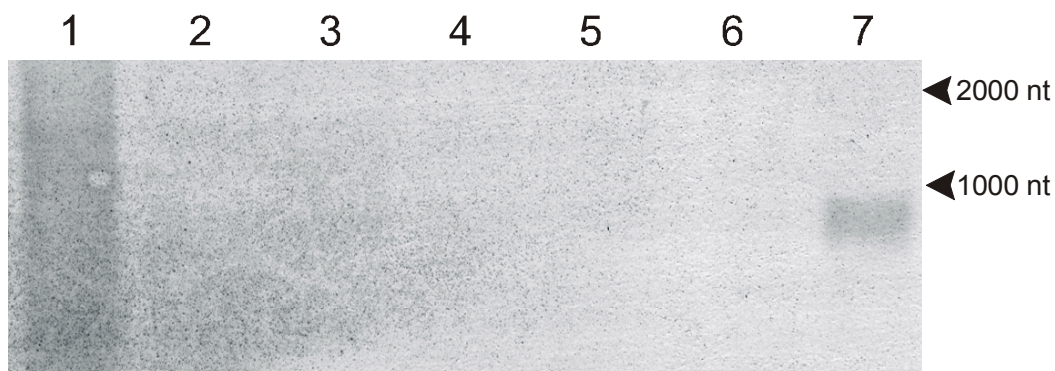


Abb. 16 Northern-Blot-Analyse mit Corazonin Sonde. 10 pg Plasmid-DNA (Crz-cDNA in pTriplX2) als Positivkontrolle (Bahn 1) und je 20 µg gesamt-RNA aus Cuticula (Bahn 2), Malphigische Gefäße (Bahn 3), Darm (Bahn 4), Fettkörper (Bahn 5), Speicheldrüsen (Bahn 6) und Gehirn (Bahn 7) wurden durch SDS-PAGE aufgetrennt und auf eine Nylonmembran geblottet. Für die Hybridisierung wurde eine Dig-gelabelte-RNA-Sonde verwendet, welche die vollständige Corazonin-mRNA enthielt. Die Detektion erfolgte über eine NBT/BCIP-Farbreaktion.

Corazonin-mRNA konnte in der Northern-Blot-Analyse ausschließlich im Gehirn nachgewiesen werden (Abb. 16). Dort trat eine einzelne Bande auf einer Höhe von 950 b auf. Alle anderen untersuchten Gewebe waren negativ.

4.1.6. Ist das Corazonin ein „single copy“-Gen?

Es wurde ein genomischer Southern-Blot durchgeführt, um nach Hinweisen zu suchen, ob das Corazonin-Gen ein „single copy“-Gen ist, d.h. in nur einer Kopie in einem einfachen Chromosomensatz vorliegt. Dazu wurde genomische DNA aus vier Einzeltieren isoliert (siehe 3.1.14) und mit drei verschiedenen Restriktionsenzymen verdaut, die keine Restriktions-Erkennungssequenz in der Corazonin-cDNA haben (StyI, EcoRI, HindIII). Der Southern-Blot wurde wie oben beschrieben durchgeführt, für die Hybridisierung wurde eine Digoxigenin-markierte-Corazonin-cDNA-Sonde verwendet.



Abb. 17 Genomischer Southern-Blot, Sonde: Corazonin-cDNA, 1s-4 s - Verdau der genomischen DNA mit Sty I, 1h-4 h - Verdau mit Hind III, 1e-4 e - Verdau mit EcoRI. Jede Nummer entspricht einem einzelnen Tier.

In jeder Spur wurden nie mehr als zwei Banden detektiert (Abb. 17). Zwischen den Einzeltieren trat nur ein individueller Unterschied in der Länge der Restriktionsfragmente auf (siehe Spur 4h).

Das Ergebnis dieses Experiments kann als Hinweis darauf gedeutet werden, dass das *Galleria* Corazonin Gen, wie sein *Drosophila* Homolog, ein „single copy“-Gen ist.

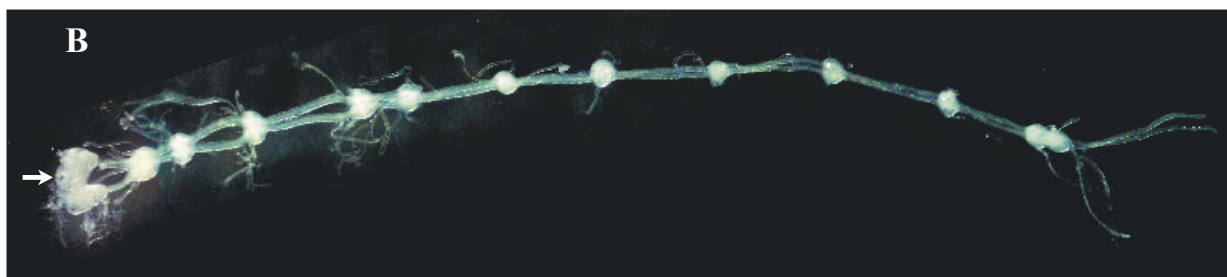
4.1.7. Lokalisation der Corazonin-mRNA in neurosekretorischen Zellen des Gehirns

Um Corazonin-produzierende Zellen zu detektieren, wurde eine Hybridisierung an Totalpräparaten von Gehirnen und kompletten Zentralnervensystemen von Tieren verschiedener Altersstufen durchgeführt (siehe 3.1.16). Es wurde die oben beschriebene Dig-markierte-antisense-RNA-Sonde eingesetzt.

In allen untersuchten Präparaten wurden im Gehirn zwei Gruppen von je vier Zellen angefärbt die jeweils im Bereich der lateralen neurosekretorischen Zellen der beiden Hirnhemisphären liegen.

Im restlichen Zentralnervensystem wurden keine Corazonin-mRNA produzierenden Zellen gefunden, der Corpora allata/Corpora cardiaca-Komplex war ebenfalls negativ.

Abb. 18 Totalpräparat-in-situ-Hybridisierung, **(A)** Seitenansicht des Gehirns, Unterschlundganglion und 1. thorakales Ganglion. Die Corazonin-mRNA-produzierenden Zellen sind blau angefärbt. **(B)** in-situ-Hybridisierung an einem isolierten ZNS einer *Galleria* Larve (letztes Larvenstadium). Der weiße Pfeil markiert die angefärbten Zellen.



In allen untersuchten Entwicklungsstadien (6. und 7. Larvenstadium, Vorpuppe, frühe Puppe, späte Puppe, adultes Tier) wurden vier Zellen in jeder Hemisphäre identifiziert, welche die Corazonin-mRNA synthetisieren.

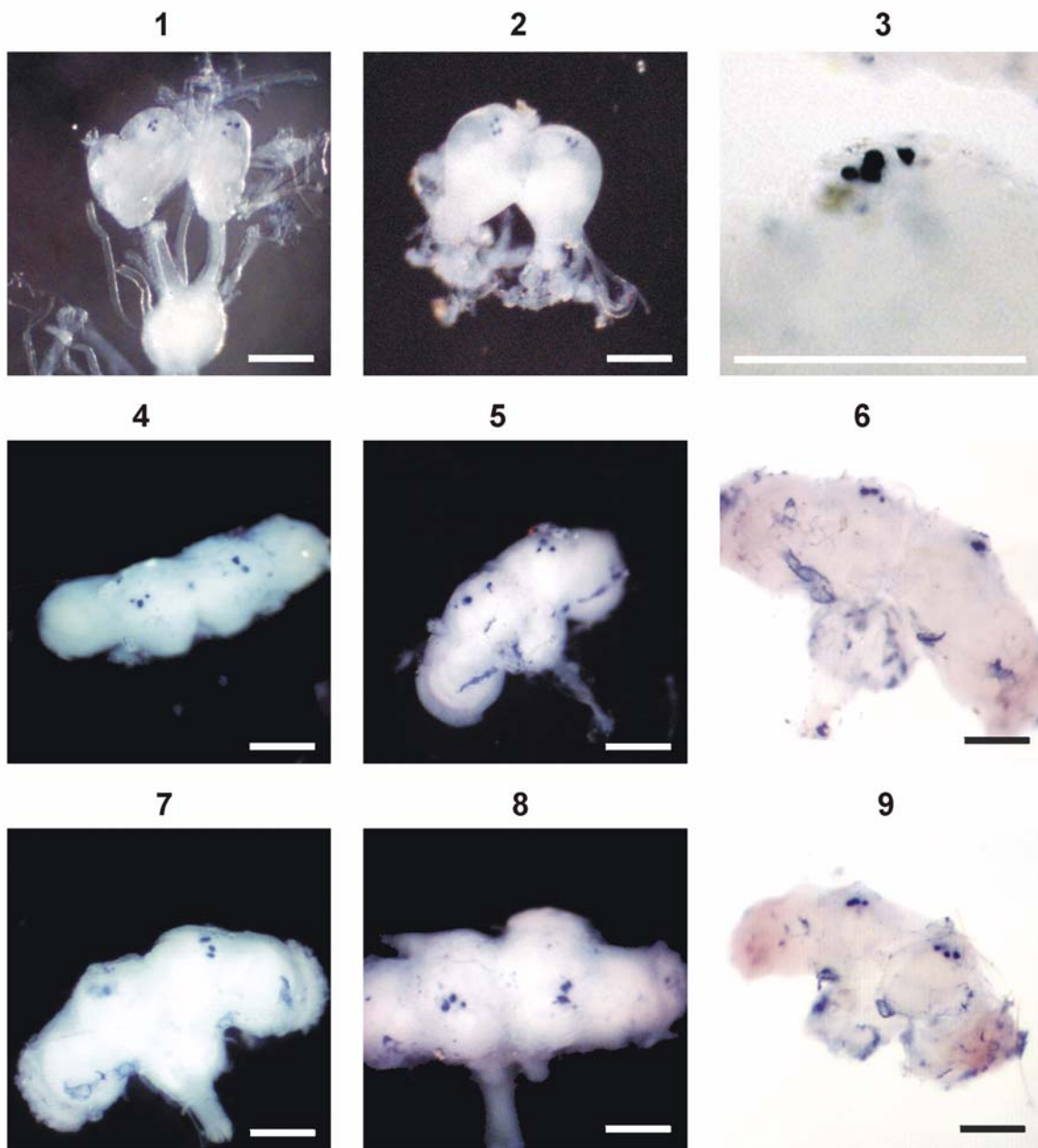


Abb. 19 Totalpräparat-in-situ-Hybridisierung mit einer Corazonin-cDNA-Sonde. Es wurden Larvenhirne (Bild 1 bis 3), Puppengehirne (Bild 4 bis 6), und Gehirne von adulten Schmetterlingen (Bild 7 – 9) verwendet. Die Gehirne in Bild 3, 6 und 9 wurden mit BAAB aufgeheilt. Vier neurosekretorische Zellen sind in jeder Hemisphäre angefärbt. Diese Verteilung ändert sich nicht während der Entwicklung von der Larve zum adulten Tier (Balken: 500 µm).

4.1.8. Immunolokalisation des Corazonin-Peptids und Koloalisation mit der mRNA

Mit einem polyklonalen Kaninchenserum, das gegen Corazonin gerichtet ist (Veenstra, 1991), wurden Immunolokalisationen an Totalpräparaten (siehe 3.3.3.) und Immunolokalisationen an Ultradünnschnitten (20 μm , siehe 3.3.4.) durchgeführt, um die Verteilung des Neuropeptids im Insekt zu überprüfen.

Für die Totalpräparat-Immunolokalisationen wurden Gehirne mit und ohne ZNS aus Tieren verschiedener Altersstufen präpariert, für die Ultradünnschnitte wurden Kopf und Thorax von Puppen verwendet, die kurz vor dem Schlüpfen standen.

In den untersuchten Larvengehirnen wurden 2 x 4 Corazonin-immunoreaktive-Zellen gefunden (CI-Neurone), bei Puppen- und adulten Gehirnen traten 2 x 4 stark angefärbte CI-Neurone im Bereich der *Pars lateralis* auf und zwei schwächer gefärbte Interneurone im Bereich der optischen Loben (OL). In einer kombinierten Totalpräparat-in-situ-Hybridisierung/Immunofluoreszenz-Färbung (siehe 4.1.9., hinten) wurde nachgewiesen, dass nur die acht stärker angefärbten Zellen Corazonin-mRNA exprimieren und damit den Zellen von 4.1.7. entsprechen (siehe Abb. 26). Im ganzen restlichen ZNS wurden keine weiteren immunoreaktiven Zellen gefunden.

Die Verteilung dieser Neurone und ihre Projektionsgebiete sind in Abb. 20 dargestellt. In jeder Hemisphäre sind 4 CI-Neurone in losen Zweiergruppen lokalisiert. Die CI-Neurone liegen in der *Pars lateralis* (laterale neurosekretorische Zellen) und projizieren Axone in zwei Hauptrichtungen. Im Gehirn eines adulten Tieres formen die Axone aller vier Zellen ein Bündel, das abwärts um den α -Lobus des Pilzkörpers zu der Mitte des Hirns läuft, wo sich das Bündel aufteilt. Der eine Teil folgt einem ventral-medianen Kurs und endet in einer Netzwerkstruktur im posterioren Protocerebrum (Abb. 23, 24). Der zweite Teil vollzieht eine 180°-Wendung, läuft ein Stück zurück, und läuft über den Nervus corpora cardiaca I/II in die Corpora cardiaca, die mit einem Netzwerk stark immunoreaktiver Fasern durchzogen sind (Abb. 25a-f). Einzelne Fasern enden in den Interzellularräumen der Corpora allata (Abb. 25a, 25d). Mindestens zwei der Nervenstränge, die von den Corpora cardiaca abgehen, wurden ebenfalls angefärbt (Abb. 25c). Bei Larven wurden an der Außenwand des Darms Corazonin-immunoreaktive Fasern entdeckt (siehe Abb. 22f).

Während der postembryonalen Entwicklung vom 6. Larvenstadium bis zum adulten Schmetterling bleibt das Grundmuster dieser Verteilung erhalten (siehe Abb. 21).

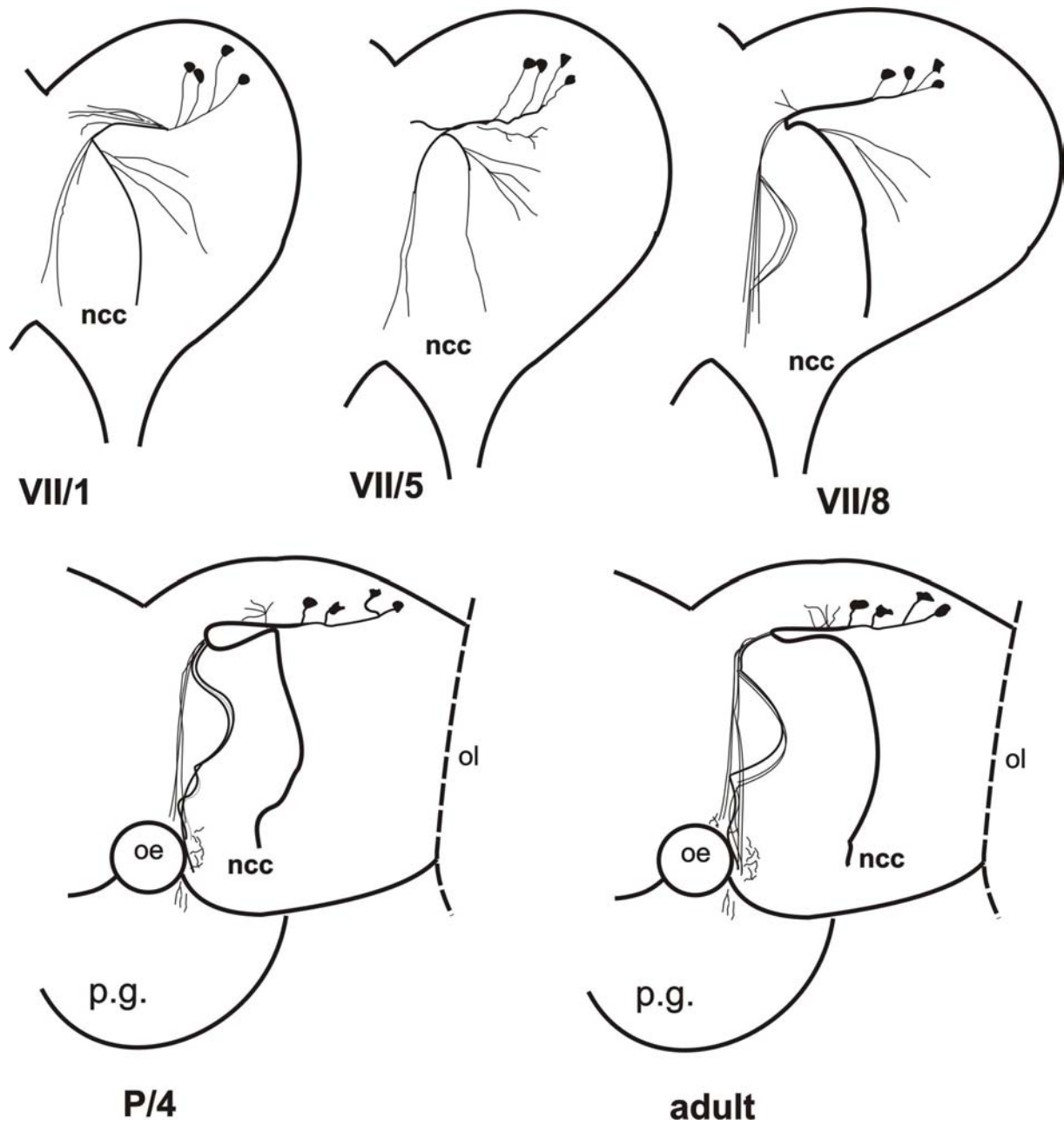


Abb. 20 Schema der Corazonin-immunoreaktiven-Strukturen in Gehirnen von *Galleria mellonella* während der postembryonalen Entwicklung. Vier Paare laterale neurosekretorische Zellen projizieren Axone in ein sich teilendes Bündel, von dem der eine Teil über die ncc I/II in die Corpora cardiaca läuft, der andere Teil im posterioren Protocerebrum endet (ncc-nervus corpora cardiaca I/II, oe - oesophagus, ol - optischer Lobus, p.g. - Prothorakalganglion).

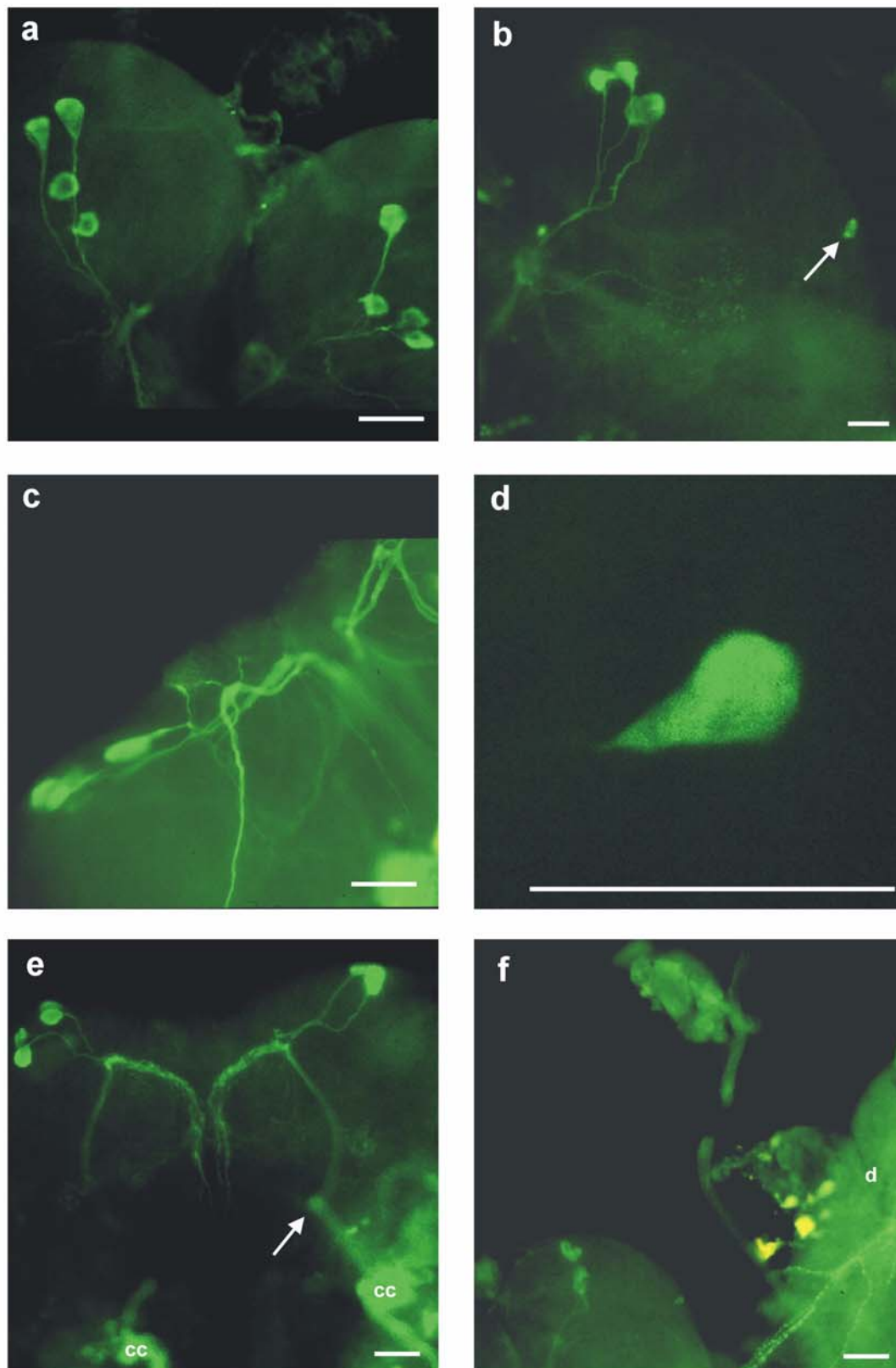


Abb. 21 Immunolokalisation des Corazonin-Peptids im Gehirn von *Galleria*
a,b) Larvenhirn, die Verteilung der vier CI-Neurone in Zweiergruppen ist gut zu erkennen, Pfeil - immunoreaktive Zelle nahe dem optischen Lobus (OL-Zelle), **c)** CI-Neurone im Gehirn eines adulten Tieres, **d)** OL-Zelle, **e)** Larvenhirn und Corpora cardiaca/allata Komplex, Pfeil - Austrittsstelle des NCC I/II, cc - corpus cardiacus, **f)** einzelne Corazonin-immunoreaktive-Fasern am Darm (d). Der Balken entspricht 100 μm .

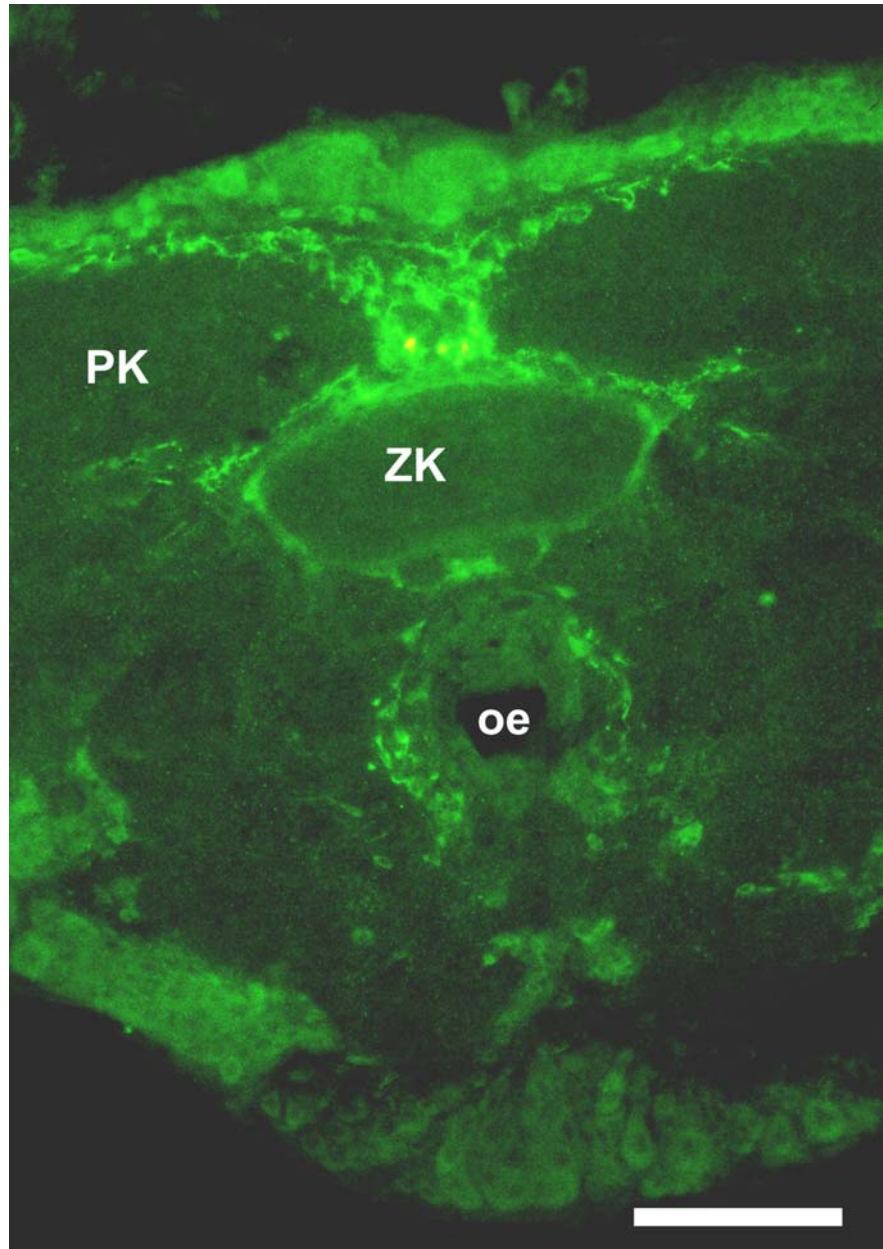


Abb. 22
 Immunofluoreszenz auf
 Ultradünnschnitten, adultes
Galleria Gehirn.
 Die immunoreaktiven
 Fasern umlaufen die
 Neuropilbereiche des
 Pilzkörpers (PK) und des
 Zentralkomplexes (ZK) und
 enden in einer
 Netzwerkstruktur um den
 Oesophagus (oe). Der
 Balken entspricht 50 µm.

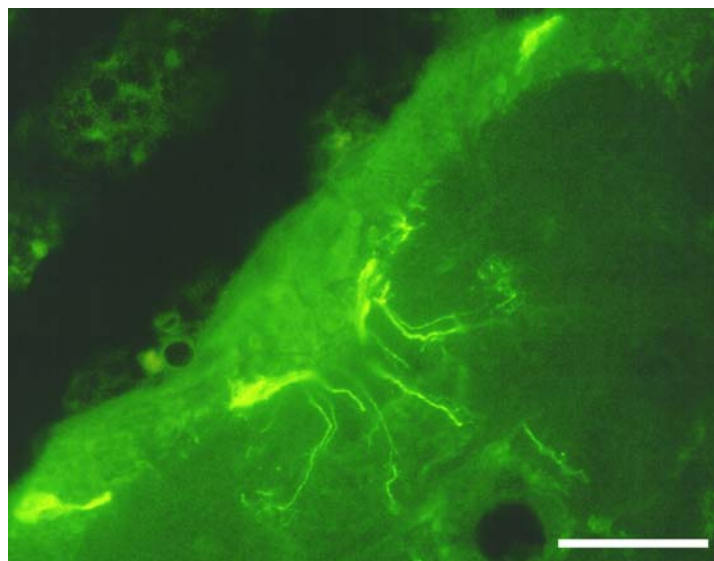


Abb. 23
 Immunofluoreszenz auf Untradünnschnitten
 durch ein adultes *Galleria*-Gehirn.
 Corazonin-produzierende neuro-
 sekretorische Zellen und von ihnen
 abzweigende immunoreaktive Fasern. Der
 Balken entspricht 50 µm.

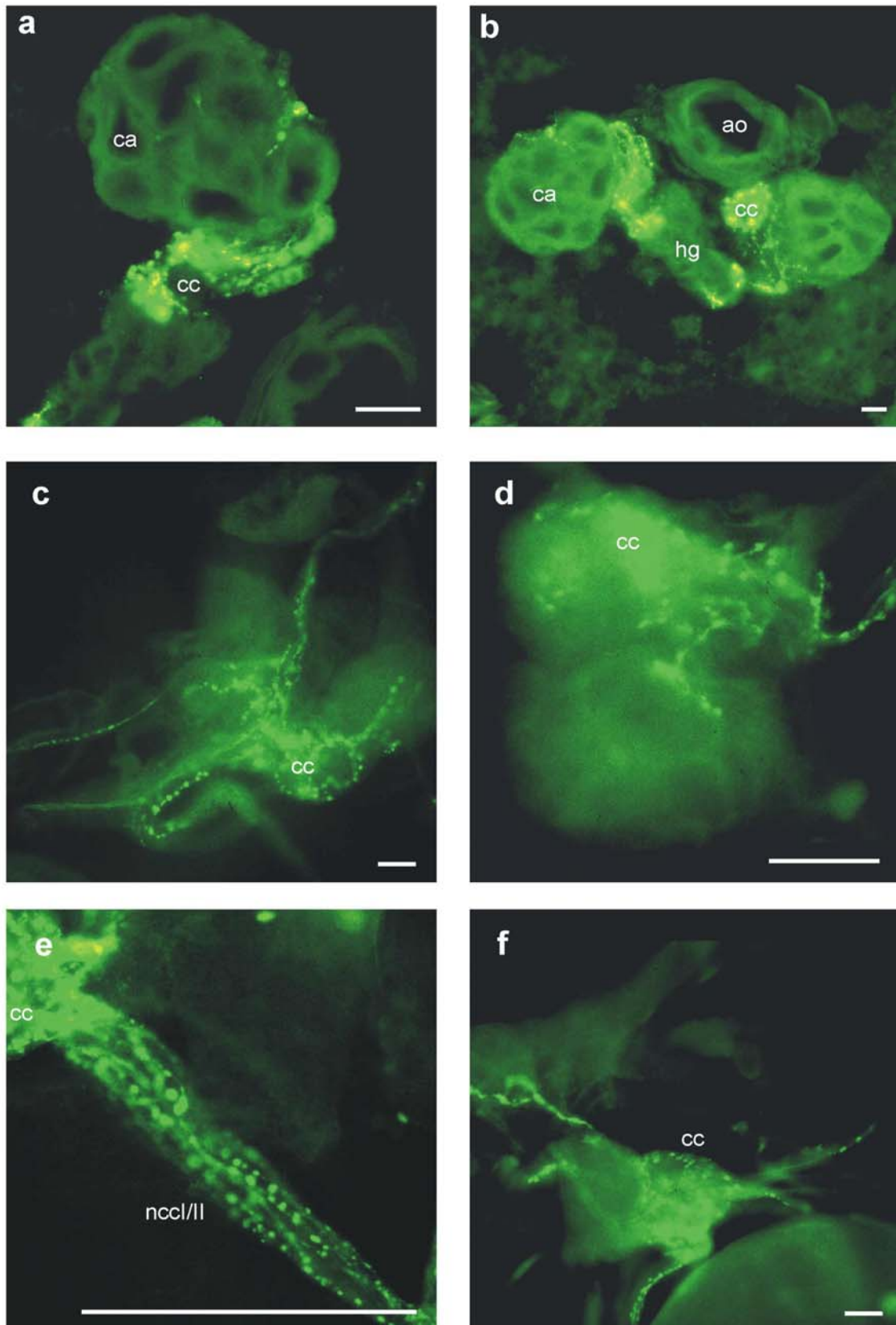


Abb. 24 Immunolokalisation des Corazonin-Peptids in den Corpora cardiaca von adulten *Galleria*. Bild **a)** und **b)** - Immunofluoreszenzfärbungen von Ultradünnschnitten, Bild **c), d), e), f)** – „Whole mount“-Immunolokalisation (ao - aorta, ca - corpus allatus, cc - corpus cardiacus, nccI/II Nervus corpori cardiaci I/II, hg - Hypocerebralganglion). Der Balken entspricht 100 μm.

4.1.9. Kombinierte Totalpräparat-in-situ-Hybridisierung/Immuofluoreszenz

Einige Präparate aus der Totalpräparat-in-situ-Hybridisierung - Zellen mit Corazonin-mRNA waren blau angefärbt - wurden für die Immunolokalisation verwendet, um zu zeigen, dass die Corazonin immunoreaktiven Neurone identisch mit denen sind, welche die Corazonin-mRNA exprimieren. Die Hintergrundfluoreszenz dieser Präparate war deutlich höher, als bei Präparaten, an denen ausschließlich eine Immunofärbung durchgeführt wurde. Die Corazonin- immunoreaktiven Zellen und ihre Axone waren dennoch deutlich zu erkennen (siehe Abb. 25). Die Corazonin-mRNA produzierenden Zellen und die Corazonin-immunoreaktiven Zellen sind identisch! Die oben beschriebene Corazonin-immunoreaktive Zelle, die nahe den optischen Loben liegt enthält keine Corazonin-mRNA!

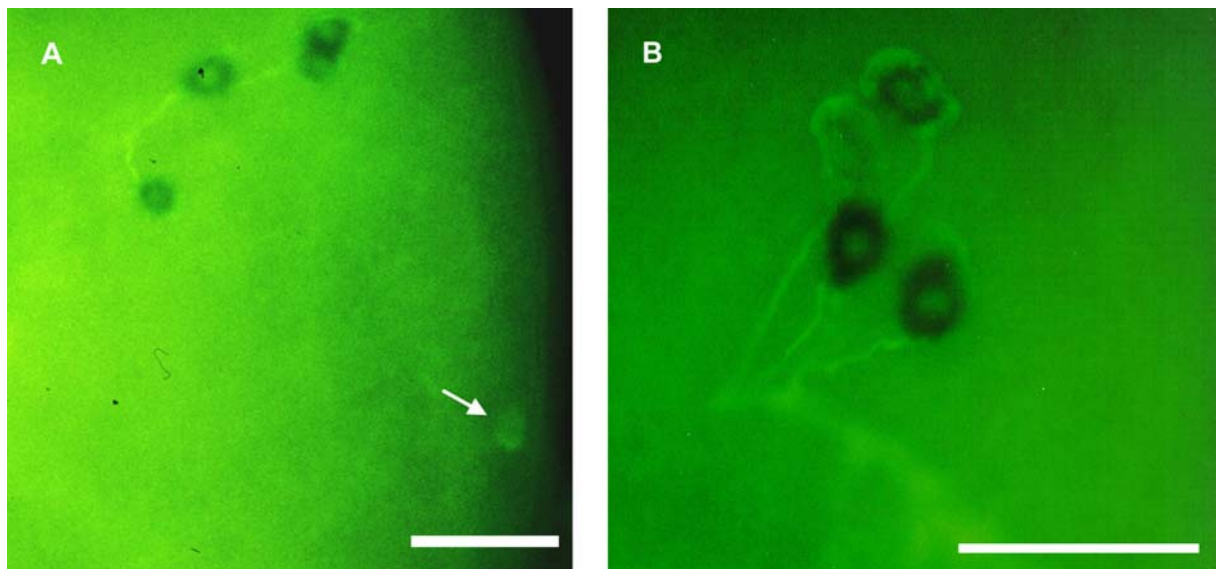


Abb. 25 A, B) Kombinierte Totalpräparat-in-situ-Hybridisierung/Immuofluoreszenz an Puppengehirnen von *Galleria*, Corazonin-mRNA produzierende bzw. immunoreaktive Zellen sind doppelt gefärbt. Der weiße Pfeil markiert eine Corazonin-immunoreaktive Zelle nahe dem optischen Lobus (OL-Zelle), die jedoch keine Corazonin-mRNA enthält (der Balken entspricht 100 μm).

4.2. Analyse der Interaktion des Hexamerinrezeptors mit Arylphorin und anderen Proteinen

4.2.1. Die Interaktion von Hexamerinen und Hexamerinrezeptoren im Hefe-Two-Hybrid -System

Ein Schwerpunkt dieser Arbeit war die Untersuchung der Interaktionen des Arylphorinrezeptors von *Calliphora* mit seinen Liganden Arylphorin, LSP-2 und anderen Proteinen. Als Methode der Wahl wurde das Hefe-Two-Hybrid-System verwendet, das sowohl für die Suche nach Interaktoren in cDNA-Bibliotheken, als auch für die Charakterisierung der bekannten Interaktion zwischen Hexamerinrezeptor und Arylphorin eingesetzt wurde.

Es wurde eine Two-Hybrid-cDNA-Bibliothek hergestellt (4.1.1.1.) und mit verschiedenen Köder-Proteinen gescreent (4.1.1.2.).

Die interagierenden Proteindomänen von Arylphorin und Hexamerinrezeptor wurde durch Experimente mit Deletionsfragmenten der beiden Proteine genauer erfaßt (4.1.1.3., 4.1.1.4.).

Die Interaktion des Hexamerinrezeptors mit zwei neu entdeckten Interaktoren wurden in einer Reihe von Experimenten untersucht (4.1.1.5).

4.2.1.1 Konstruktion einer Two-Hybrid-Bibliothek

Für das verwendete DupLEX-ATM-Yeast-Two-Hybrid-System (OriGene) gibt es eine große Anzahl kommerziell erhältlicher cDNA-Bibliotheken, aber keine aus *Calliphora*-mRNA. Eine solche Bibliothek wurde im Rahmen dieser Arbeit hergestellt. Als Ausgangsmaterial für die cDNA-Synthese wurde Fettkörpergewebe von *Calliphora* Larven verwendet. Aus Fettkörper von sechs und sieben Tage alten Larven, wurde gesamt-RNA mit der Trireagenz-Methode (3.1.15.1.) isoliert. Die Anreicherung von mRNA über kommerziell erhältliche Säulchen (Qiagen) oder mit Oligo-dT-Zellulose (Gibco) war nicht erfolgreich und wurde aufgegeben. Stattdessen wurde das Smart III - System (Clontech) für die cDNA-Synthese eingesetzt, das als Ausgangsmaterial gesamt-RNA verwendet und auch für „schwierige“ RNA-Templates einsetzbar ist (mündliche Mitteilung P. Wolbert).

a) Modifikation der MCS von pJG4-5

Die „multiple cloning site“ (MCS) des Two-Hybrid-Bibliotheksplasmids pJG4-5 wurde so erweitert, dass es möglich ist, cDNA-Fragmente, die mit dem Smart III System erzeugt wurden, gerichtet in diesen Vektor zu klonieren.

Dazu wurden zwei weitgehend komplementäre Oligonukleotide mit den entsprechenden Schnittstellen synthetisiert (Primer: MCS_u, MCS_l) und an den 5`-Enden phosphoryliert. Diese Oligos wurden anschließend miteinander hybridisiert .

Ansatz für die Hybridisierung der Oligos:

| | |
|-------|-------------------------|
| 5 µl | upper Oligo (100 pM/µl) |
| 5 µl | lower Oligo (100 pM/µl) |
| 90 µl | H ₂ O |

Die Hybridisierung wurde in einem Thermocycler durchgeführt:

| | |
|---|-------|
| 97°C | 5 min |
| 92°C | 3 min |
| 87°C | 3 min |
| 82°C | 3 min |
| > 4°C mit einer Geschwindigkeit von 1°/min. | |

Das entstandene, kurze doppelsträngige DNA-Stück und die darin enthaltenen Restriktionsschnittstellen ist in Abb. 26 dargestellt.

```

AATTCGGCCATTATGGCCATCGATCCCGGGGGCCGCCTCGGCC
GCCGTAATACCGGTAGCTAGGGCCCCCGGCGGAGCCGGGAGCT
EcoRI SfiI A ClaI SmaI SfiI B XhoI
    
```

Abb. 26 Erweiterte MCS von pJG4-5

Der Bibliotheksvektor pJG4-5 wurde mit den Restriktionsenzymen EcoRI und XhoI doppelverdaut und anschließend über ein Agarosegel gereinigt. 0,5 pM (1 µl) des Hybridisierungsprodukts wurden in 100 ng verdauten Vektor ligiert. Die Ligation wurde 45 min bei RT durchgeführt und durch Erhitzen auf 65°C beendet. 2 µl des Ligationsansatzes

wurden durch Elektroporation in *E. coli* XL10-Gold Zellen transformiert. Es wurden 20 Klone gepickt, von denen 5 mit *Sma*I und *Sfi*I verdaut werden konnten. Der modifizierte Bibliotheksvektor wurde als

pB42AD(*Sfi*IA/B)

bezeichnet.

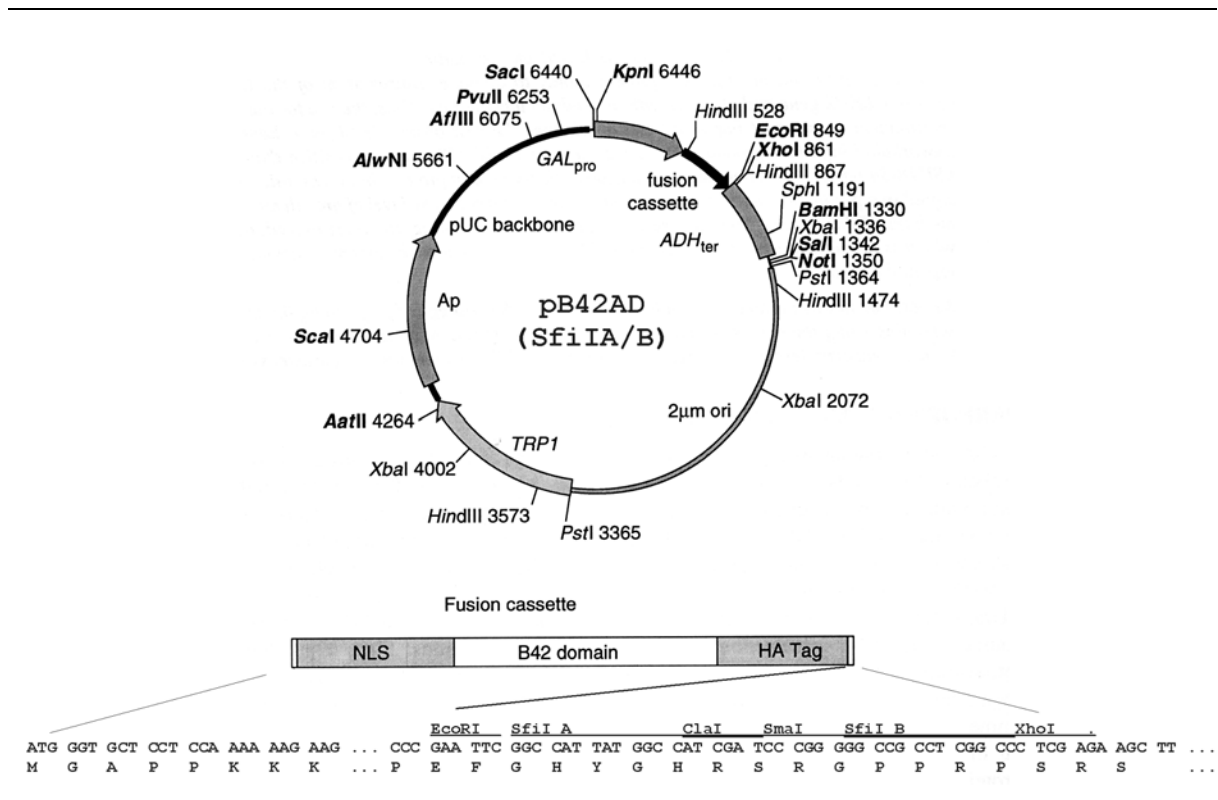


Abb. 27 Bibliotheksplasmid pB42AD(*Sfi*IA/B), Übersicht und MCS

b) cDNA-Synthese

Sechs und sieben Tage alte *Calliphora* Larven (6dL, 7dL) wurden dekapitiert, mit einer Pinzette am Abdomen festgehalten und die Innereien mit einem Spatel auf einen sauberen Objektträger ausgedrückt. Darm, Malphighische Gefäße und Gehirn wurden entfernt und der Fettkörper eines Tieres in ein 1,5-ml-Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt, in dem 0,5 ml Trifast-Reagenz waren. Die Isolierung der gesamt-RNA wurde wie in 3.1.15.1. beschrieben durchgeführt. Die gewonnene RNA wurde in H₂O gelöst und die Konzentration photometrisch bestimmt. 1 µg gesamt-RNA wurde für die cDNA-Synthese mit dem Smart III-System eingesetzt (3.1.17.).

Die so erzeugten cDNA-Populationen (Abb. 28) wurden mit Proteinase-K behandelt, mit *Sfi* I verdaut, größenfraktioniert und quantifiziert (siehe 3.1.17.).

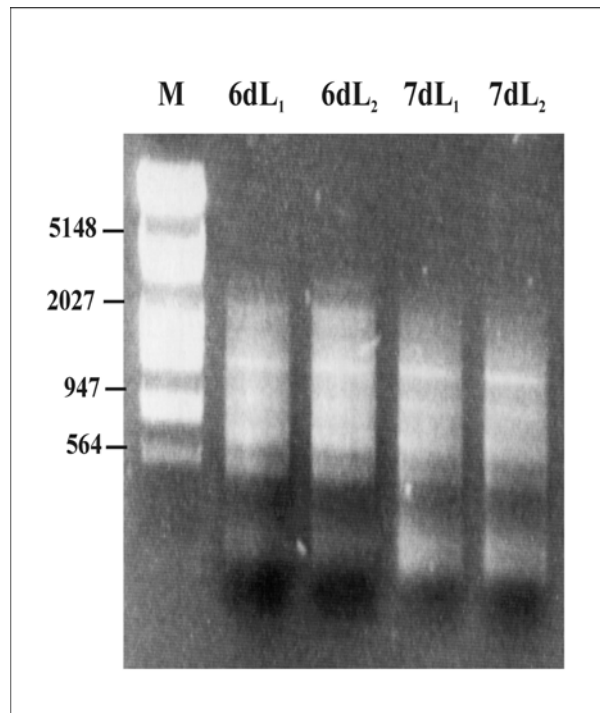


Abb. 28 5 μ l der Zweitstrangsynthese, aufgetragen auf einem 1%igen Agarosegel, gefärbt mit Ethidiumbromid.

c) Ligation der cDNA in das Bibliotheksplasmid

Der Bibliotheksvektor pB42AD(SfiIA/B) wurde mit Sfi I verdaut (50°C), über ein Agarosegel gereinigt und die Konzentration photometrisch und über ein Agarosegel bestimmt. Für eine Ligation wurde 200 ng linearisiertes Plasmid verwendet. Es wurde eine Reihe von Ligationen mit verschiedenen Mengen an cDNA (0 μ g, 0,5 μ g, 1 μ g, 1,5 μ g) angesetzt. Im Anschluß wurde eine Probetransformation durchgeführt. Die optimale Menge an cDNA für diese Ligation wurde so ermittelt. Ein typischer Ligationsansatz:

- x μ l Vektor (200 ng)
- 0,5 μ l rATP (10 μ M)
- y μ l 7dL-cDNA
- 1 μ l Ligase Puffer 10x
- 1 μ l T4-DNA-Ligase (4U/ μ l)
- ad H₂O auf 10 μ l.

Die Ligationsreaktion wurde über Nacht bei 16°C durchgeführt und durch Erhitzen auf 68°C für 15 min abgestoppt. Mit je 2 µl wurden via Elektroporation kompetente *E. coli* XL10-Gold Zellen transformiert und auf LB-Ampicillin Platten (Ø 15 cm) ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert. Am nächsten Morgen wurden die Kolonien gezählt und die Platten bei 4°C gelagert. Pro Platte wurden bis zu 40 000 einzelne Kolonien ermittelt.

d) Isolierung von Bibliotheks-Plasmid-DNA

30 Platten mit einer Gesamtzahl von ca. $1,2 \times 10^6$ Einzelkolonien wurden mit je 5 ml LB-Ampicillin-Flüssigmedium überschichtet und auf einem Kippschüttler ca. 1h bei RT langsam geschüttelt. Die Bakteriensuspensionen wurden vorsichtig abgenommen und in einem Bakterien-Kulturkolben vereinigt. 2 Vol LB-Ampicillin-Medium wurden zugegeben und 2 h bei 37°C geschüttelt. Anschließend wurde eine DNA-Maxi-Präparation (3.1.4.3.) durchgeführt. Die so gewonnene Plasmid-DNA stellt die Two-Hybrid-Bibliothek dar. Von 20 Einzelkolonien wurde eine Plasmid-Minipräparation durchgeführt, um so die Zahl der rekombinanten Plasmide und die durchschnittliche Größe der cDNA-Inserts abschätzen zu können.

| Ausgangsmaterial | RNA aus dem Fettkörper von 6 und 7 dL von <i>Calliphora vicina</i> |
|---|---|
| unabhängige Klone | $1,2 \times 10^6$ |
| davon rekombinant | $1,14 \times 10^6$ (95%) |
| rekombinante Klone im korrekten Leseraster (1/3) | $0,38 \times 10^6$ |
| durchschnittliche Größe der Inserts | 1 kbp |

Tab. 2 Eigenschaften der Bibliothek

Die neu konstruierte Two-Hybrid-Bibliothek umfasst ca. 380 000 Klone mit korrektem Leseraster, die aus einem unabhängigen Ligationsereignis hervorgegangen sind.

4.2.1.2 Screening der Bibliothek mit verschiedenen „Köder“ Proteinen

Mit der fertigen 6/7dL-cDNA-Bibliothek wurden drei Screening Experimente mit verschiedenen Köder Proteinen durchgeführt (siehe Abb. 5). Die drei verwendeten Köder waren:

- 1) **ABP130-bait**, das vollständige Hexamerinrezeptor-Vorläuferpeptid (Aminosäure 1 bis 1253)
- 2) **ABP96-bait**, der funktionelle Rezeptor (Aminosäure 1 bis 824)
- 3) **Arylphorin-bait**, das vollständige Arylphorin von *Calliphora*

Konstruktion der „Köder“-Vektoren

1) ABP130-bait

Die cDNA für den vollständigen *Calliphora*-Hexamerinrezeptor wurde durch PCR aus dem Hexamerinrezeptorklon B11 im Klonierungsvektor pBluescript® SK + herausamplifiziert (Genbank-Zugriffs-Nummer X79100). An 5'- und 3'-Ende wurden XhoI-Schnittstellen angehängt (Primer: A1, A2). Das PCR-Produkt (3722 bp) wurde in pCR-Script-Amp kloniert, mit XhoI herausgeschnitten, gelgereinigt und in mit XhoI-linearisiertem pEG202 ligiert. Die Orientierung der Inserts wurde mit einem EcoRI-Verdau überprüft. Die korrekte Insertion wurde durch Sequenzierung überprüft (Primer: S6).

2) ABP96 bait

Die cDNA für das 96 kDa Peptid des *Calliphora* Hexamerinrezeptor wurde durch PCR aus dem oben beschriebenen pBluescript® SK + Plasmid herausamplifiziert. An beiden Enden wurden XhoI-Schnittstellen angehängt (Primer: A1, A3). Das PCR-Produkt (2433 bp) wurde in pCR-Script Amp kloniert, mit XhoI herausgeschnitten, gelgereinigt und in mit XhoI-linearisierten pEG202 ligiert. Die Orientierung der Inserts wurde mit einem EcoRI-Verdau überprüft. Die korrekte Insertion wurde durch Sequenzierung überprüft (Primer: S6).

3) Arylphorin bait

Die vollständige *Calliphora*-Arylphorin-cDNA wurde aus einem cDNA-Klon im Klonierungsvektor pBluescript® SK + Plasmid herausamplifiziert (Genbank-Zugriffsnummer M76480). An beiden Enden wurden XhoI-Schnittstellen angehängt (Primer: A4, A5). Das amplifizierte PCR-Fragment (2278 bp) wurde über ein Agarosegel gereinigt und in pCR-Script-Amp zwischenkloniert. Aus diesem Vektor wurde das Fragment mit XhoI herausgeschnitten, gelgereinigt und in den linearisierten Ködervektor pEG202 kloniert. Die Orientierung wurde durch einen EcoRI-Verdau überprüft. Die korrekte Insertion wurde durch Sequenzierung überprüft (Primer: S6).

Durchführung des Screening-Experiments

Die Screening-Prozedur wurde wie in 3.2.5. beschrieben durchgeführt. In jedem Screen wurden 20 x 1 µg Bibliotheksplasmid eingesetzt. Es wurden 20 Petrischalen (Ø 15 cm) für die primären Transformanten benutzt (Glu/CM -Ura,-His,-Trp). Ca. 100 000 primäre Transformanten wurden gepoolt und auf 10 Gal/Raff/CM -Ura,-His,-Trp,-Leu Selektionsplatten ausgestrichen. Von den Hefeklonen, die auf den Interaktions-Selektionsplatten wachsen konnten, wurden jeweils 50 gepickt und weiter analysiert.

Ergebnisse des Two-Hybrid-Screens mit ABP130-bait

50 Hefeklone wurden von der finalen Selektionsplatte gepickt und auf einen Galaktose induzierbaren Leu⁺ und β-Galaktosidase Phänotyp getestet. 17 Klone, die beide Merkmale aufwiesen wurden weiter analysiert. Die Bibliotheksplasmide dieser Hefestämme wurden isoliert (3.2.5.) und erneut transformiert, um die Ergebnisse zu reproduzieren. Alle 17 Klone zeigten den erwünschten Phänotyp. Die entsprechenden Bibliotheksplasmide wurden vom 5'-Ende sequenziert.

Die identifizierten Sequenzen sind in den Tabellen 8 und 9 angezeigt. Es wurden sechs unvollständige Arylphorinklone gefunden, von denen zwei exakt die gleiche Länge hatten. Es wurden drei Klone gefunden, die für LSP-2 Fragmente kodieren, von diesen hatten zwei identische Längen.

| Klon | kodiertes Hexamerin | Fragment |
|------|---------------------|--------------|
| ms21 | Arylphorin | AS 382-759 |
| ms30 | Arylphorin | AS 382-759 |
| ms29 | Arylphorin | AS 463 - 759 |
| ms16 | Arylphorin | AS 484 - 759 |
| ms33 | Arylphorin | AS 484-759 |
| ms26 | Arylphorin | AS 492 - 759 |
| ms18 | LSP-2 | AS 286-701 |
| ms27 | LSP-2 | AS 286-701 |
| ms24 | LSP-2 | AS 315-701 |

Tab. 3 Ergebnisse des Two-Hybrid-Screens mit ABP130-bait. **Gescreente Hexamerine** (Arylphorinfragmente beziehen sich auf die AS Sequenz des *Calliphora*-Arylphorin-Klons A4 mit der Genbank- Zugriffsnummer AAB58985, LSP-2-Fragmente beziehen sich auf die Sequenz AAC24157)

| Klon Nr. | Identität |
|----------|--|
| ms32 | |
| ms 17 | unbekannter ORF |
| ms19 | |
| ms23 | 97% Identität mit „ anterior fat body protein “ [<i>Sarcophaga peregrina</i>]“ Genbank: BAA99282 |
| ms31 | unbekannter ORF |
| ms41 | unbekannter ORF |
| ms31 | 99% Identität zu „ AP-3 delta-adaptin “- Untereinheit [<i>Drosophila simulans</i>]“ Genbank: AAF68063 |

Tab. 4 Ergebnisse des Two-Hybrid-Screens mit ABP130-bait, **Gescreente „nicht-Hexamerin“-Proteine**
Die prozentuale Identität mit dem jeweils ähnlichsten, gefundenen Protein ist in % angegeben.

Von den sieben analysierten Bibliotheksplasmiden, die keine Hexamerinsequenzen enthalten, haben fünf ein offenes Leseraster (ORF), das Peptide kodiert, die keine Ähnlichkeiten zu bekannten Proteinen in den öffentlichen Datenbanken aufweisen (ms17, 19, 31, 32, 41).

Das Bibliotheksplasmid **ms23** enthält als Insert eine cDNA, die ein Protein kodiert, das als „anteriores Fettkörperprotein“ (AFP) bei der nahe verwandten Fliegenspezies *Sarcophaga peregrina* beschrieben ist (Nakajima Y, Natori S, 2000). Dieses 34 kDa Protein weist starke strukturelle Ähnlichkeit mit dem Säuger Regucalcin („Seneszenz-Marker-Protein-30“, SMP-30) auf, einem Kalzium bindenden Protein in der Leber.

Das cDNA-Insert des Bibliotheksplasmids **ms31** kodiert eine Delta-Adaptin-Untereinheit. Adaptine sind eine Gruppe von Proteinen, die als Adaptoren zwischen membrandurchspannenden Rezeptoren und Clathrin dienen.

Ergebnisse des Two-Hybrid-Screens mit ABP96-bait

50 Hefeklone wurden von der finalen Selektionsplatte gepickt und auf einen Galaktose induzierbaren Leu⁺- und β -Galaktosidase-Phänotyp getestet. 15 Klone, die beide Merkmale aufwiesen (vergleiche Abb. 29), wurden weiter analysiert.

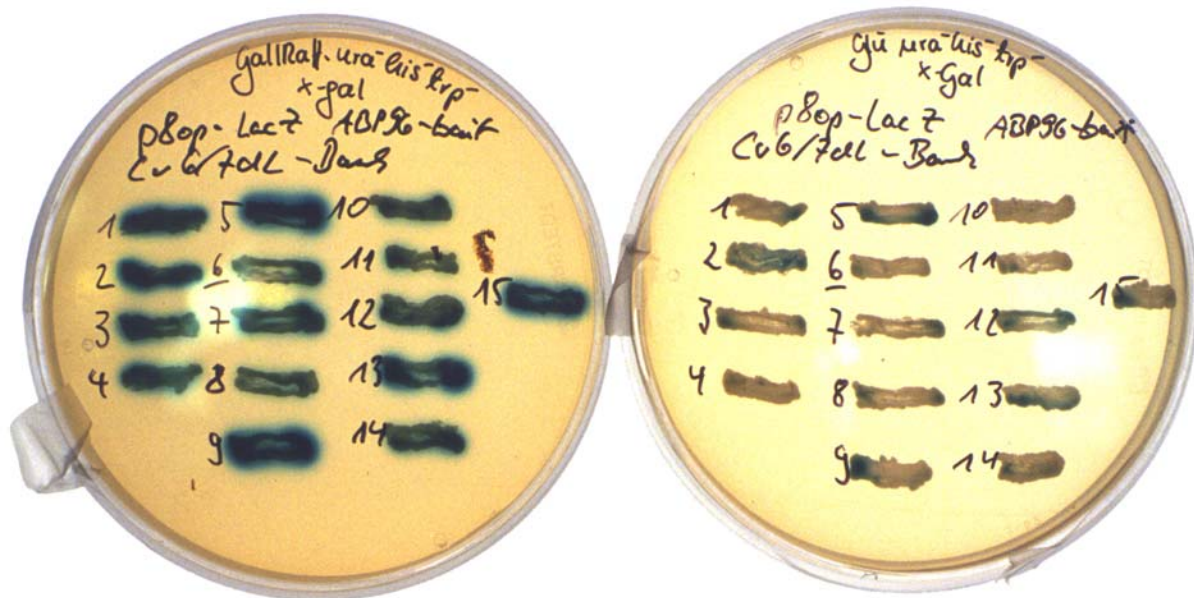


Abb. 29 Galaktose-induzierbarer β -Galaktosidase-Phänotyp bei Hefeklonen aus dem Screen mit ABP96-bait (die entsprechenden Bibliotheksplasmide sind aus Tabelle 10 und 11 ersichtlich).

Die entsprechenden Bibliotheksplasmide wurden isoliert und vom 5'-Ende ansequenziert. Die Ergebnisse sind in Tabelle 5 und 6 zusammengefasst.

| Klon | kodiertes Hexamerin | Fragment |
|------|---------------------|------------|
| b1 | Arylphorin | AS 333-759 |
| b10 | Arylphorin | AS 333-759 |
| b8 | Arylphorin | AS 486-759 |
| b11 | Arylphorin | AS 500-759 |
| b15 | Arylphorin | AS 520-759 |
| b7 | Arylphorin | AS 520-759 |
| b14 | Arylphorin | AS 536-759 |
| b4 | Arylphorin | AS 536-759 |

Tab. 5 Ergebnisse des Two-Hybrid-Screens mit ABP96-bait, Gescreente **Hexamerine**

| Klon Nr. | Identität |
|----------|---|
| b5 | 85% Identität zur AS Sequenz des Translations-Elongations-Faktor-2 [<i>Drosophila melanogaster</i>] Genbank CAA33804 |
| b9 | 97% Identität mit „ anterior fat body protein “ [<i>Sarcophaga peregrina</i>] Genbank BAA99282 |
| b13 | 97% Identität mit „ anterior fat body protein “ [<i>Sarcophaga peregrina</i>] Genbank BAA99282 |
| b2 | unbekannter ORF |
| b3 | unbekannter ORF |
| b6 | unbekannter ORF |
| b12 | unbekannter ORF |

Tab. 6 Ergebnisse des Two-Hybrid-Screens mit ABP96-bait, „nicht Hexamerin“ Proteine

Von den 15 isolierten Bibliotheksplasmiden enthalten acht Arylphorin-cDNA-Sequenzen. Es wurden drei Paare mit gleicher Länge gefunden (b1/10, b7/15, b4/14).

Von den analysierten Bibliotheksplasmiden, die keine Hexamerinsequenzen enthielten, wiesen drei einen ORF auf, der für kein bekanntes Protein in den durchsuchten Datenbanken kodierte (b2/3/6).

Das Bibliotheksplasmid **b5** enthält eine cDNA mit hoher Identität mit dem „Translations-Initiationsfaktor-2“ von *Drosophila mellanogaster*. Dieser Interaktor wurde als „falsch positiv“ gewertet.

Die analysierten Bibliotheksplasmide **b9** und **b13** enthalten cDNAs, die ein „anteriores Fettkörperprotein“ kodieren (identisch mit ms23 aus dem Screen mit ABP130 bait).

Die Tabelle 12 zeigt eine Zusammenstellung aller Arylphorin-Fragmente, die in den Screening Experimenten mit ABP130-bait und ABP96-bait gefunden wurden. Die Fragmente sind der Größe nach geordnet. Die interessanteste Information liefert das kürzeste gefundene Arylphorinfragment, da dieses die Rezeptor-Bindungsstelle beinhalten muss, die demnach in der Domäne-3 lokalisiert sein muss (der Aufbau des Arylphorins - Tertiär- und Quartärstruktur - wird in Kapitel 4.2.3 gesondert behandelt).

Zum Vergleich: Das vollständige Arylphorin von *Calliphora vicina*, drei Domänen sind unterschiedlich gefärbt (vergleiche Kapitel 4.2.3).



| Klon Nr. | Fragment | Grafik |
|----------|--------------|--------|
| b1 | AS 333-759 | |
| b10 | AS 333-759 | |
| ms21 | AS 382-759 | |
| ms30 | AS 382-759 | |
| ms29 | AS 463 - 759 | |
| ms16 | AS 484 - 759 | |
| ms33 | AS 484-759 | |
| b8 | AS 486-759 | |
| ms26 | AS 492 - 759 | |
| b11 | AS 500-759 | |
| b15 | AS 520-759 | |
| b7 | AS 520-759 | |
| b14 | AS 536-759 | |
| b4 | AS 536-759 | |

Tab. 7 Größenvergleich der gescreenten Arylphorin-Fragmente, die „b“-Klone wurden mit ABP96-bait gescreent, die „ms“-Klone mit ABP130-bait. Die drei Domänen des *Calliphora*-Arylphorins sind in verschiedenen Farben dargestellt. Deletierte Regionen sind durch einen schwarzen Strich markiert (vergleiche vollständiges Arylphorin, oben).

Ergebnisse des Two-Hybrid-Screens mit Arylphorin-bait

100 Hefeklone wurden von der finalen Selektionsplatte gepickt und auf einen Galaktose induzierbaren Leu⁺- und β -Galaktosidase-Phänotyp getestet. 17 Klone, die beide Merkmale aufwiesen wurden weiter analysiert.

Tab. 8 Ergebnisse des Two-Hybrid-Screens mit Arylphorin-bait, **Gescreente Hexamerine**

| Klon Nr. | kodiertes Hexamerin | Fragment |
|----------|---------------------|-----------|
| a3 | Arylphorin | 500 - 759 |
| a5 | Arylphorin | 500 - 759 |
| a6 | Arylphorin | 500 - 795 |

Tab. 9 Ergebnisse des Two-Hybrid-Screens mit Arylphorin-bait, **„nicht Hexamerin“-Proteine**

| Klon Nr. | Identität |
|---|--|
| a4 | unbekannter ORF |
| 17 | unbekannter ORF |
| a7 | hohe Identität mit „ubiquitin C-terminal hydrolase homolog“ [Drosophila melanogaster] Genbank AAB23929 |
| a12 | 80% Identität mit „Pcd gene product“ [Drosophila melanogaster] Genbank AAC25196 |
| a2, a8, a9, a10, a11, a12, a13, a14, a15, a16 | 78% Identität mit „pug gene product“ [Drosophila melanogaster]“ Genbank AAG22140 (ist C-1-TETRAHYDROFOLATE SYNTHASE) |

Es wurden drei Arylphorinfragmente (a3/5/6) als Interaktoren identifiziert. Alle drei haben dieselbe Länge und sind vermutlich aus einem Transformationsereignis hervorgegangen.

Von den isolierten „nicht Hexamerin“-Bibliotheksplasmiden enthielten zwei (a4/17) ORFs, die keine Ähnlichkeit mit bekannten Proteinen aus den durchsuchten Datenbanken aufwiesen. Das Plasmid a7 enthält die partielle cDNA einer Ubiquitin-Hydrolase. Diese Klasse von Enzymen ist an der Deubiquitinierung von Proteinen beteiligt.

Das Bibliotheksplasmid a12 enthält die partielle cDNA für eine Carbinolamine-Dehydratase, ein bifunktionelles Enzym, das zum einen die Regeneration von Tetrahydrobiopterin katalysiert und zum anderen als dimerisierender Kofaktor der HNF-1-Homeodomänen-Proteine (hepatocyte nuclear factor-1alpha and beta) in der Genexpression involviert ist (Pogge v Strandmann, 2000). Dieser Interaktor wurde als falsch positiv gewertet.

Die Plasmide a2/8/9/10/11/12/13/14/15/16 enthalten die partielle cDNA einer C-1-Tetrahydrofolat-Synthase, einem mitochondrialen Protein. Dieser Interaktor ist als ein typischer „falsch positiver“ in Two-Hybrid-Screens bekannt.

Zusammenfassung der Ergebnisse der Screening-Experimente

Die Ergebnisse der beiden Screening Experimente mit dem **Hexamerinrezeptor** bzw. einem Fragment dieses Proteins zeigen, dass eine Interaktion zwischen Hexamerinen und dem Rezeptor in der Hefe stattfindet. Es wurde eine Vielzahl von Fragmenten der beiden bekannten Interaktoren des Rezeptors – Arylphorin und LSP-2 - gefunden.

Zwei interessante neue Interaktionskandidaten wurden im Rahmen dieser Screenings ermittelt - ein „anterior fat body specific protein“ und eine AP-3 delta Adaptin Untereinheit.

Im Screen mit **Arylphorin** als Köderprotein konnte als Interaktor nur die Domäne-3 des Arylphorins selber identifiziert werden. Diese Daten stimmen mit dem 3D-Modell überein, welches in Kapitel 4.2.3 besprochen wird.

4.2.1.3. Konstruktion von Deletionsfragmenten zur Kartierung der Bindungsdomänen

Ein wichtiges Ziel dieser Arbeit war die Charakterisierung der bindenden Domänen des Hexamerinrezeptors und seines Liganden Arylphorin. Die exakte Kartierung der bindenden Domänen wurde durch Two-Hybrid-Experimente mit trunkierten Fragmenten beider Proteine durchgeführt. Dazu wurden eine Reihe von Deletionsfragmenten für beide Interaktionspartner erzeugt (siehe Tab. 10). Diese wurden anschließend in verschiedenen Kombinationen miteinander im Two-Hybrid-Experiment getestet.

a) „Beute“ (prey): Arylphorin-Deletionsfragmente

Es wurden 15 verschiedene Arylphorinfragmente als „Beute“ in den Bibliotheksvektor pJG4-5 oder pB42AD(SfiIA/B) kloniert. Eine Übersicht über die erzeugten Deletionsfragmente ist in Tabelle 10 gegeben.

| Name | Fragment | Grafik |
|-----------------|--------------|--------|
| Arylphorin-prey | AS 001 - 795 | |
| Domäne-1-prey | AS 001 - 262 | |
| C-prey | AS 001 - 093 | |
| B-prey | AS 093 - 261 | |
| A-prey | AS 261 - 579 | |
| AI-prey | AS 261 - 330 | |
| AII-prey | AS 261 - 504 | |
| Domäne-2/3-prey | AS 263 - 759 | |
| Domäne-3-prey | AS 487 - 795 | |
| 1850-Ende-prey | AS 603 - 795 | |
| 2050-Ende-prey | AS 669 - 795 | |
| BD01-prey | AS 488 - 600 | |
| BD02-prey | AS 504 - 600 | |
| BD03-prey | AS 488 - 552 | |
| BD04-prey | AS 504 - 552 | |

Tab. 10 Übersicht über die konstruierten „Beute“-Arylphorinfragmente. Die drei Domänen eines Arylphorin-Monomers sind in verschiedenen Farben gekennzeichnet.

Konstruktion von Arylphorin-„Beute“

Die vollständige Arylphorin-cDNA wurde durch XhoI-Verdau aus dem „Köder“-Vektor pEG202 herausgeschnitten (Arylphorin-bait, siehe 4.1.1.2.), über ein Agarosegel gereinigt und in XhoI-linearisierten Bibliotheksvektor pJG4-5 ligiert. Die XhoI-Schnittstelle der beiden „Shuttle“-Plasmide liegt im selben Leseraster.

Konstruktion von A-, B-, und C- „Beute“

Die drei als A, B und C bezeichneten Fragmente sind EcoRI-Fragmente der Arylphorin-cDNA. Sie wurden durch Verdau der vollständigen Arylphorin-cDNA in pBluescript® SK + auseinandergeschnitten. Die Fragmente wurden durch eine Agarosegelelektrophorese voneinander getrennt und anschließend aus dem Gel ausgeschnitten, gereinigt und in die EcoRI-Schnittstelle des Bibliotheksvektors pJG4-5 kloniert. Die Orientierung der Inserts wurde durch Sequenzierung überprüft. Alle drei Fragmente befanden sich im richtigen Leseraster.

Das C-Fragment kodiert von AS 1 bis 93, das 5'-Ende des Arylphorins. Das B-Fragment kodiert die AS 94 bis 260 und beinhaltet einen Teil der Domäne 1. Das A-Fragment kodiert die AS 261 bis 579 des Arylphorins und umfaßt einen großen Teil der Domäne 2 und einen kleineren Anteil der Domäne-3.

Konstruktion von AI- und AII-„Beute“

Als Template für die PCR Amplifikation der Deletionsfragmente AI und AII diente das A prey Plasmid. Es wurden ein positiver Primer, der direkt unterhalb (downstream) der Insertionsstelle hybridisiert (Primer: A6), und zwei weitere Primer, die innerhalb der A-Fragment-Sequenz an den Negativstrang hybridisieren und ein Stopkodon am 3'-Ende erzeugen (A7, A8), synthetisiert.

Mit Kombinationen aus diesen Primern wurden lineare DNA-Fragmente aus dem A-prey-Plasmid amplifiziert, die sowohl den vollständigen Vektor, als auch die gewünschten Arylphorinfragmente enthielten. Die Fragmente wurden anschließend mit PNK an den 5'-Enden phosphoryliert und zirkularisiert. AI-prey ist 70 AS lang und kodiert einen Teil der Domäne 2 des *Calliphora*-Arylphorins. AII-prey ist 244 AS lang und kodiert einen längeren Teil der Domäne 2 und einen kurzen Teil der Domäne-3 (siehe Tab. 10).

Konstruktion von Domäne-1, 2/3, 3-„Beute“

Um die drei Domänen des Arylphorins (siehe Einleitung) getrennt als „Beute“-Proteine zu exprimieren, wurde eine PCR-Strategie mit domänenspezifischen Primern entwickelt (siehe Abb. 30). Als Template diente die vollständige Arylphorin-cDNA im Bibliotheksvektor (Arylphorin-prey, s.o.).

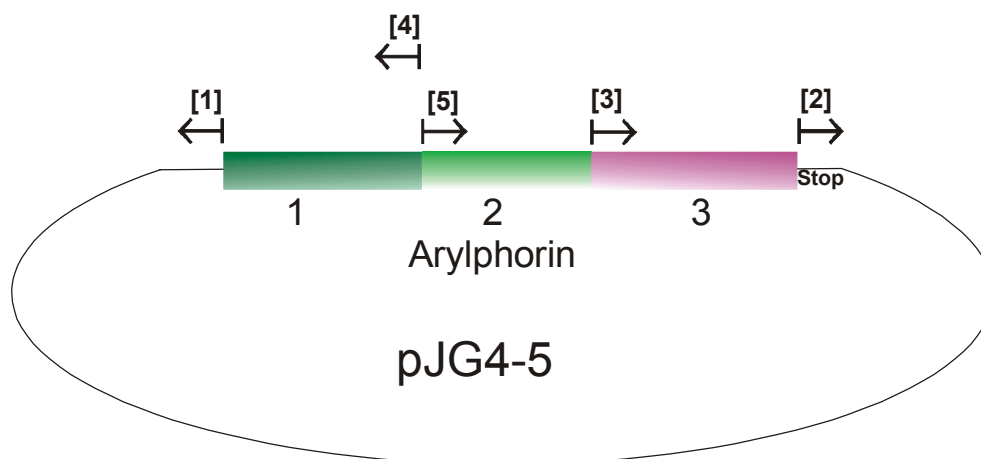


Abb. 30 Lage der Primer für die „Domänen PCR“

Alle Domänen-Primer wurden am 5'-Ende phosphoryliert (die Domänen-Primer 1 bis 5 entsprechen den Primern A9 bis A13, siehe Anhang). Folgende Primerkombinationen wurden erfolgreich für die PCR verwendet:

- 1/3 (Ergebnis: Domäne-3-prey, AS 488 (T) - 759 (H) des *Calliphora*-Arylphorins)
- 1/5 (Ergebnis: Domäne-2/3-prey, AS 262 (F) - 759 (H) des *Calliphora*-Arylphorins)
- 4/2 (Ergebnis: Domäne-1-prey, AS 1(M)- 249 (F) des *Calliphora*-Arylphorins)

Die linearen PCR-Fragmente wurden in einer Ligation bei 16°C über Nacht zirkularisiert, das korrekte Leseraster wurde durch Sequenzierung überprüft.

Konstruktion von 1850-Ende- und 2050-Ende-prey

Es wurden zwei Konstrukte erzeugt, die trunke Teile der Domäne-3 des Arylphorins als „Beute“-Fusionsproteine exprimieren. Die Fragmente wurden durch PCR amplifiziert. Die degenerierten Primer enthielten SfiIA- (5'-Primer, A14, A15) bzw. SfiIB-Schnittstellen (3'-Primer, A16). Die PCR Produkte wurden in pCR-Script-Amp zwischenkloniert und

anschließend mit SfiI ausgeschnitten und gerichtet in den Bibliotheksvektor pB42AD(SfiIA/B) kloniert.

- 1850-Ende-prey kodiert für die AS 602 (K) bis 759 (H),
- 2050-Ende-prey kodiert für die AS 669 (M) bis 795 (H) des *Calliphora*-Arylphorins.

Konstruktion von BD01-, BD02-, BD03- und BD04-prey




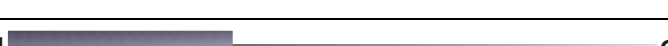
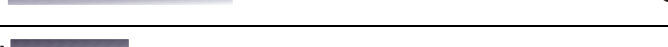
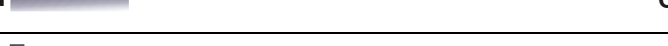
Die vier BD-Fragmente (BD steht für bindende Domäne) wurden durch PCR aus Domäne-3-prey herausamplifiziert (Primer: A17, A18, A19, A20). Dabei wurde am 5'-Ende eine Sfi IA-Schnittstelle angehängt, am 3'-Ende eine Sfi IB-Schnittstelle und ein Stop-Codon (TAA). Die PCR-Fragmente wurden in pCR-Script-Amp zwischenkloniert, mit SfiI herausgeschnitten, gelgereinigt und in den mit SfiI-linearisierten Bibliotheksvektor pB42AD(SfiIA/B) gerichtet hineinligiert. Die Insertionsstellen wurden sequenziert.

| „Beute“-Plasmid | Arylphorinfragment |
|-----------------|--------------------|
| BD01-prey | AS 488 bis 600 |
| BD02-prey | AS 504 bis 600 |
| BD03-prey | AS 488 bis 552 |
| BD04-prey | AS 504 bis 552 |

Tab. 11 Fragmente, enthalten in den BD-prey-Plasmiden

b) „Beute“: Hexamerinrezeptor-Deletionsfragmente

Es wurden sechs Fragmente des Hexamerinrezeptors in den „Köder“-Vektor pEG202 kloniert. Dabei wurden Fragmente erzeugt, die den drei in vivo vorkommenden Fragmenten entsprechen (Burmester und Scheller 1997) und drei kürzere N-terminale Fragmente (siehe Tab. 12). Die Konstruktion von ABP130-bait und ABP96-bait sind oben beschrieben.

| | | | | |
|----------------|---------------|---|--|---|
| ABP130-bait | AS 001 - 1253 | N |  | C |
| ABP96-bait | AS 001 - 824 | N |  | C |
| ABP64-bait | AS 001 - 571 | N |  | C |
| ABP64-187 bait | AS 093 - 380 | N |  | C |
| ABP-AS 1-200 | AS 001 - 200 | N |  | C |
| ABP-AS 1-24 | As 001 - 024 | N |  | C |

Tab. 12 Deletionsfragmente des Hexamerinrezeptors, kloniert in pEG202 „Köder“-Vektor

ABP64-bait

Die ABP64-cDNA wurde durch PCR aus der vollständigen Rezeptor-cDNA herausamplifiziert. Am 5' Ende wurde eine EcoRI-Schnittstelle, am 3' Ende eine XhoI-Schnittstelle angehängt (Primer A21, A22).

Das PCR Produkt wurde in pCRScript SK+ zwischenkloniert und mit einem EcoRI/XhoI-Doppelverdau ausgeschnitten. Nach einer Gelreinigung wurde das Fragment gerichtet in den ebenfalls doppelverdauten „Ködervektor“ pEG202 ligiert. Die Schnittstelle wurde sequenziert.

- ABP64-bait enthält die kodierende Sequenz für die AS 1 (M) bis 571 (G) des Rezeptors.

ABP64-187-bait

Die Strategie bei der Erzeugung von ABP64-187 bait ist identisch mit der oben beschriebenen für ABP64. Es wurde die Primerkombination A21/A23 eingesetzt.

- ABP 64-187-bait enthält die kodierende Sequenz für die AS 1 bis 380 (Q) des Rezeptors.

c) Weitere Two-Hybrid-Konstrukte

LSP-2-prey

Die LSP-2-cDNA wurde durch einen Pst I/XhoI-Doppelverdau aus dem Vektor pBluescript® SK + herausgeschnitten und in pJG4-5 ligiert. Durch Restriktionsverdau mit EcoRI wurde die Orientierung der Fragmente bestimmt. Die Insertionsstelle wurde sequenziert, um zu überprüfen, ob sich die LSP-2-cDNA im Leseraster der B42-Domäne befindet. Das Fusionsplasmid exprimiert die 701 AS des LSP-2 von *Calliphora vicina*, fusioniert an die B42-transkriptionsaktivierende Domäne.

TmHex2i-prey

TmHex2i-prey exprimiert ein 650 AS langes C-terminales Fragment eines Hexamerins des Mehlkäfers *Tenebrio molitor*. Es wurde in unserer Arbeitsgruppe im Rahmen eines anderen Projekts in einem Two-Hybrid-Screen identifiziert.

ABP96 bait

Die kodierende cDNA für das 96 kDa Fragment des Hexamerinrezeptors wurde durch XhoI-Verdau aus dem „Beuteplasmid“ ABP96-prey ausgeschnitten und in den „Köder“-Vektor pEG202 ligiert. Die richtige Orientierung wurde durch einen EcoRI-Verdau bestätigt.

4.2.1.4. Kartierung der interagierenden Domänen im Two-Hybrid-Experiment

Um Daten über die genaue Lage der interagierenden Domänen des Hexamerinrezeptors und seines Liganden zu bekommen wurde eine Reihe von Experimenten durchgeführt, wobei verschiedene „Köder/Beute“-Kombinationen in die Reporter-Hefestämme EGY48/p8op-LacZ und EGY48/p8op-EGFP transformiert wurden. Von den Selektionsplatten wurden jeweils 10 Einzelklone gepickt und unabhängig voneinander analysiert. Das Wachstumsverhalten auf Leuzinmangelmedium, die β -Galaktosidaseaktivität bzw. die EGFP-Expression wurden bestimmt.

a) Interaktionsanalyse von ABP96-bait mit verschiedenen „Beuten“ (Experiment-1)

Verschiedene prey-Konstrukte (Arylphorinfragmente als „Beute“) wurden in die beiden Hefestämme EGY48/p8opEGFP/pABP96-bait und EGY48/p8opLacZ/pABP96-bait (Rezeptorfragment ABP96 als „Köder“) transformiert. Zur Bewertung der Stärke von gefundenen Interaktionen wurde das Wachstum auf Leuzin-Mangelmedium, der β -Galaktosidase-Phänotyp (bei Hefen mit LacZ-Reporter) und die Expression von EGFP (bei Hefen mit EGFP-Reporter) überprüft. Das Wachstum auf Leucin-Mangelmedium und die β -Galaktosidaseaktivität wurde über 5 Tage hinweg beobachtet und protokolliert. Die EGFP-Expression wurde wie oben beschrieben ermittelt (siehe 3.2.4.3). Angegeben ist die Differenz der gemessenen relativen Fluoreszenzeinheiten gegenüber einem EGFP-negativen Hefestamm.

Die Ergebnisse des Experiments sind in Tabelle 13 zusammengefasst.

Eine Interaktion des Hexamerinrezeptorfragments ABP96 mit verschiedenen Fragmenten des Arylphorin-Proteins konnte im Two-Hybrid-Experiment belegt werden. ABP96-bait zeigt schwache Reporteragenaktivität in Kombination mit Arylphorin-prey. Starke Reporteragenaktivität wurde bei einer Kombination mit Domäne2/3-prey beobachtet, wohingegen die stärkste gemessene Aktivität in Kombination mit der isolierten Domäne-3 (Domäne-3-prey) bzw. in Kombination mit LSP-2 (LSP-2-prey) auftrat. Zwei N-terminal verkürzte Versionen der Domäne-3 (1850-Ende-, 2050-Ende-prey) zeigten keine Interaktion mit ABP96-bait.

Die Fragmente BD01, BD02, BD03 und BD04, die N-terminale Fragmente der Domäne-3 darstellen, sind ebenfalls in der Lage an ABP96 zu binden.

| „Beute“ | Lage der Arylphorinfragmente | Leu+-Phänotyp | β-Gal.-Phänotyp | | EGFP-Expression |
|-----------------|------------------------------|---------------|-----------------|--|-----------------|
| Arylphorin prey | | + | ++ | | 2 ± 0,1 |
| Domäne 1 prey | | 0 | 0 | | 0 |
| C prey | | 0 | 0 | | 0 |
| B prey | | 0 | 0 | | 0 |
| A prey | | 0 | + | | 2 ± 0,1 |
| AI prey | | 0 | + | | 2 ± 0,2 |
| AII prey | | 0 | 0 | | 0 |
| Domäne 2/3 prey | | +++ | +++ | | 7 ± 0,1 |
| Domäne-3 prey | | +++ | +++ | | 12 ± 0,8 |
| BD01 prey | | ++ | ++ | | 6 ± 0,3 |
| BD02 prey | | ++ | ++ | | 5 ± 0,3 |
| BD03 prey | | ++ | ++ | | 5 ± 0,3 |
| BD04 prey | | ++ | ++ | | 5 ± 0,6 |
| 1850-Ende prey | | 0 | 0 | | 0 |
| 2050-Ende prey | | 0 | 0 | | 0 |
| LSP-2 prey | — | +++ | +++ | | 13 ± 1,9 |
| TmHex2i prey | — | 0 | 0 | | 0 |
| ABP96 prey | — | 0 | 0 | | 0 |







Tab. 13 Ergebnisse des Two-Hybrid-Experiments-1

Der Hexamerinrezeptor ABP96 wurde im Two-Hybrid-Experiment mit verschiedenen Fragmenten des Arylphorins auf Interaktion getestet. Die Stärke der gefundenen Reporteraktivität (Wachstum auf Leuzin-Mangelmedium, β-Galaktosidaseaktivität) wurde in folgende Kategorien eingeteilt:

+++ - starke Interaktion, ++ - durchschnittliche Interaktion, + - schwache Interaktion, 0 – keine Interaktion. Die Fluoreszenzdifferenz, die bei den Experimenten mit dem EGFP-Reporter gemessen wurde, ist in relativen Fluoreszenzeinheiten (RFU) angegeben.

**b) Interaktionsanalyse von Domäne-3-prey mit verschiedenen „Ködern“
(Experiment-2)**

Verschiedene bait Konstrukte wurden in die beiden Hefestämme EGY48/p8opEGFP/pDomäne-3-prey und EGY48/p8opLacZ/pDomäne-3-prey transformiert. Die weitere Durchführung entsprach dem oben beschriebenen Experiment-1.

| « Köder » | ABP-Fragment | Leu+- Phänotyp | β-Gal- Phänotyp | EGFP- Expression |
|-----------------|--|-------------------|--------------------|---------------------|
| ABP130- bait |  | +++ | +++ | 12 ± 0,7 |
| ABP96- bait |  | +++ | +++ | 12 ± 1,0 |
| ABP64- bait |  | +++ | +++ | 10 ± 1,0 |
| ABP64-187- bait |  | +++ | +++ | 7 ± 0,5 |
| ABP AS 1-200 |  | ++ | ++ | 5 ± 0,1 |
| ABP AS 1-24 |  | ++ | ++ | 7 ± 0,7 |

Tab. 14 Ergebnisse des Two-Hybrid-Experiments-2

Die Domäne-3 des Arylphorins wurde im Two-Hybrid-Experiment mit verschiedenen Fragmenten des Hexamerinrezeptors auf Interaktion getestet. Die Stärke der gefundenen Reporteraktivität (Wachstum auf Leuzin-Mangelmedium, β-Galaktosidaseaktivität) wurde in folgende Kategorien eingeteilt:

+++ - starke Interaktion, ++ - durchschnittliche Interaktion, + - schwache Interaktion, 0 – keine Interaktion.

Die Fluoreszenzdifferenz, die bei den Experimenten mit dem EGFP-Reporter gemessen wurde, ist in relativen Fluoreszenzeinheiten (RFU) angegeben.

Alle sechs getesteten Fragmente des Hexamerinrezeptors zeigen Interaktion mit der Domäne-3 des Arylphorins im Hefe-Two-Hybrid-System.

4.2.2. Charakterisierung der identifizierten „nicht Hexamerin“-Interaktoren des Hexamerinrezeptors

In den oben beschriebenen Two-Hybrid-Screens der cDNA-Bibliothek wurden zwei interessante „nicht Hexamerin“-Interaktoren des Hexamerinrezeptors gefunden - ein „anterior fat body protein“ (AFP) und eine AP-3-delta-Adaptin-Untereinheit. Beide Proteine wurden in einer Reihe von Folgeexperimenten näher charakterisiert.

Die Nukleotid- und die abgeleitete Aminosäuresequenz der beiden bis dato unbekanntenen Bindungspartnern des *Calliphora* Hexamerinrezeptors, „anterior fat body protein“ (CvAFP) und „AP-3 delta Adaptin“ (CvAP-3) wurden in der Genbank veröffentlicht:

- AFP Genbank - Zugriffsnummer AY028616
- AP-3 Genbank -Zugriffsnummer AF329283

4.2.2.1. Charakterisierung von AP-3-delta-Adaptin Sequenzanalyse der identifizierten AP-3 delta-Adaptin-cDNA

Die BlastX- Analyse des Klons ms31 ergab eine 71%ige Identität des abgeleiteten Proteinfragments mit der AP-3-delta-Adaptin-Untereinheit von *D. melanogaster*. Abb. 31 zeigt einen Sequenzvergleich der abgeleiteten Aminosäuresequenz der gefundenen C-terminalen Domäne mit dem *Drosophila*-AP-3-delta-Adaptin (Genbank-Zugriffsnummer AAC14585), einer AP-3-delta-Adaptin-Untereinheit der Maus (Genbank-Zugriffsnummer NP_031486) und der menschlichen AP-3-delta-Adaptin-Untereinheit (Genbank-Zugriffsnummer XP_009242).

Abb. 31 a

```

Cv -----
Dm -----MSLLYECINTVIAVLISIS 19
Mm STNNWVLIKIIKLPFGALTPLEPLRGKKLIEPLTNLIHSTSAMSLLYECVNTVIAVLISLS 291
Hs -----LIEPLTNLIHSTSAMSLLYECVNTVIAVLISLS 269

Cv -----
Dm SGMPNHSASIQLCVQKRLILIEDSDQNLKYLGLLAMSKILKTHPKSVQAHKDLILACLDD 79
Mm SGMPNHSASIQLCVQKRLILIEDSDQNLKYLGLLAMSKILKTHPKSVQSHKDLILQCLDD 351
Hs SGMPNHSASIQLCVQKRLILIEDSDQNLKYLGLLAMSKILKTHPKSVQSHKDLILQCLDD 329

Cv -----ESSYLY 6
Dm KDESIRLRALDLLYGMVSKKNLMEIVKRLLGHMERAEGSAYRDELLYKVIEICAOSSYLY 139
Mm KDESIRLRALDLLYGMVSKKNLMEIVKRLMTHVDKAEGTTYRDELLTKIIDICSSNYQH 411
Hs KDESIRLRALDLLYGMVSKKNLMEIVKRLMTHVDKAEGTTYRDELLTKIIDICSSNYQY 389

Cv VTNFEWYLTVLVELIQLEAGSKHGRLIAEQLLDVAIRVPVVRQFAVNEMTNLLDT---FT 63
Dm VTNFEWYLTVLVELIQLEAGSRHGRLIAEQLLDVAIRVPVVRQFAVNEMTNLLDT---FT 196
Mm ITNFEWYISILVELTRLEG-TRHGHLIAAQMLDVAIRVKAIRKFAVSQMSLLD SAHLVA 470
Hs ITNFEWYISILVELTRLEG-TRHGHLIAAQMLDVAIRVKAIRKFAVSQMSALLD SAHLLA 448

Cv VSSQSNSMYEVLVYAAAWIVGFEFSNELEDAERTLNILLRPRQ--IPGHIOGVFVQKCKKLF 121
Dm VSAQSNSMYEVLVYAAAWIVGFEFAGELEDAEKTLNILLRPRLL--IPGHIOGVYVQNVIKLF 254
Mm SSTQRNGICEVLVYAAAWICGFEFSEHLIQGPQQTLEAMLRPKVTTLPGHIOAVYVQNVVKLY 530
Hs SSTQRNGICEVLVYAAAWICGFEFSEHLQEPHHTLEAMLRPRVTTLPGHIOAVYVQNVVKLY 508

```

| | | |
|----|--|-----|
| Cv | TRLATTCLENE ^D PNGLIR ^L SDHVL ^E EKLQ ^D FN ^S LDIEVQERANSACILIEMLRA ^Q FNDAN | 181 |
| Dm | ARLATTCL ^E LQDL ^F GLVTL ^C CDHVL ^D KLQ ^H FN ^G SDIEVQERANSACMLIEMLRN ^Q LSTST | 314 |
| Mm | ASILQQKEQAA ^D TEAAQ ^E VTLQLL ^V ERL ^P Q ^F VQ ^S ADLEVQERASCILQ ^L VK ^H VQ ^K ----- | 584 |
| Hs | ASILQQKEQAGEA ^E CAQAV ^T QLM ^V DR ^L PQ ^F VQ ^S ADLEVQERASCILQ ^L VK ^H IQ ^K ----- | 562 |
| | | |
| Cv | TA ^C NHNIDFIGSETSETPQQQVS ^I P ^T L ^A E ^I I ^Q E ^M A ^L L ^F A ^G E ^L I ^P V ^A P ^K A ^Q R ^K V ^L P ^D G ^L | 241 |
| Dm | D ^A MAMDTTTEG-----G ^T P ^L A ^E I ^V Q ^E M ^T L ^L F ^T G ^E L ^I P ^V A ^P K ^A Q ^R K ^V L ^P D ^G L | 363 |
| Mm | -----LQAKGVPVAE ^E VSA ^L F ^A G ^E L ^N P ^V A ^P K ^A Q ^K K ^V V ^E P ^E G ^L | 621 |
| Hs | -----LQAKDVPVAE ^E VSA ^L F ^A G ^E L ^N P ^V A ^P K ^A Q ^K K ^V V ^E P ^E G ^L | 599 |
| | | |
| Cv | DLDEWIN-PPPEDESS-----SSSNDE-KEEL | 266 |
| Dm | DLDEWINAPPPEDAAS-----SSSEHDKDEL | 390 |
| Mm | DLDAWIN ^E PPSDSESEDEKPKAIFHEEEPRHTRRRQPEEDEEELARRREARKQE ^Q ANNPF | 681 |
| Hs | DLDAWIN ^E PLSDSESEDERPRAVFHEEEQRRPKHRPSEADEEELARRREARKQE ^Q ANNPF | 659 |
| | | |
| Cv | FVSSSLIRMRQLP ^D ADLVR-----VNPEQ ^I ERQ ^R M ^R -- | 298 |
| Dm | FVSATQAGTGADGGEKRRQSL-----ELTPEQ ^L ERQ ^R M ^A R-- | 425 |
| Mm | YIKSSPSPQKRYQ ^D APGVEHIPV ^V QIDLSVPLKVP ^G MPMSDQYVKLEE ^Q RR ^H R ^Q L ^E K ^D K | 741 |
| Hs | YIKSSPSPQKRYQ ^D TPGVEHIPV ^V QIDLSVPLKVP ^G PLMSDQYVKLEE ^E RR ^H R ^Q L ^E K ^D K | 719 |
| | | |
| Cv | -----L ^T E----- | 301 |
| Dm | -----L ^T E ^Q SNNPHYLKSTPTASGASNADQYDN ^I DDI ^P I | 459 |
| Mm | KRKKKE---KGRRHSSLPTESDE ^D IAPAQRVDIITEEMPENALPSDEDDKDPNDPYRA | 797 |
| Hs | RRKKRKEKEKKGRRHSSLPTESDE ^D IAPAQQVDIVTEEMPENALPSDEDDKDPNDPYRA | 779 |
| | | |
| Cv | ----- | |
| Dm | TELP ^L DMEGVAALRVGITKRS ^D KYLQEQAAQGSKDGKKK ^H KK ^G KK ^S KA ^N ----- | 511 |
| Mm | LDIDLKPLADSEKLPVQ ^K HRNAEAVK ^S PEKEGVLGVEK ^S KK ^P KK ^K KK ^T KEREREK-- | 855 |
| Hs | LDIDLKPLADSEKLP ^I Q ^K HRNT ^E T ^S KS ^P E ^K D-VPMVEK ^S KK ^P KK ^K KK ^H KEKERD ^K EK | 838 |
| | | |
| Cv | ----- | |
| Dm | -----KVAYNSSSESEGE ^P K ^L HIV ^N | 532 |
| Mm | ---KDKKGEDLDFWLSTTPPPAAP ^I PAPSTEELA ^A STITSPKDECEVLKGEEDHD ^V D ^H D | 912 |
| Hs | KKEKEKKAEDLDFWLSTTPPPAPAPAPAP-----VPSTDECEDAKTEAQGEEDDAEG ^Q D | 892 |
| | | |
| Cv | ----- | |
| Dm | TTLDMPEGVMSDS ^E DKDGYDPNDPHRALD ^I E ^L DM----- | 568 |
| Mm | QERKSSRHKKKKHRKEKEEERPRDKKAKKKQVAPLENGAAAE-----EEEP ^I PPMSSY | 968 |
| Hs | QDKKSPKPKKKHRKEKE--ERTK ^G KKK ^S KK ^Q PPGSEEAAGEPVQNGAPEEEQLP ^P ESSY | 950 |

Abb. 31 b Sequenzvergleich zwischen dem delta-Adaptin-Fragment aus *C. vicina* (Cv) und von AP-3 von *D. melanogaster* (Cv/Dm, 71% Identität), AP-3 von *Mus musculus* (Cv/Mm, 41% Identität) und dem menschlichen AP-3 (Cv/Hs, 39% Identität) berechnet mit ClustalW (siehe 3.1.21).

AP-3-mRNA-Expressionsanalyse mittels Northern-Blottings

Die Stadienspezifität der Expression von AP-3-delta-Adaptin-mRNA wurde mittels Northern-Blot Analyse überprüft (siehe 3.1.15.). Das Bibliotheksplasmid pJG4-5 mit der delta-Adaptin-cDNA wurde mit EcoRI linearisiert und eine Digoxigenin-markierte-antisense-RNA-Sonde hergestellt (mit T7-DNA Polymerase). Gesamtfettkörper wurde aus Larven verschiedener Alterstufen, sowie aus Puppen und adulten Fliegen isoliert und die RNA mit der Trizol-Methode isoliert.

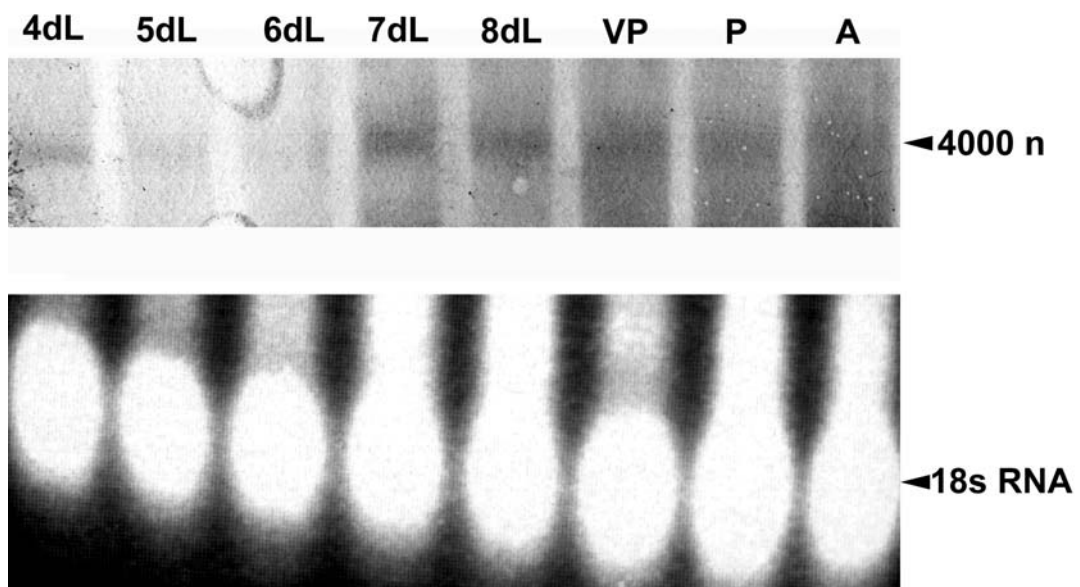


Abb. 32 Northern-Blot-Analyse mit AP-3-delta-Adaptin-Sonde, 4dL – 8dL – Larven 4 bis acht Tage nach Schlüpfen, VP – Vorpuppen, P – Puppen, A – adulte Fliegen. Als Kontrolle ist die Ethidiumbromid-gefärbte 18s-RNA dargestellt.

Die Abb. 32 zeigt das Ergebnis des Northern-Blots. In allen untersuchten Entwicklungsstadien wurde eine einzelne Bande in einer Größe von 4000 Nukleotiden detektiert. Eine Quantifizierung des Signals war nicht möglich.

Interaktionsanalyse von AP-3 mit Hexamerinrezeptorfragmenten

In einem Two-Hybrid-Experiment wurde die Interaktion dieses „Beute“-Proteins mit den verschiedenen konstruierten „Köder“-Fragmenten des Hexamerinrezeptors untersucht.

Der Hefestamm EGY48/pSH18-34 wurde mit verschiedenen Hexamerinrezeptor-bait-Fragmenten und dem im Screen isolierten AP-3-delta-Adaptin-prey-Plasmid transformiert. Der Galaktose induzierbare Leu+- und β-Galaktosidase-Phänotyp wurde überprüft.

| « Köder » | « Beute » | Leu+ Phänotyp | lacZ- Expression |
|----------------|-----------|------------------|---------------------|
| ABP130-bait | AP3-prey | +++ | +++ |
| ABP96-bait | AP3-prey | +++ | +++ |
| ABP64-bait | AP3-prey | +++ | +++ |
| ABP64-187-bait | AP3-prey | 0 | 0 |

Tab. 15 Two-Hybrid-Analyse der Interaktion von AP-3-delta-Adaptin mit verschiedenen Fragmenten des Hexamerinrezeptors. Die Stärke der gefundenen Reporterogenaktivität wurde in folgende Kategorien eingeteilt:
+++ - starke Interaktion,
++ - durchschnittliche I.,
+ - schwache Interaktion,
0 – keine Interaktion.

Die AP-3-delta-Adaptin-Untereinheit zeigt eine starke Interaktion mit ABP130-/ABP96- und ABP64-bait, keine Reporterogenaktivität ist bei einer Kombination mit der verkürzten Form ABP64-187-bait messbar. Dieses Ergebnis ist ein starker Hinweis darauf, dass die AP-3-bindende-Domäne des Hexamerinrezeptors innerhalb des ABP64-Peptids liegt.

4.2.2.2. Charakterisierung des „anterior fat body proteins“ (AFP) von *Calliphora vicina*

Analyse der abgeleiteten AFP-Aminosäuresequenz

Die BlastX-Analyse der cDNA-Sequenz der Klone ms23 und b9/13 ergibt auf Aminosäureebene eine 97%ige Identität mit dem AFP von *Sarcophaga peregrina*. In Abb. 33 ist ein Sequenzvergleich zwischen der gefundenen Aminosäuresequenz und den AFPs von *S. peregrina* (Genbank-Zugriffsnummer BAA99282), *D. melanogaster* (Genbank-Zugriffsnummer JC7250) und dem menschlichen Regucalcin (Genbank-Zugriffsnummer NP_004674) gezeigt. Die gefundene Proteindomäne weist gegenüber den Vergleichsproteinen einen um 39 bzw. 40 AS verkürzten N-Terminus auf.

| | | |
|----|---|-----|
| Cv | -----GNYNENKVYKAKIEGEDLA | 20 |
| Sp | -MSYKVEPLPDSHAELGEGPHWDVATQNLYYVDINAGKLLRNYNENKVYKAKIEGEDLA | 59 |
| Dm | -MSYKVEPLPDSYAGLGEGPHWDVARQSLYYVDLEAGSLLRFDYQNKVYKTKIEGETLA | 59 |
| Hs | MSSIKIECVLPENCRCGESPVWEEVSNLLFVDIPAKKVCRWDSFTKQVQRVTMDAP-VS | 59 |
| | | |
| Cv | GFAVPVEGTTDOFAVGSRRVVIQWDGVSSETAKVLKTLFEVQTGDERFTGNRFNDGKCD | 80 |
| Sp | GFALPVEGTTDOFAVGSRRVVIQWDGISEETAKVTKTLFEVQTGDERFNGNRFNDGKCD | 119 |
| Dm | GFVLPVEGRPQEFVAVGCRRVVIQWDGVS SAKVVRTLFVQIP---LMEKNRINDAKVD | 116 |
| Hs | SVALRQSG---GYVATICTKFCALNWK--EQSAVVLATVDNDKK-----NRFNDGKVD | 108 |
| | | |
| Cv | PRGRLFACTMRYVGD--EFEHRYGELYKYENGGEVEVVKSDVGISNGLAWNEKTKKFYYI | 138 |
| Sp | PRGRLFACTMRYVGD--EFEHRYGELYKYEKGCKIEVVKSNVGISNGLAWNEKTKKFYYI | 177 |
| Dm | PRGRFFGGTMYITCD--EFEHRYGELYRWEAGGQVSVIKGDVGISNGLAWDEKAKKFYYI | 174 |
| Hs | PAGRYFACTMAEETAPAVLERHQGALYSLFPDHHVKYFDQVDISNGLDWSLDHKKIFYYI | 168 |
| | | |
| Cv | DDTDYEVKEYDYDFETGKASNPVVFNLRKISPKDHLLPDGMTIDTEGNLYVATFNHHSI | 198 |
| Sp | DDTDYEVKEYDYDFETGKAINPKVVFNLRKNSPKDHLLPDGMTIDTDGNLYVATFNHGYTI | 237 |
| Dm | DDTDYEVKSYDYDFETGVASNPVIFNLRKNSPKDHLLPDGLTIDTEGNLYVATFNHGYTI | 234 |
| Hs | DLSLSYSDAFDYDLQGTQISNRRSVYKLE---KEEQIPDGMCLDAEGLWVACVYNGGRV | 224 |
| | | |
| Cv | YKINPTTGOVLEIKFPCKQITSAAFGGPNFHLIFVTTSSRFGEPH-----PAGTTYKV | 252 |
| Sp | YKVNPTTGRVLEIKFPCKQITSAAFGGPNLDILYVTTSSRFGEPE-----PAGTTYKV | 291 |
| Dm | YKVNPTTGRVLEIKFPCKQITSAAFGGPNLDILYVTTAAKFDQPA-----PAGTTYKV | 288 |
| Hs | IRLDPVTGKRRLQTVKLPVDKTISCCFGGKNYSEMYVTCARDGMDPEGLLRQPEAGGIFKI | 284 |
| | | |
| Cv | TGLGAKGYPMTKIQL | 267 |
| Sp | TGLGAKGYPMTKIQL | 306 |
| Dm | TGLNATGYPGVNLKV | 303 |
| Hs | TGLGVKGIAPYSYAG | 299 |

Abb. 33 Sequenzvergleich zwischen „anterior fat body“-Proteinen von *Calliphora vicina* (Cv), *Sarcophaga peregrina* (Cv/Sp, 97% Identität), *Drosophila melanogaster* (Cv/Dm, 74% Identität) und menschlichem Regucalcin (Cv/Hs, 39% Identität) erstellt mit ClustalW.

Expressionsanalyse der AFP-mRNA

Die Expression der AFP-mRNA wurde mittels Northern-Blot-Analyse in verschiedenen Entwicklungsstadien und verschiedenen Geweben überprüft. Das Bibliotheksplasmid pJG4-5 mit der AFP-cDNA wurde mit EcoRI linearisiert und eine Digoxigenin-markierte-antisense-RNA-Sonde hergestellt (mit T7-DNA Polymerase).

Gesamtfettkörper wurde aus Larven verschiedener Alterstufen, Puppen und adulten Fliegen isoliert. Aus 7-dL wurden verschiedene Teile des Fettkörpers isoliert und die RNA mit der Trizol-Methode isoliert. Hämocyten wurden folgendermaßen aus 7-dL isoliert: Die Tiere wurden auf Eis anästhesiert. Anschließend wurden die Tiere auf einen eiskalten Objektträger überführt und ein kleiner Schnitt am Abdomen gesetzt. Die ausfließende Hämolymphe wurde mit einer Pipette aufgenommen und in einem Eppendorf-Reaktionsgefäß auf Eis gesammelt. Hämocyten wurden durch Zentrifugation (3000 rpm, 5 min, 4°C) in einer Tischzentrifuge pelletiert, der zellfreie Überstand abgenommen und die Hämocyten mit eiskalter PBS-Lösung zweimal gewaschen und erneut abzentrifugiert. Die RNA-Isolation erfolgte wie oben angegeben.

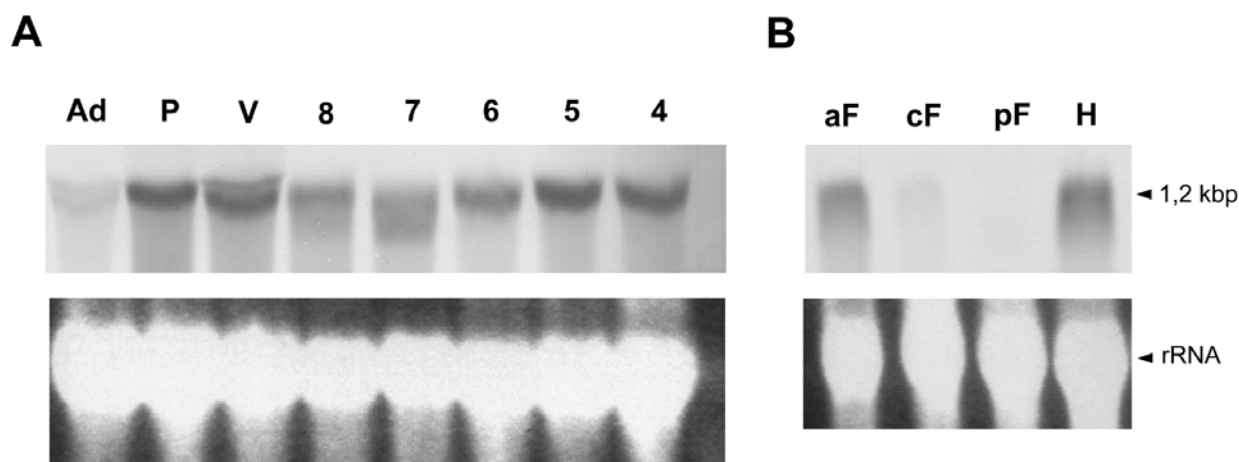


Abb. 34 Northern-Blot-Analyse der AFP-mRNA-Expression. **(A)**, RNA aus gesamtem Fettkörper von Tieren verschiedener Entwicklungsstufen; Ad – adulte Tiere, P – Puppen, V – Vorpuppen, 4-8 – Letztlarven verschiedenen Alters (Tag 4 – 8). **(B)** RNA aus verschiedenen Fraktionen des Fettkörpers und Hämocyten von 7-dL; aF – anteriorer Fettkörper cF- medianer Fettkörper, pF- posteriorer Fettkörper, H – Hämocyten.

Die AFP-mRNA wurde in allen untersuchten Entwicklungsstadien der Schmeißfliege nachgewiesen. Die Untersuchung verschiedener Gewebe von 7dL zeigte, dass AFP-mRNA exklusiv im anterioren Teil des Fettkörpers und in Hämocyten nachweisbar ist.

Lokalisation der AFP-mRNA in Zellen des anterioren Fettkörpers

Um die Zellen zu identifizieren, welche AFP in 7-dL produzieren, wurden Hybridisierungen an Totalpräparaten und Gefrierschnitten von 7-dL von *C. vicina* durchgeführt (siehe 3.1.16). Es wurde die oben beschriebene Dig-markierte-antisense-RNA-Sonde eingesetzt.

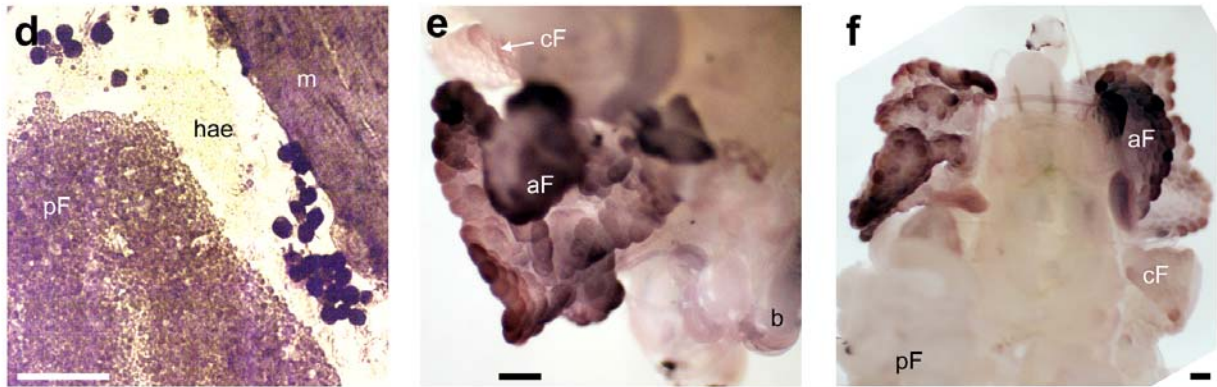


Abb. 35 (d) In-situ-Hybridisierung auf Gefrierschnitten, hae – Hämolymphe, m – Muskel, pF – posteriorer Fettkörper, (e, f) In-situ-Hybridisierung an Totalpräparaten, aF – anteriorer Fettkörper, cF – medianer Fettkörper, pF – posteriorer Fettkörper, b – Hirn. (Balken = 50 μ m)

Die AFP-mRNA war im anterioren Teil des Fettkörpers und in Hämozyten nachweisbar (siehe Abb. 35). Der mediane Fettkörper dagegen zeigt eine vergleichsweise schwache Färbung, der posteriore ist völlig negativ.

Imunolokalisierung von AFP auf Kryoschnitten

Mit einem polyklonalen Kaninchenserum gegen AFP von *Sarcophaga peregrina* (Nakajima und Natori, 2000) wurde eine Immunolokalisation an Ultradünnschnitten (20 μm , siehe 3.3.4.) durchgeführt, um die Verteilung des Proteins in der Larve von *Calliphora vicina* zu überprüfen. Für die Ultradünnschnitte wurden ganze Letztlarven verwendet (7dL), es wurden Längsschnitte angefertigt.

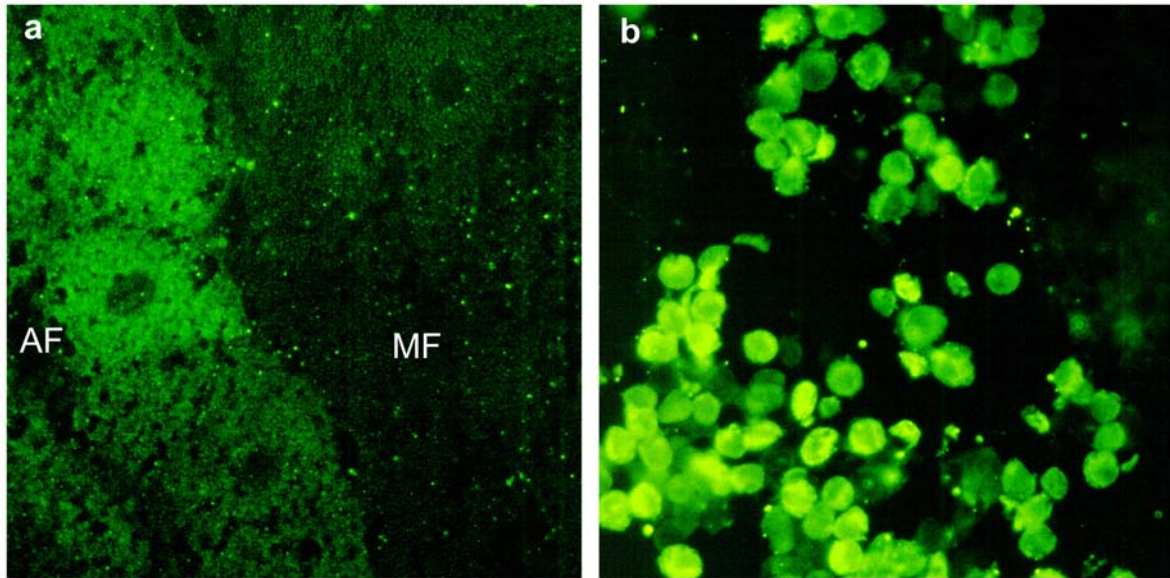


Abb. 36 Immunolokalisation von AFP auf Gefrierschnitten. **(a)** Fettkörperzellen von *Calliphora vicina*-7-dL, **(b)** Hämocyten von *Calliphora vicina*-7-dL. AF – anteriorer Fettkörper, MF- medianer Fettkörper

In den untersuchten Kryoschnitten wurden zwei Zellpopulationen gefunden, die durch den AFP-Antikörper erkannt wurden (siehe Abb. 36). Zum einen wurden die Trophozyten des anterioren Fettkörpers markiert. Eine scharfe Grenze zwischen anterioren Fettkörperzellen, die das Protein exprimieren, und weiter median gelegenen Zellen, die negativ sind, ist in Abb. 36 (a) erkennbar. Des weiteren wurde eine Gruppe von Hämocyten mit einen Durchmesser von 20 μm angefärbt (Abb. 36 (b)).

Western-Blot-Analyse der AFP-Expression und Vergleich mit der Expression des Hexamerinrezeptors

Die Verteilung von AFP in verschiedenen Kompartimenten des Fettkörpers und in Hämozyten wurde mit Hilfe der Western-Blot-Analyse überprüft (siehe Kapitel 3.3.1).

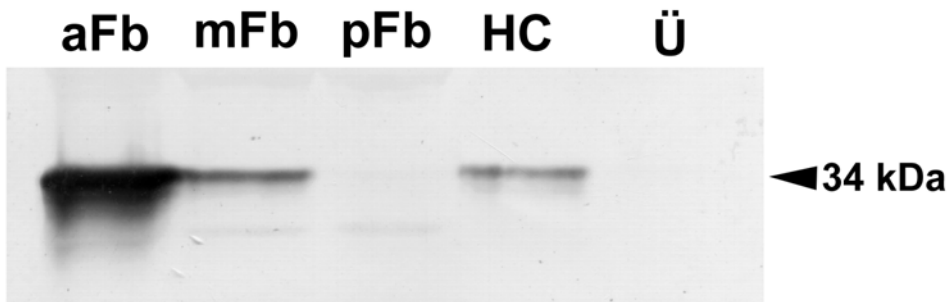


Abb. 37 WesternBlot mit AFP-Antikörper, aFb- anteriorer Fettkörper, mFb- medianer Fettkörper, pFb- posteriorer Fettkörper, HC- Hämozyten, Ü- Überstand der Hämozytenpräparation, zellfreie Hämolymphe.

Dabei zeigte sich, dass AFP tatsächlich vorwiegend im anterioren Teil des Fettkörpers exprimiert wird (Abb. 37). Das schwache Signal, das in der medianen Spur detektiert wurde ist vermutlich auf eine unsaubere Präparation zurückzuführen. Das Vorhandensein dieses Proteins in der Hämozytenfraktion wurde bestätigt, in der zellfreien Hämolymphe wurde kein AFP detektiert.

Ein analoges Experiment, das unter Verwendung eines Antikörpers gegen den Hexamerinrezeptor durchgeführt wurde, zeigt, dass der Rezeptor in allen Teilen des Fettkörpers in annähernd gleicher Menge vorkommt, nicht jedoch in Hämozyten oder in der Hämolymphe (siehe Abb. 38).

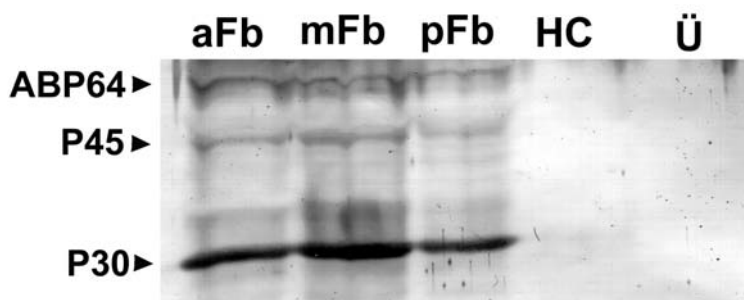


Abb. 38 Western-Blot mit Hexamerinrezeptor-Antikörper, ABP64-, P45-, P30- Spaltprodukte des Hexamerinrezeptors, aFb- anteriorer Fettkörper, mFb- medianer Fettkörper, pFb- posteriorer Fettkörper, HC- Hämozyten, Ü- Überstand der Hämozytenpräparation = zellfreie Hämolymphe.

Interaktionsanalyse von AFP mit Hexamerinrezeptorfragmenten

In einem Two-Hybrid-Experiment wurde diese Interaktion des AFP-„Beute“-Proteins mit den verschiedenen konstruierten Köderfragmenten des Hexamerinrezeptors untersucht (Tab. 26). Der Hefestamm EGY48/pSH18-34 wurde mit verschiedenen Hexamerinrezeptor-bait-Fragmenten und dem im Screen isolierten AFP-prey-Plasmid transformiert. Der Galaktose induzierbare Leu+- und β -Galaktosidase Phänotyp wurde überprüft.

| « Köder » | « Beute » | Leu+- Phänotyp | LacZ- Expression |
|----------------|-----------|-------------------|---------------------|
| ABP130-bait | AFP-prey | +++ | +++ |
| ABP96-bait | AFP-prey | +++ | +++ |
| ABP64-bait | AFP-prey | 0 | 0 |
| ABP64-187-bait | AFP-prey | 0 | 0 |

Tab. 16 Ergebnisse der Two-Hybrid-Interaktionsanalyse Die Stärke der gefundenen Reporterogenaktivität wurde in folgende Kategorien eingeteilt:
+++ - starke Interaktion,
++ - durchschnittliche I.,
+ - schwache Interaktion,
0 – keine Interaktion.

Das „anterior fat body protein“ (AFP) interagiert mit den beiden Konstrukten ABP130-bait und ABP96-bait aber nicht mit ABP64- oder ABP64-187-bait. Dieses Ergebnis ist ein starker Hinweis darauf, dass die AFP-bindende-Domäne des Hexamerinrezeptors innerhalb des P30-Peptids liegt.

AFP/Hexamerinrezeptor-Immunokopräzipitation

Durch ein Immunokopräzipitationsexperiment wurde die im Hefe-Two-Hybrid-System gefundene Bindung zwischen AFP und dem Hexamerinrezeptor bestätigt. Für das Experiment wurden Antikörper gegen den Hexamerinrezeptor an Protein-A-Sepharose gebunden und anschließend mit Homogenaten aus anteriorem und posteriorem Fettkörper inkubiert (siehe Kapitel 3.3.2). Die Detektion erfolgte durch Western-Blot-Analyse mit anti-AFP-Antikörper.

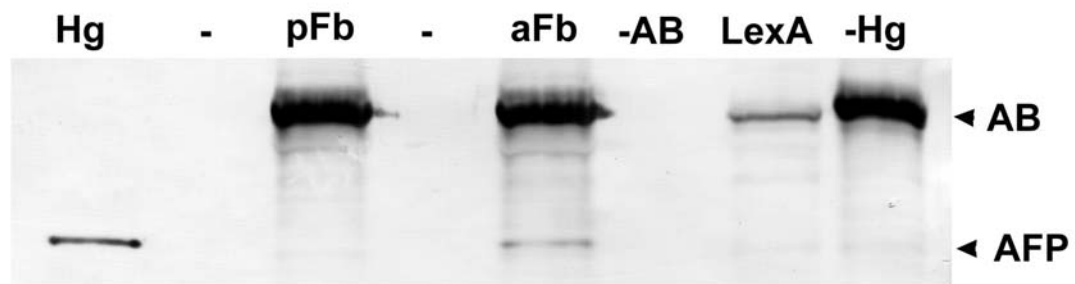


Abb. 39 Immunokopräzipitation von AFP durch Antikörper gegen den Hexamerinrezeptor. Hg- Homogenat aus Fettkörper, pFb- posteriorer Fettkörper, aFb- anteriorer Fettkörper, -AB- ohne Antikörper, LexA- LexA-Antikörper, -Hg- ohne Homogenat. Erklärung, siehe Text.

Das Ergebnis des Immunokopräzipitationsexperiments ist in Abb. 39 dargestellt. Als Positivkontrolle wurde Homogenat aus anteriorem Fettkörper aufgetragen (Hg), als Negativkontrolle wurde das Experiment ohne Homogenat (-Hg), ohne Antikörper (-AB) und unter Verwendung eines Antikörpers gegen ein bakterielles Protein (LexA) durchgeführt. Das Erscheinen der AFP-Bande bei Verwendung von Homogenat aus anteriorem Fettkörper zeigt, dass eine Immunokopräzipitation von AFP mit Antikörpern gegen den Hexamerinrezeptor möglich ist.

4.2.3. Ein 3D-Modell des Arylphorins von *Calliphora*

Zur Überprüfung der Interpretation der Bindungsdaten der Two-Hybrid-Analyse und für die räumliche Kartierung der rezeptorbindenden Domäne wurden 3D-Teilmodelle des Arylphorins von *Calliphora* erstellt.

4.2.3.1. Software für das „Molecular modelling“

Die Firma Glaxo Wellcome Inc. stellt im Internet einen automatisierten Protein-Modelling-Server zur allgemeinen Verfügung und ermöglicht so vergleichendes Proteinmodelling mit dem Programm **ProMod-II** (Guex et al. 1999, Peitsch, 1995). Die erstellten Proteinmodelle sind Homologiemodelle, die durch Vergleich der errechneten Sekundärstrukturen eines Zielproteins mit bekannten 3D-Strukturen ähnlicher Proteine erzeugt werden.

Die so erzeugten Homologiemodelle sind hoch spekulativ und zeigen nur eine Momentaufnahme einer an sich hochdynamischen Proteinstruktur. Dennoch sind sie, bei der Wahl des richtigen Vergleichsproteins, ein nützlicher Ansatzpunkt für die Kartierung von funktionellen Domänen eines Zielproteins.

Die Effizienz des Programms wurde durch Vergleich eines auf Röntgenstrukturanalyse beruhenden 3-D-Modells des Hämoyanins von *Panulirus interruptus* (Abb. 41 A, Volbeda and Hol, 1989) mit einem auf Grund der veröffentlichten Sequenzdaten erstellten Homologiemodells (Abb. 41, B) getestet. Die beiden Modelle sind nahezu identisch - nur geringe Abweichungen sind feststellbar (z.B. Länge des b-Faltblattes 3C).

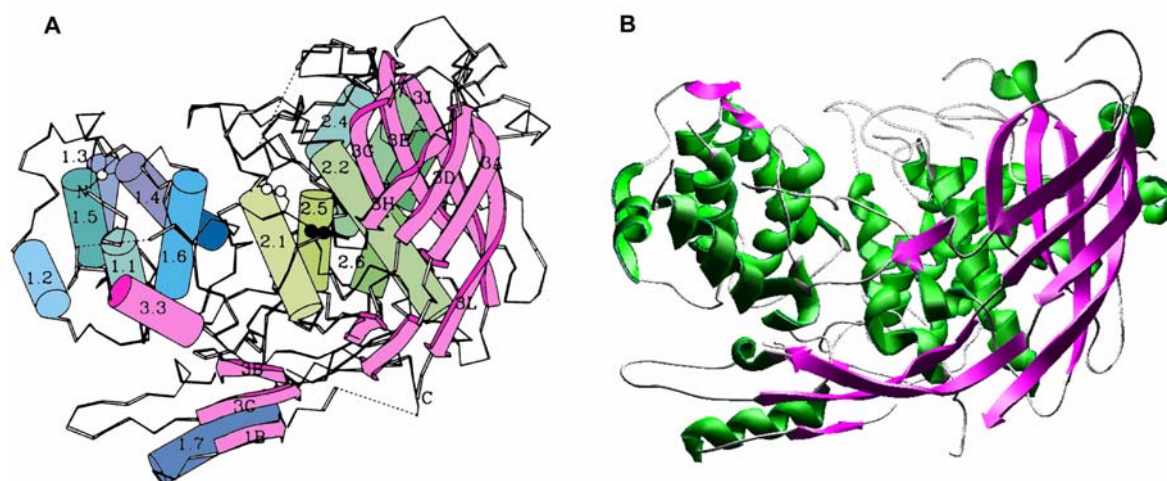


Abb. 40 Vergleich eines Literaturmodells mit einem Homologiemodell erstellt mit ProMod-II, **A**) 3D-Modell einer Hämoyanin-Untereinheit aus *Panulirus interruptus* (Volbeda and Hol 1989). Seitenansicht. **B**) 3-D-Modell derselben Untereinheit errechnet mit der ProMod-II-Software.

4.2.3.2. Das Hämözyanin von *Panulirus* als Vergleichsmodell

Als Vergleichsmodell für die Errechnung der 3D-Struktur des Arylphorins von *Calliphora*, wurde das 3D-Modell des Hämözyanins von *Panulirus* eingesetzt, da elektronenmikroskopische Daten dafür sprechen, dass die räumliche Struktur identisch ist (Markl et al, 1992).

Insekten-Hexamere und Arthropoden-Hämözyanine gehören zu derselben Protein-Superfamilie (Burmester et al, 1998, Burmester and Scheller, 1996, Markl et al., 1992). Sie sind Hexamere aus Monomeren, die aus jeweils drei Domänen aufgebaut sind. Deren struktureller Aufbau ist hoch konserviert.

Im Folgenden wird der Aufbau eines Hämözyanin-Monomers und die Tertiärstruktur des Hexamers erklärt (vergleiche Abb. 43A,B,C und Abb. 41 A).

Das Hämözyanin Monomer ist aus drei Domänen aufgebaut:

die N-terminale **Domäne 1** (blau) besteht aus einem Bündel von sechs α -Helices, die zentrale **Domäne 2** (grün) besteht ebenfalls aus 6 α -Helices, wobei die beiden antiparallelen Helices 2.1 und 2.2, an denen die Kupferbindungsstelle lokalisiert ist, von Bedeutung sind. Die C-terminale **Domäne 3** (margenta) ist ein siebensträngiges β -Fass. Zu beachten sind auch die beiden „Nasen“, die aus der α -Helix 1.7 und den β -Strängen 1B bzw. den β -Strängen 3C und 3B bestehen.

Aufbau eines Hämözyanin Hexamers

Zwei Monomere lagern sich mit einer Kontaktzone, die die α -Helices 1.7 und 2.4 umfaßt, spiegelbildlich zu einem Dimer mit relativ fester Bindung zusammen („tight dimer“, Volbeda and Hol, 1989, siehe Abb. 42, A). Drei Dimere bilden ein Hexamer, so dass der Eindruck eines Aufbaus aus zwei Trimeren entsteht, die spiegelsymmetrisch aufeinanderliegen (siehe Abb. 42 B, C). Der Aufbau eines Trimers ist in Abb. 41 B schematisch dargestellt. Die Untereinheiten eines Trimers sind durch jeweils zwei Kontaktzonen miteinander verbunden. Die erste (1) umfaßt die α -Helix 2.3 und die Regionen direkt davor und dahinter. Die zweite Kontaktzone (2) beinhaltet Aminosäurereste der Domäne 1 des einen Monomers und der Domäne 3 der benachbarten Untereinheit.

Die Bindungen zwischen den übereinanderliegenden Dimeren sind stärker, als die zwischen den flach nebeneinanderliegenden Partnern in einem Trimer.

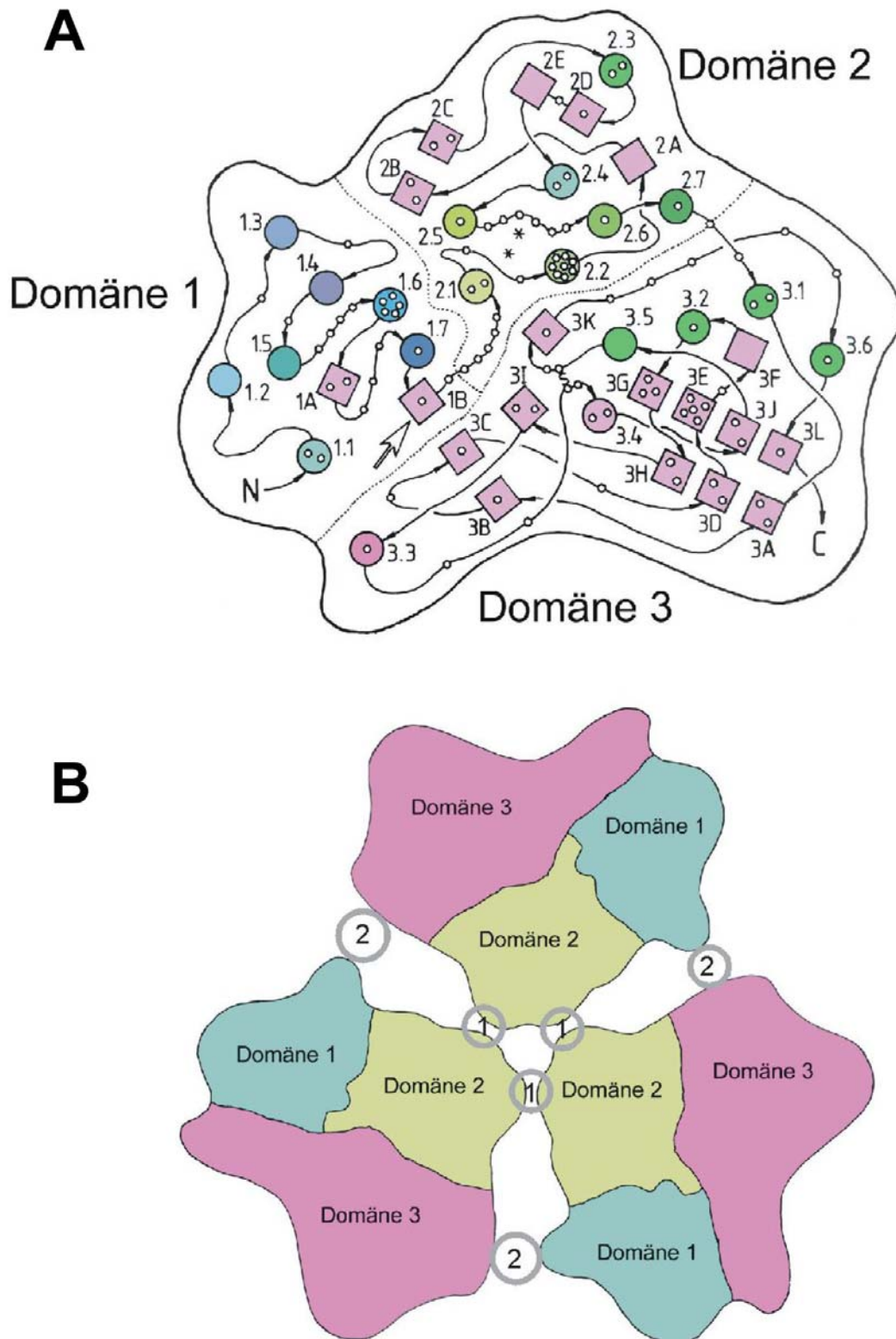


Abb. 41 **A**) Schema der Verteilung der α -Helices (Kreise) und β -Faltblätter (Quadrate) in einer Hämoxyanin-Untereinheit. Aufsicht. Die Kreise geben die Lage von evolutiv hochkonservierten Aminosäuren an (nach Markl et al., 1992), der Pfeil markiert einen Einschub von 82 AS im Arylphorin von *Calliphora*, die keine Ähnlichkeit zum Hämoxyanin zeigen. **B**) Schematische Aufsicht auf ein Hämoxyanin-Trimer, die Hauptkontaktstellen 1 und 2 zwischen den Monomeren sind durch Kreise gekennzeichnet (nach Volbeda and Hol, 1989).

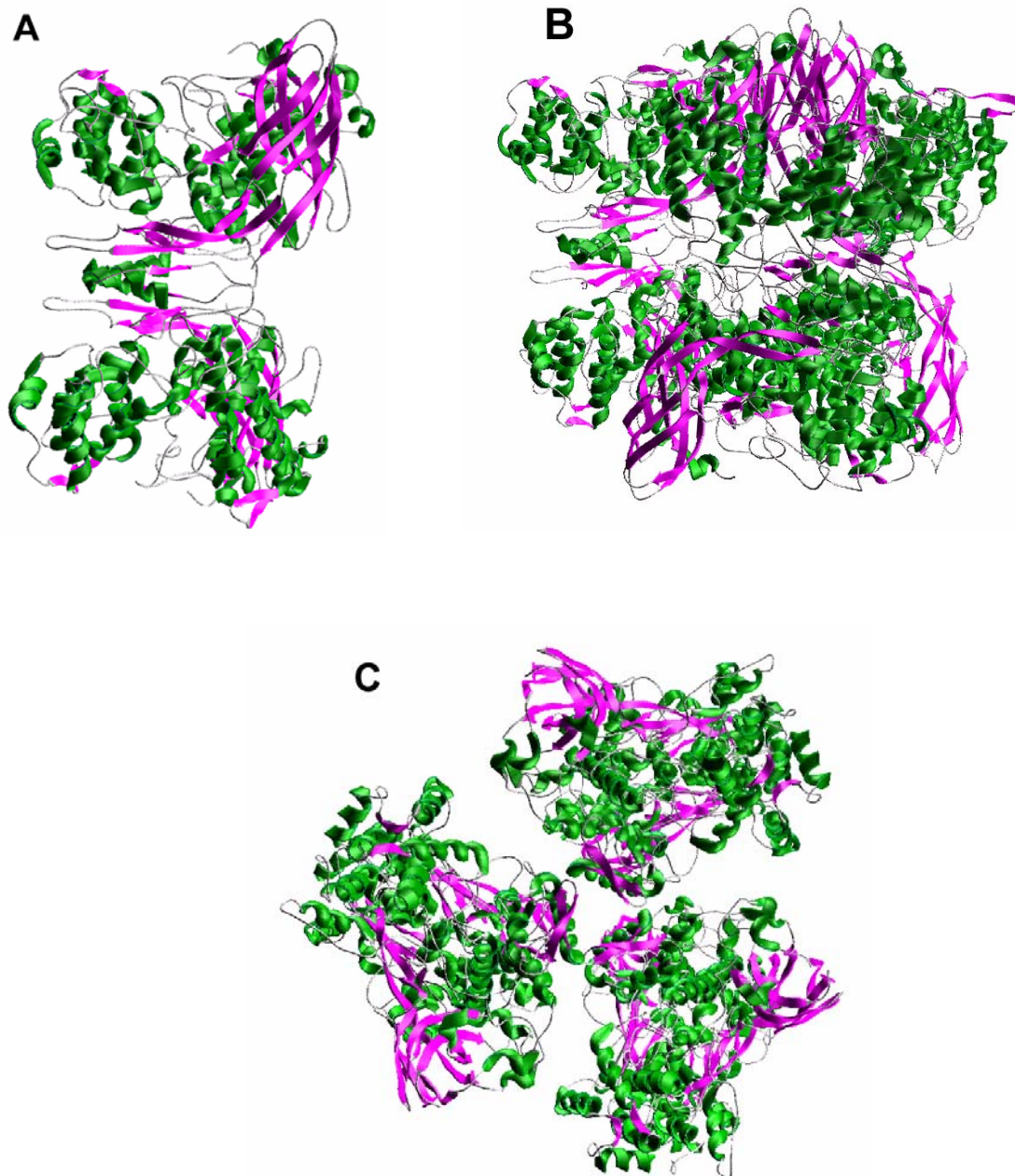


Abb. 42 3D-Modelle der Quartärstruktur des Hämocyansins von *Panulirus*. Für die Erstellung dieser Modelle wurde ein mit ProMod-II erstelltes Homologiemodell des Hämocyansins verwendet. Die Orientierung der Untereinheiten im Hexamer entspricht dem Modell von Volbeda (Volbeda and Holl, 1989). Zum Aufbau der Modelle wurde die Swiss-Pdb viewer 3.7 (b1) Software verwendet. **A)** „tight dimer“ aufgebaut aus zwei Hämocyansin-Untereinheiten, Seitenansicht. **B)** Hexamer, Seitenansicht. **C)** Hexamer, Aufsicht.

4.2.3.3. 3D-Teilmodelle der Domänen des Arylphorins von *Calliphora*

Die Strukturdaten des Hämazyanins von *Panulirus interruptus* und *Limulus polyphemus* wurden benutzt, um mit Hilfe der ProMod-II-Software ein Homologiemodell des *Calliphora* Arylphorins zu erstellen. Die Abb. 43 zeigt die Zuordnung der so errechneten Sekundärstruktur zur Primärstruktur des Arylphorins.

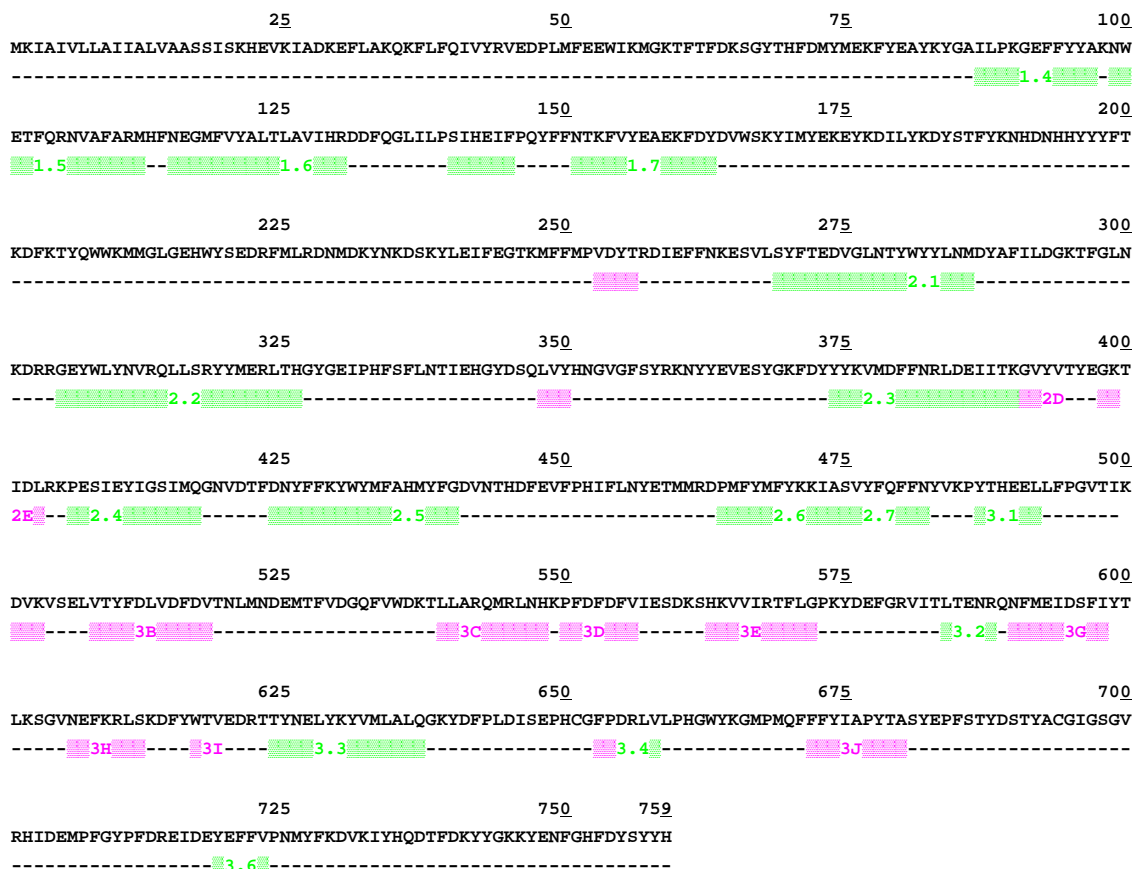


Abb. 43 Zuordnung der durch ProMod-II errechneten Sekundärstruktur zur Primärstruktur des *Calliphora*-Arylphorins (α -Helices grün, β -Faltblätter margenta). Als „Template“ benutzte die ProMod-II-Software verschiedene 3D-Modelle von Hämazyaninen. Die Helices und Falblätter sind entsprechend den homologen Strukturen im Hämazyanin nummeriert.

Da Arylphorin zwischen der Domäne 1 und 2 einen Einschub von 82 AS-Resten besitzt, die keine Beziehung zu der Sequenz des Hämazyanins besitzen, konnte kein 3D-Gesamtmodell erstellt werden. Es wurden zwei Teilmodelle errechnet.

Modell 1 (Abb. 45, A) stellt einen Teil der Domäne 1 dar, Modell 2 (Abb. 45, B) umfaßt die Domänen 2 und 3.

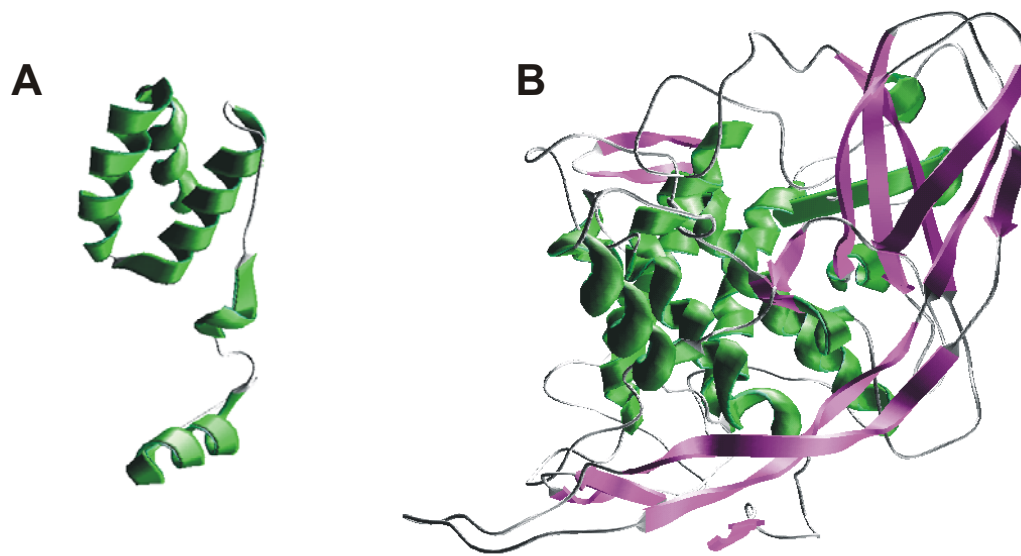


Abb. 44 3D-Modelle des Calliphora-Arylphorins, errechnet mit der ProMod-II-Software. **A)** Teilmodell der Domäne 1, umfasst die Helices 1.4, 1.5, 1.6, 1.7, **B)** Teilmodell der Domänen 2 und 3, umfasst die vollständigen Domänen.

3D-Modell der rezeptorbindenden Domäne und Lage im Trimer

Aufgrund der Daten der Two-Hybrid-Analysen (siehe oben) wurde die rezeptorbindende Domäne des Arylphorins auf 49 AS genau kartiert. Die Bindungsdomäne liegt zwischen den β -Faltblättern 3B und 3C. Die Abbildung 45 zeigt die 3D-Struktur dieser Domäne.

Diese potentielle Bindungsdomäne liegt an der von außen gut zugänglichen Oberfläche des Monomers. Sie besteht aus zwei β -Faltblättern. Die auffälligste Struktur in diesem Modell ist die „Nase“, die aus den β -Faltblättern 3B und 3C und einer langen, verbindenden Schleife besteht. Im Modell des Hämazyenin-Hexamers (siehe Abb. 42 B) ragt diese Struktur seitlich aus dem Komplex hervor und ist für mögliche Interaktoren frei zugänglich.

Aufgrund dieser Daten wurden Two-Hybrid-„Beute“-Plasmide entwickelt, die diese Domäne enthalten (BD-preys, siehe 4.2.1.3). BD01-prey exprimiert die Domäne und umgebende Strukturen (113 AS, siehe Abb. 45), wohingegen BD04-prey nur 49 AS umfasst und die eigentliche Bindungsdomäne, bestehend aus den β -Faltblättern 3B und 3C mit der verbindenden Schleife, als „Beute“ exprimiert.

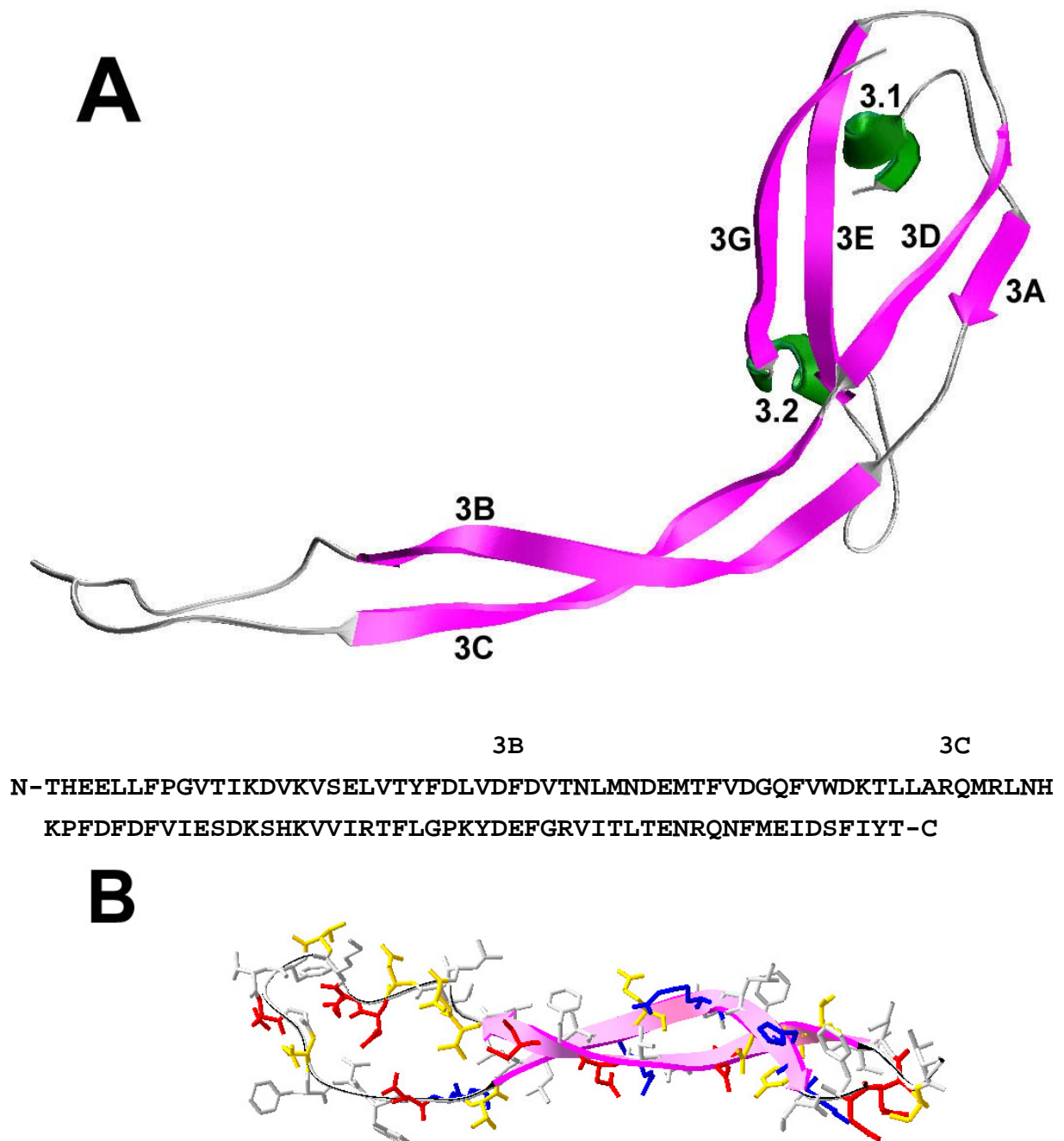


Abb. 45 A) 3D-Modell der Aminosäuren 488 bis 600 des *Calliphora*-Arylphorins, dieses Peptid entspricht dem Fusionsanteil von BD01-prey, Seitenansicht; darunter: Primärstruktur dieser Domäne, α -helicale Strukturen und β -Faltblätter sind farbig markiert; B) Aufsicht auf die Bindungsdomäne, bestehend aus den β -Faltblättern 3B und 3C. Saure AS sind rot, basische blau, polare gelb und unpolare grau dargestellt. Dieses Peptid entspricht dem Peptid, welches in BD04-prey enthalten ist.

4.2.4. Entwicklung eines HTS-Protokolls

Die Interaktion von Hexamerinen mit Hexamerinrezeptoren kann in Hefezellen im Two-Hybrid-Experiment nachgewiesen werden (siehe oben). Dieses System wurde benutzt, um ein Protokoll für eine Hochdurchsatz-Sortiersuche (**high throughput screening - HTS**) zu entwickeln, mit dem große Wirkstoffbibliotheken nach Substanzen durchsucht werden können, die diese Interaktion beeinflussen und somit potentielle Kandidaten für neue Insektizide darstellen.

Das Protokoll wurde für die zur Zeit gängigen 384er-Mikrotiterplatten optimiert. In diesem Protokoll ist der entscheidende biologische Prozeß (Bindung des Arylphorins an den Hexamerinrezeptor) mit einem Fluoreszenz-Signal gekoppelt, das einfach zu detektieren ist. Auf diese Art und Weise kann die Wirkung zahlreicher Pharmaka auf diesen speziellen Prozeß gemessen und potentielle Inhibitoren ermittelt werden. Das Grundprinzip des entwickelten Screens ist in Abb. 52 dargestellt. Dabei wird ein Hefestamm, der EGFP in Abhängigkeit von der Interaktion zwischen zwei Zielproteinen exprimiert, verwendet. Der Effekt von Wirkstoffen auf die EGFP-Expression dient als Detektionsparameter (vergleiche Finney, 1998).

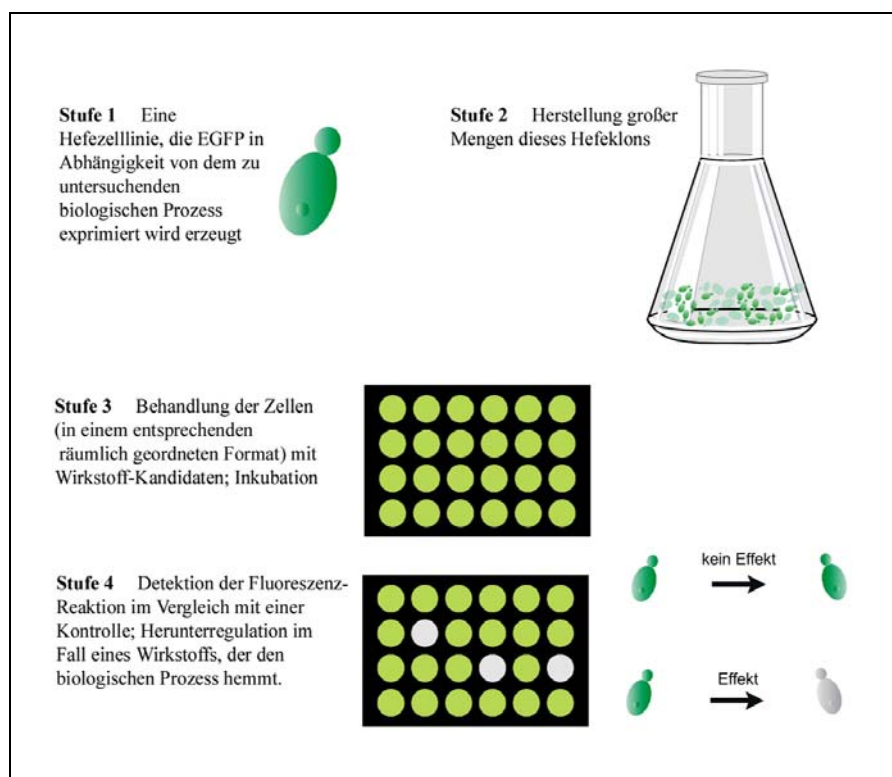


Abb. 46 Verwendung von EGFP in Hefe bei der Wirkstoffsuche

Die im Folgenden beschriebenen Schritte mußten für dieses Protokoll entwickelt und optimiert werden.

4.2.4.1. Konstruktion von neuen Two-Hybrid-Reporterplasmiden für das HT-Screening

Im verwendeten DupLEX-A™-Yeast-Two-Hybrid-System (OriGene) werden die Reportergene Leu2 und lacZ verwendet. Beide Reportergene sind für den Einsatz in einem HTS-Screen ungünstig.

Die Expression des **Leu2-Gens** ermöglicht es Hefestämmen mit einem interagierenden Paar Fusionsproteinen in Leuzin-Mangelmedium zu wachsen. Vorstellbar wäre ein Experiment, bei dem das Wachstum der Hefe in Anwesenheit verschiedener Wirkstoffe über die Messung der optischen Dichte der Hefesuspension detektiert wird. Das Wachstum solcher Stämme in Leuzin-Mangelmedium erfolgt allerdings sehr langsam (Wachstumszeit von $OD_{600} = 0,1$ bis $1,0$ ca. 2 Tage). Damit ist dieses Reporter gen für den Einsatz in einem HT-Screen, wo es auf kurze Inkubationszeiten ankommt, nicht geeignet.

Das **lacZ-Gen** und die dadurch vermittelte β -Galaktosidaseaktivität sind für ein HTS-Screening geeignet und auch schon verwendet worden (Berg et al. 2000). In dem beschriebenen β -Galaktosidase Assay wird die Aktivität des Reportergens lacZ durch die Biokonversion des Substrats Fluorescein-di-(β -D-Galactopyranosid) (FDG) nachgewiesen. Nachteile dieses Protokolls sind, dass dieses Substrat relativ teuer ist und eine Lyse der Zellen und zusätzliche Zugabe von Substrat die Arbeitsabläufe im HT-Screen verkomplizieren. Außerdem ist in dem beschriebenen HTS Protokoll keine interne Kontrolle in den einzelnen Versuchsansätzen vorgesehen, was dazu führt, dass alle myco- und cytotoxischen Substanzen als potentielle Kandidaten gescreent werden.

Wir haben deshalb nach Alternativen zu diesen Reportergenen gesucht und als geeignete Reporterproteine fluoreszierende Proteine gewählt. Es wurden zwei neue Reporterplasmide konstruiert, die als Reportergene ein „**enhanced green fluorescent protein**“ (EGFP) bzw. ein „**red fluorescent protein**“ (RFP) haben. Durch die Verwendung von zwei Hefestämmen, die verschiedene fluoreszierende Proteine exprimieren, ist eine interne Kontrolle in jedem einzelnen Testansatz möglich (siehe unten).

Als Grundgerüst für die neuen Reporterplasmide wurde das lacZ-Reporterplasmid pSH18-34 (= p8op-LacZ) verwendet (Abb. 47). Da keine Sequenzinformationen für dieses Plasmid in den öffentlich zugänglichen Datenbanken und von der vertreibenden Firma zu erhalten waren,

wurden zwei Sequenzierungsprimer entwickelt, um die Insertionsstellen des β -Galaktosidasegens zu sequenzieren (S10, S11). Die Primer wurden so ausgewählt, dass aus der kodierenden Sequenz der Galaktosidase heraus die Insertionsstellen im Plasmid sequenziert werden konnten. Da der LacZ Reportervektor offensichtlich ein vollständiges lacZ Gen enthält wurden die Sequenzinformationen aus dem β -Galactosidasegen von *E.coli* entnommen (Genbank-Zugriffsnummer AF105229).

Aus den gewonnenen Sequenzinformationen wurden zwei Primer abgeleitet, um den Vektor, ohne Reportergen, zu amplifizieren (A24, A25).

Für die Amplifikation der vollständigen kodierenden Sequenzen von EGFP und RFP wurden zwei Primerpaare entwickelt (EGFP: A26, A27; RFP: A28, A29). Als Template für diese PCR-Reaktionen dienten die Plasmide pEGFP-N2 und pRFP (Clontech). Die amplifizierten Fragmente trugen am 5'-Ende eine „Kozak“-Sequenz, gefolgt von der cDNA für das entsprechende Fluorochrom. Am 3'-Ende wurde ein Stop-Codon angehängt.

Für die Konstruktion des Reporter-Plasmids wurde das EGFP, bzw. RFP cDNA Fragment in einer blunt end Ligation in das Vektorfragment (ohne lacZ) ligiert. Da diese Ligationsreaktion ungerichtet war, d.h. keine Orientierung des Inserts bevorzugt war, wurde die richtige Orientierung durch Sequenzierung der Insertionsstelle überprüft (Primer: S12).

Um die Funktionalität der potentiellen EGFP/RFP-Reporterplasmide zu testen, wurden sie in den Hefestamm EGY48/pSH17-4 transformiert und die Zellen auf Glu/CM -Ura,-His Hefe-Selektionsplatten ausgestrichen. Dieser Stamm aktiviert Reportergene sehr stark. Die Hefekolonien wurden unter Blaulicht durch einen Rotorange-Filter betrachtet. Hefezellen, die EGFP bzw. RFP exprimieren fluoreszieren unter diesen Bedingungen grün bzw. rot.

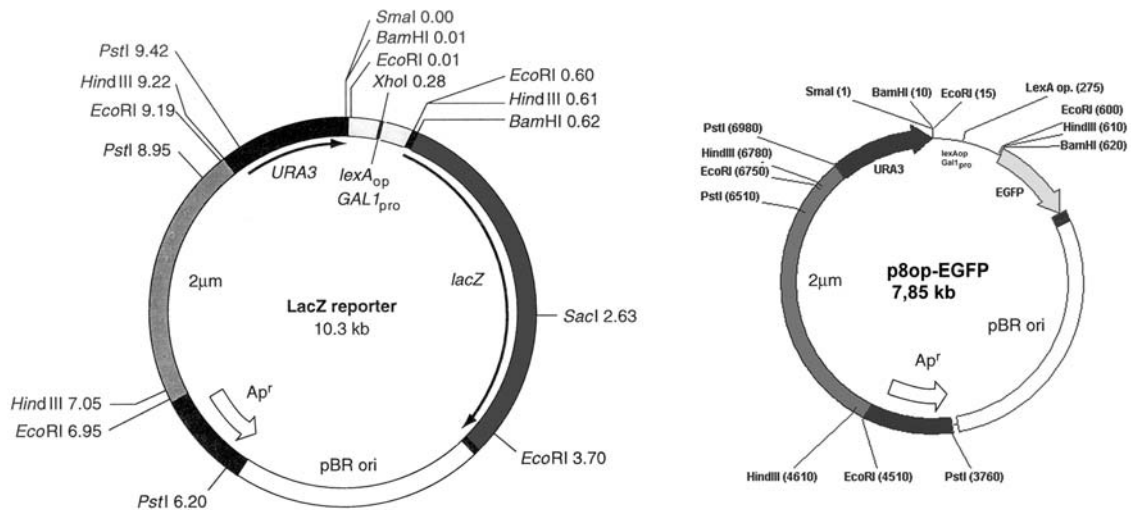


Abb. 47 Karte des LacZ Reporterplasmids pSH18-34 und des daraus abgeleiteten Reporterplasmids p8op-EGFP

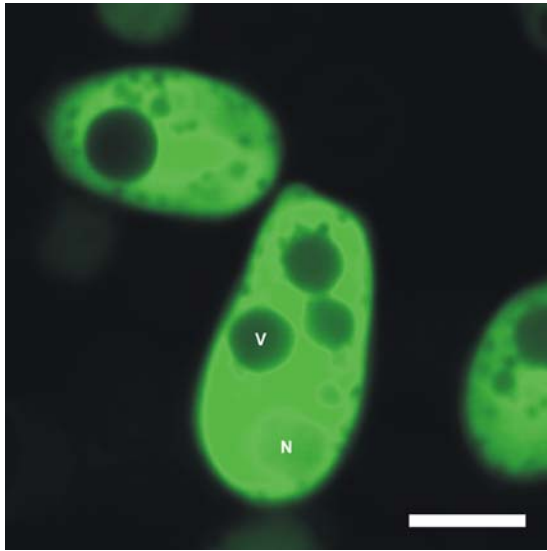
Es wurden drei funktionelle EGFP-Reporterplasmide und ein funktionelles RFP-Reporterplasmid isoliert. Die Plasmide wurden **p8op-EGFP** bzw. **p8op-RFP** genannt. Die Eigenschaften der neuen Reporterplasmide sind im Folgenden beschrieben.

4.2.4.2. Struktur und Eigenschaften von p8op-EGFP und p8op-RFP

Das p8op-EGFP-Reporterplasmid enthält acht Operatoren für LexA-Bindung (LexAop) innerhalb eines schwachen GAL1-Promotors (Gal1_{pro}). Die Operatoren kontrollieren die Expression des EGFP-Gens, ein modifiziertes GFP aus *Aequorea victoria* (GFPmut1, Cormac et al. 1996) mit verstärkter Fluoreszenz. Das Plasmid besitzt einen Ura3-Selektionsmarker, einen 2 μm „origin of replication“ für die Vermehrung in *S. cerevisiae*, das Ampicillinresistenzgen (Amp^R) und den pBR322 „origin of replication“ für die Vermehrung in *E. coli*. Das Plasmid kann in allen LexA-basierenden Two-Hybrid-Systemen als Reporter eingesetzt werden (z.B. MATCHMAKER-LexA-Two-Hybrid-System, Clontech, DupLEX-A-Yeast Two-Hybrid-System, OriGene).

Der neue Reporter ermöglicht ein verkürztes Screening von Two-Hybrid-Bibliotheken und eine einfache Quantifizierung der Stärke einer Interaktion durch Messung der Fluoreszenzintensität der transformierten Hefestämme. Der Aufbau des Grundgerüsts des Reporterplasmids **p8op-RFP** ist identisch mit p8op-EGFP. Als fluoreszierendes Reporterprotein besitzt dieser Vektor das „red fluorescent protein“ aus der Indopazifischen Seeanemone (*Discosoma spec*).

A



B



Abb. 48 A) Hefezellen, die EGFP exprimieren (V-Vakuole, N-Nucleus).
B) Hefezellen mit RFP-Expression (Konfokales Mikroskop, FITC/TRITC Filter).

Die oben beschriebenen Hefestämme wurden mit Hilfe der konfokalen Laser Scanning Mikroskopie untersucht. Für den EGFP exprimierenden Stamm wurde ein FITC-, für RFP ein TRITC-Emmissionsfilter verwendet. Dabei zeigte sich, dass das Zytoplasma und der Zellkern der Hefezellen stark angefärbt sind, während die Vakuolen, vermutlich wegen des abweichenden pH-Werts, negativ sind (Abb. 48).

Einige Eigenschaften der fluoreszierenden Proteine sind in Abb. 49 und Tab. 17 gezeigt.

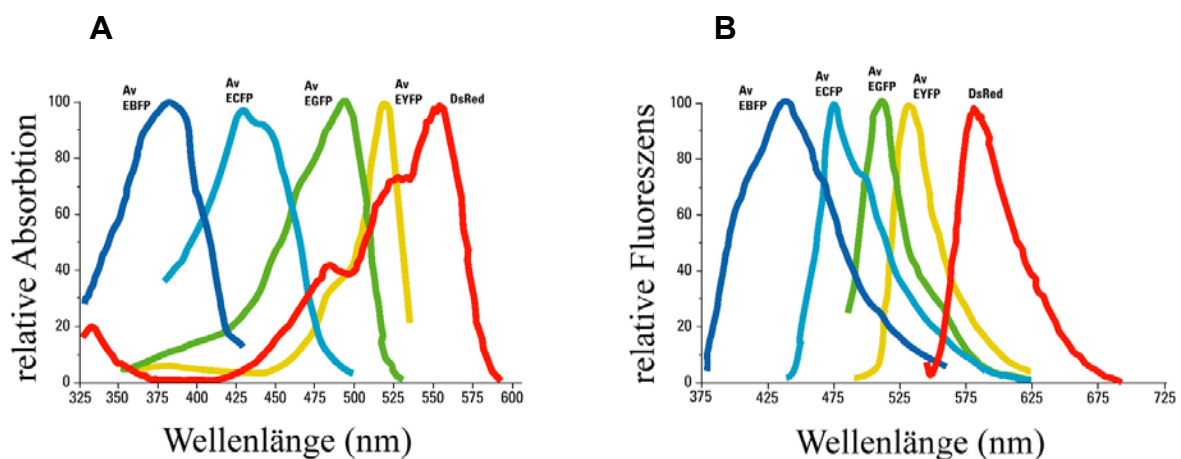


Abb. 49 Absorptions-/Anregungs- und Emissionsspektren verschiedener fluoreszierender Proteine: EBFP, ECFP, EGFP, EYFP (aus *Aequorea victoria*) und DsRed (aus *Discosoma sp.*). Die Kurven wurden normalisiert, die Höhe der jeweiligen Kurve gibt nicht die relative Signalstärke pro Fluorophor an (aus Living Colors User Manula, Clontech).

| Fluor. Protein | Erreg./Emmiss. Maxima (nm) | Extinktionskoeffizient | Quantenausbeute | Referenz |
|----------------|----------------------------|------------------------|-----------------|------------------|
| DsRed | 558/583 | 22 500 | 0,23 | Matz et al, 1999 |
| EGFP | 488/507 | 55 000 | 0,60 | Clontech |

Tab. 17 Fluoreszierende Proteine, Eigenschaften

Fluoreszenzmessung von EGFP und RFP in Mischungen

Für das entwickelte Protokoll ist es wichtig, dass die Fluoreszenzintensität beider Fluorochrome in Mischungen getrennt voneinander bestimmt werden kann. Die Anregungs- und Emissionsspektren der beiden fluoreszierenden Proteinspezies EGFP und RFP sind in Abb. 50 dargestellt. Während sich die Absorptionskurven über einen weiten Bereich überschneiden, sind die Emissionsmaxima deutlich getrennt. Eine getrennte Messung beider Fluorochrome in einer Mischung sollte also möglich sein. Für die Testmessung wurden drei Hefestämme ①EGY48/p8op-LacZ/pSH17-4, ②EGY48/p8op-EGFP/pSH17-4 und ③EGY48/p8op-RFP/pSH17-4 in Glu/CM -Ura, -His Flüssigmedium bis zu einer OD₆₀₀ von 1,0 gezogen. Stamm ① exprimiert kein Fluorochrom, Stamm ② exprimiert konstitutiv EGFP und Stamm ③ RFP. Aliquots von Stamm ② und ③ wurden im Verhältnis 1:1 gemischt. Die Messung wurde mit einem Fluoreszenzreader durchgeführt (Fluoroskan-Ascent, Fa. Labsystems). Als Filtersätze wurden verwendet:

| | Anregungswellenlänge (nm), Filterbreite [nm] | Emmissionswellenlänge (nm), Filterbreite [nm] |
|------|---|--|
| EGFP | 485 [10] | 520 [20] |
| RFP | 525 [10] | 590 [10] |

Tab. 18 Verwendete Filtersätze für die Fluoreszenzmessung

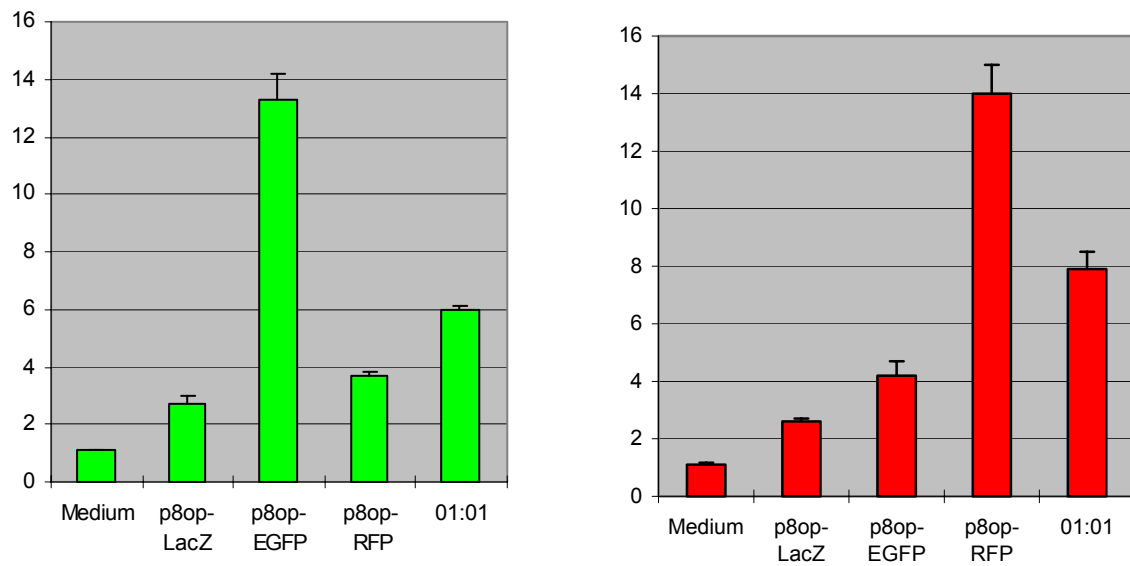


Abb. 50 Fluoreszenzmessung von Hefestämmen, die EGFP und RFP exprimieren. Die verwendeten Reporterplasmide im betreffenden Hefestamm sind angegeben. Links - Messung EGFP-, rechts - Messung RFP-Fluoreszenzintensität (Angabe in relativen Fluoreszenzeinheiten).

Die gemessenen Fluoreszenzintensitäten des EGFP-Stammes bei der RFP-Messung und die Intensitäten des RFP-Stammes bei der EGFP-Messung liegen nur wenig über der Intensität des Kontrollstammes. Das verwendete Meßsystem ist also geeignet die Fluoreszenzintensität der beiden Fluorochrome in einer Mischung getrennt zu messen.

4.2.4.3. Identifizierung eines geeigneten Hefestamms - die optimale Kombination von bait und prey

Ein Hefestamm, der in einem HT-Screen eingesetzt werden soll, sollte eine möglichst hohe Fluoreszenz in Abhängigkeit der Interaktion zwischen Köder (Rezeptor) und Beute (Arylphorinfragment) zeigen. Die Ergebnisse der Interaktionstests mit dem lacZ-Reporter ergaben, dass eine Kombination von ABP130-bait bzw. ABP96-bait mit einem Beuteplasmid, das die vollständige Domäne-3 des Arylphorins als Fusionsprotein exprimiert, die stärkste Aktivierung des lacZ-Reportergens bewirkte (siehe Tab. 23, Ergebnisteil). Um die Köder/Beute Kombination zu ermitteln, die eine maximale EGFP-Expression induziert, wurde der Hefestamm EGY48/p8op-EGFP mit verschiedenen Köder/Beute Kombinationen transformiert.

| Nr. | Reporter | Köder | Beute | Fluoreszenz (RFU) |
|-----|-----------|-------------|----------------|-------------------|
| 1 | pSH18-34 | ABP130-bait | Domain3-prey | 10 ± 0,8 |
| 2 | p8op-EGFP | ABP130-bait | Domain2/3-prey | 10 ± 1 |
| 3 | p8op-EGFP | ABP130-bait | ms26 | 10 ± 0,5 |
| 4 | p8op-EGFP | ABP130-bait | ms21 | 9 ± 1 |
| 5 | p8op-EGFP | ABP96-bait | Domain3-prey | 12 ± 1,1 |
| 6 | p8op-EGFP | ABP96-bait | Domain2/3-prey | 10 ± 0,2 |
| 7 | p8op-EGFP | ABP96-bait | ms26 | 10 ± 0,9 |
| 8 | p8op-EGFP | ABP96-bait | ms21 | 9 ± 0,7 |

Tab. 19 EGFP-Expressionsversuch zur Ermittlung eines geeigneten Hefestamms für HT-Screening

Das Ergebnis dieses Experiments zeigt, dass eine Kombination von ABP96-bait und Domäne-3-prey die stärkste Interaktion im Two-Hybrid-System zeigt. Ein Hefeklon mit dieser „Köder-Beute“ Kombination wurde als **Teststamm** für das HT-Screening gewählt.

Test:**Induktion der EGFP-Synthese des Hefestamms EGY48/ABP96-bait/Domäne-3-prey durch Galaktose, Repression durch Glukose**

Um zu überprüfen, ob die gefundene Aktivierung des Reportergens EGFP ursächlich mit der Interaktion zwischen Hexamerinrezeptor und Arylphorin in der Hefe zusammenhängt, wurden 10 unabhängige Klone des Hefestamms EGY48/p8op-EGFP/ABP96 bait/Domäne-3-prey parallel in Glu/CM -Ura,-His,-Trp Flüssigmedium (Repression der „Beute“-Expression) und in Gal/Raff/CM -Ura,-His,-Trp Flüssigmedium (Aktivierung der „Beute“-Expression) auf eine OD_{600} von 1,0 gezogen (späte logarithmische Wachstumsphase). Anschließend wurde die Fluoreszenz ausgelesen. Das Ergebnis ist in Abb. 51 dargestellt.

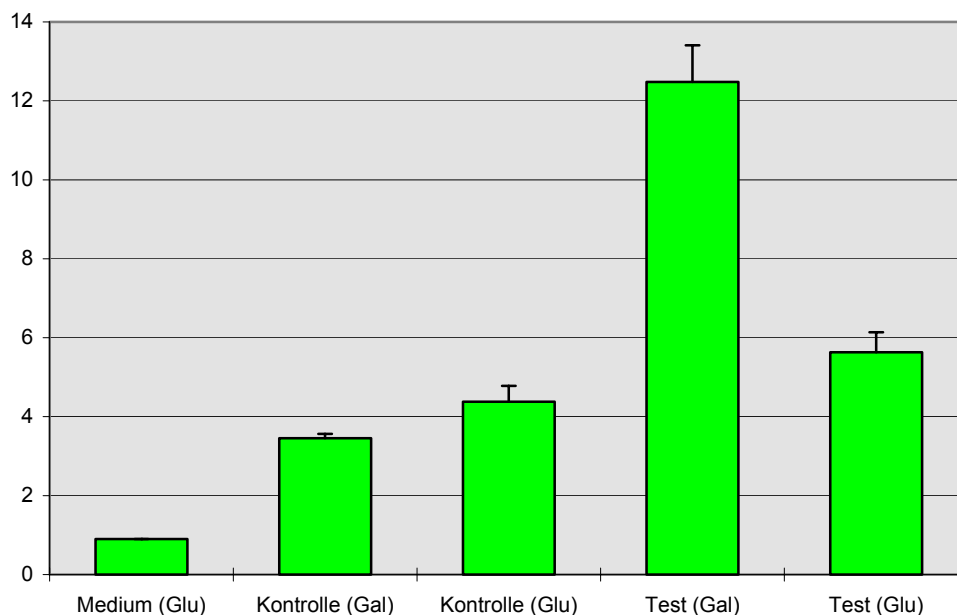


Abb. 51 Induktion der EGFP-Expression mit Galaktose, Gal - Galaktose-Medium, Glu – Glukose-Medium, (Fluoreszenzintensität in RFU), Kontrolle – Hefestamm ohne EGFP-Reporterplasmid.

Die gemessene Fluoreszenzintensität des Teststammes ist unter aktivierenden Bedingungen (Galaktose-Medium) ungefähr doppelt so hoch, wie unter nicht aktivierenden Bedingungen. Die Induktion mit der „Beute“-Expression und in Abhängigkeit davon eine Erhöhung der EGFP-Expression durch Galaktose-Medium ist möglich.

4.2.3.4. Das Protokoll

In der Abb. 52 ist das Prinzip des endgültigen HT-Screening Protokolls dargestellt. Das Protokoll ist einfach, erfordert relativ wenige Arbeitsschritte und ist problemlos auf einer gängigen HTS-Anlage etablierbar.

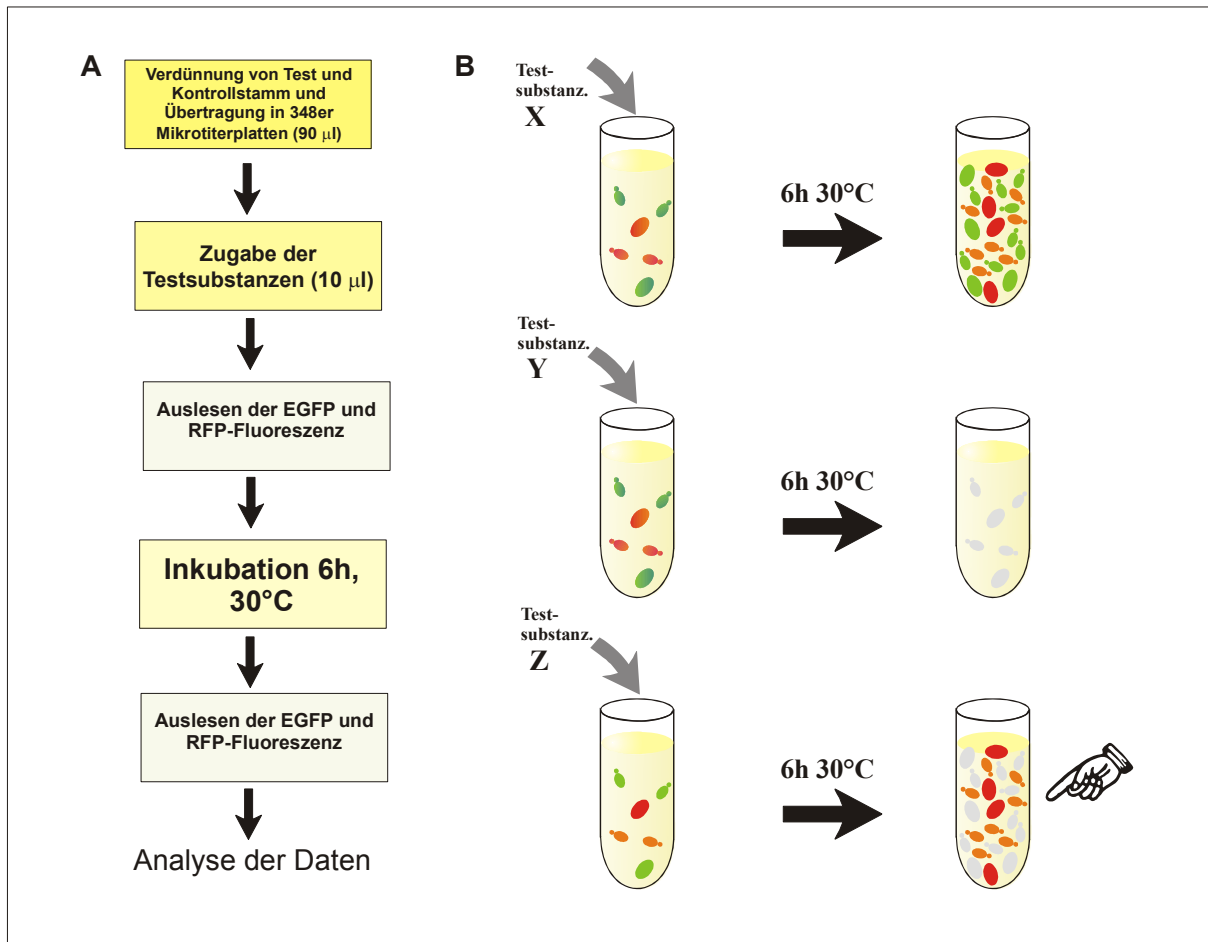


Abb. 52 Prinzip des Two-Hybrid-Screens:
 A) Flussdiagramm, B) Ergebnisse bei Zugabe einer neutralen Substanz X, einer cytotoxischen Substanz Y und einer Substanz, die die Interaktion von Köder und Beute inhibiert, Z.

Es werden zwei Hefestämme eingesetzt:

- 1) Ein **Kontrollstamm** exprimiert konstitutiv RFP (EGY48/p8op-RFP/pSH17-4).
- 2) Ein **Teststamm** exprimiert EGFP aufgrund der Interaktion zweier Zielproteine, in unserem Fall Arylphorin und Hexamerinrezeptor (EGY48/p8op-EGFP/ABP96-bait/Domäne-3-prey).

Eine Mischung beider Stämme wird mit den zu testenden Wirkstoffen versetzt und in Galaktosemedium mehrere Stunden inkubiert. Vor und nach dieser Wachstumsphase wird die Fluoreszenzintensität der beiden Fluorochrome gemessen.

Bei Zugabe einer neutralen Substanz (X = Kontrolle, siehe Abb. 52), die keinen Einfluß auf das Wachstum der Hefe oder auf die Interaktion der beiden Zielproteine hat, ist ein Anstieg der Fluoreszenzintensität beider Fluorochrome zu messen.

Wenn der zugesetzte Wirkstoff das Wachstum der Hefe hemmt (Y), ist die Fluoreszenzintensität beider Fluorochrome geringer als in der oben beschriebenen Kontrolle. Ein Wirkstoff, der spezifisch die Interaktion der beiden Zielproteine inhibiert (Z), verursacht einen Abfall der Fluoreszenzintensität gegenüber der Kontrolle bei EGFP, wohingegen die RFP-Expression nicht beeinflusst wird. Ein solcher Wirkstoff („Hit“) ist ein Kandidat für weitere Untersuchungen.

Experimenteller Teil, Durchführung:

Die verdünnte Hefesuspension, bestehend aus einer 1:9 Mischung eines Kontrollstammes, der konstitutiv RFP exprimiert (EGY48/p8op-RFP/pSH17-4/pDomäne3-prey) und des Teststammes, der EGFP in Abhängigkeit der Köder/Beute Interaktion exprimiert (EGY48/p8op-EGFP/pABP96-bait/pDomäne-3-prey), wird mit einem automatischen Pipettiersystem in schwarze 384er-Multidropplatten pipettiert (je 90 μ l pro Napf in der Testplatte). Die zu testenden Substanzen werden als lyophilisierter Feststoff in 384er-Multidropplatten geliefert (Substanzplatte). Die Substanzen werden in 20 μ l DMSO gelöst. Davon werden mit einem automatischen Pipettiersystem jeweils 10 μ l aus jedem der 384 Nöpfen entnommen und zu der Hefesuspension in der Testplatte hinzugefügt. Die Platten werden mit einem Deckel verschlossen und 30 min bei 30°C gelagert. In dieser Zeit sedimentieren die Hefezellen am Boden der Nöpfe. Die RFP- und EGFP-Fluoreszenz wird in einem Fluoreszenzreader ausgemessen (Messung 1). Anschließend werden die verdeckelten Platten 6,5 h bei 30°C inkubiert. In dieser Zeit wachsen die Hefen auf eine OD_{600} von 1,0 bis 1,5 heran. Anschließend wird die RFP/EGFP-Fluoreszenz in den Testplatten gemessen (Messung 2). Damit ist der experimentelle Teil des Screens beendet.

PROTOKOLL „TWO-HYBRID-SCREEN - HEXAMERINREZEPTOR“**Vorbereitung – Auswahl eines geeigneten Hefestamms****Tag1:**

10 Kolonien des Hefestamms EGY48/p8opEGFP werden von einer Speicherplatte abgenommen und für eine Übernachtskultur (Glu/CM –ura Flüssigmedium, 30°C, 225 rpm) verwendet.

Tag2:

Am nächsten Morgen werden die Hefezellen mit den Plasmiden, pDomäne1-prey, pABP130-bait transformiert und auf Glu/CM –Ura,-His,-Trp Selektionsplatten ausgestrichen.

Tag5:

Nach drei Tagen werden 30 einzelne Kolonien mit einer Impföse auf Gal/Raff/CM –Ura,-His,-Trp Platten ausgestrichen. Als Kontrolle werden die Hefestämme EGY48/p8opEGFP/pSH17-4/pDomäne1-prey und EGY48/p8opRFP/pSH17-4/pDomäne-1-prey mit ausgestrichen.

Tag7:

Die Intensität der EGFP-Expression der einzelnen Klone wird durch Betrachten der Platten unter Blaulicht durch einen Rotorangefilter oder durch Messung der Fluoreszenz mit einem Fluoreszenzreader bestimmt. Der Stamm mit der stärksten Fluoreszenz wird als Teststamm für den Screen verwendet. Als Kontrollstamm dient EGY48/p8opRFP/pSH17-4/pDomäne-1-prey.

Screen

Pro 384er-Platte werden 35 ml Teststamm-Hefesuspension und 4 ml Kontrollstamm-Suspension angesetzt. Die Start-OD₆₀₀ der Hefesuspension liegt bei 0,1. Das Verhältnis von Test- zu Kontrollstammssuspension liegt bei 9:1.

Test- und Kontrollstamm werden über Nacht in Gal/Raff/CM –Ura,-His,-Trp Flüssigmedium bei 30°C, 225 rpm auf einem Rundschüttler bis zu einer OD₆₀₀ von 1,0 gezogen. Die Hefesuspension wird unter dem Mikroskop betrachtet. Wenn die Hefezellen in der logarithmischen Wachstumsphase sind (Büschelbildung) und keine Kontamination erkannt wird, wird weiter fortgefahren.

Die Zellen werden abzentrifugiert, mit H₂O gewaschen und in frisch zubereitetem Gal/Raff/CM –Ura,-His,-Trp-Flüssigmedium auf eine Start OD₆₀₀ von 0,1 verdünnt. Test- und Kontrollstamm werden im Verhältnis 9:1 gemischt und auf 4°C abgekühlt. Die Suspension wird bei 4°C unter ständigem Rühren bereitgehalten.

10 µl in H₂O gelöste Testsubstanz werden in jedes Gefäß der 384er-Platte mit einem automatischen Pipettiersystem pipettiert. 90 µl Hefesuspension werden zugegeben. Die Platte wird mit einem Deckel verschlossen und nach 30 min Sedimentationszeit eine Messung der Fluoreszenz durchgeführt (Messung 1). Anschließend wird bei 30°C im Dunkeln inkubiert. Nach 6,5 h Inkubation wird die EGFP und RFP-Fluoreszenz in den einzelnen Ansätzen bestimmt. Anschließend werden die Platten entsorgt.

5. DISKUSSION

5.1. Die Suche nach einem larvalen Allatotropin in *Galleria mellonella* – Identifizierung von Arg⁷-Corazonin

Als Ergebnis des Immunoscreenings einer cDNA-Expressionsbibliothek mit polyklonalen Antikörpern gegen Allatotropin von *G. mellonella* (Bogus und Scheller, 1996) wurde eine cDNA isoliert, die ein Arg⁷-Corazonin Pre- Prohormon kodiert (Kapitel 4.1.2.).

Arg⁷-Corazonin wurde erstmals von Veenstra (1989) auf Proteinebene als kardioaktives Peptid in der Schabe *Periplaneta americana* identifiziert. In der Folgezeit wurde dieses Peptid in zwei weiteren Schabenspezies (Veenstra, 1991), bei zwei Lepidopteren (Veenstra, 1991, Hua et al., 2000), in einer Grille (Hua et al., 2000) und auf genomischer Ebene bei *Drosophila melanogaster* (Veenstra, 1994) gefunden. Ein Corazonin-Homolog, bei dem die AS in Position 7 (Arginin) durch Histidin ersetzt ist (His⁷-Corazonin), wurde in den beiden Heuschrecken-Spezies *Schistocerca americana* (Veenstra, 1994) und *Locusta migratoria* (Tawfik et al., 1999) gefunden. Diese Daten weisen darauf hin, dass es sich bei Corazonin um ein weitverbreitetes Insekten-Neuropeptid handelt.

Analyse der Corazonin-cDNA und der davon abgeleiteten Präpro-Hormonsequenz

Die Aminosäuresequenz des Präprohormons von *G. mellonella* zeigt einen ähnlichen strukturellen Aufbau wie die von *D. melanogaster* (Kapitel 4.1.3., Abb. 14). Beide bestehen aus einem 19 AS langen putativen Signalpeptid (19 AS). Es folgt die eigentliche Arg⁷-Corazonin-Sequenz (11 AS), ein Gly, das für die C-terminale Amidierung des Peptids notwendig ist, eine Lys/Arg-Spaltstelle sowie eine Corazonin-Precursor-verwandtes-Peptid (CPRP = Corazonin precursor related peptide) von 80 AS bei *G. mellonella* und 39 AS bei *D. melanogaster*. Im Gegensatz zu den eigentlichen Corazonin-Sequenzen sind die Sequenzen des Signalpeptids und des CPRP sehr verschieden (Kapitel 4.1.4., Abb. 15). Eine ähnliche Situation ist von den Genen der AKH/RPCH-Familie bekannt (Gaede et al., 1997). Man vermutet, dass die einzige Funktion des PRP die ist, dem Präprohormon eine ausreichende Länge für eine erfolgreiche Prozessierung zu verleihen (Linck et al., 1993).

Die der Lys/Arg-Spaltstelle benachbarten Aminosäuren erfüllen die generellen Regeln für Lys/Arg-Spaltstellen bei Neuropeptiden (Rholam et al, 1996, Veenstra et al., 2000):

- keine basischen Aminosäurereste in der Position -8 bis -3 relativ zu der Schnittstelle,
- kein Cys von -8 bis +4, Position +1 ist mit Gly, Ala, Ser, Asp oder Asn besetzt.

Die Southern-Blot-Analysen (Kapitel 4.1.6.) haben gezeigt, dass das Corazonin-Gen von *G. mellonella* in einer Einzelkopie im Genom vorliegt und mit hoher Wahrscheinlichkeit ein Intron mit einem HindIII-Restriktionsfragmentlängenpolymorphismus enthält. Bei *D. melanogaster* ist entgegen der Literatur (Veenstra, 1994) ebenfalls ein Intron vorhanden (Veenstra, persönliche Mitteilung).

Lokalisierung der Corazonin-cDNA und des Peptids

Die Corazonin-mRNA wird bei *G. mellonella* in vier Paaren lateraler neurosekretorischer Zellen exprimiert (Kapitel 4.1.7.). Diese Zellen wurden in allen untersuchten Entwicklungsstadien identifiziert - vom vorletzten Larvenstadium bis zum adulten Tier.

Eine genaue Kartierung der neurosekretorischen Zellen im Hirn von *Lepidopteren* wurde bei der Motte *Manduca sexta* durchgeführt (Nijhout, 1975, Buys und Gibbs, 1981, Copenhaver und Truman, 1986). Dabei wurden fünf Gruppen neurosekretorischer Zellen mit Untergruppen unterschieden. In unserm Zusammenhang interessieren die Gruppen Ia, Ib und III, deren Axone in die retrocerebralen Neurohämalorgane *Corpora cardiaca* und *Corpora allata* ziehen und die in den lateralen Zellen der Gruppe I lokalisiert sind.

Neurone der Gruppe I sind solche, deren Axone in die ipsilateralen Organe laufen.

Eine Gruppe größerer Zellen der Gruppe I (15 - 20 µm Durchmesser) bilden die Untergruppe Ia und kleinere mit einem Durchmesser von 5 - 10 µm die Gruppe Ib. Immunohistochemische Untersuchungen mit Antiseren gegen verschiedene Neuropeptide zeigten, dass die Gruppe Ia nicht homogen ist und führte zur Unterscheidung weiterer Untergruppen (Copenhaver und Truman, 1986, Homberg et. al., 1991, Zitnan et al., 1995).

Die Zellen, deren Axone sich in die kontralateralen Organe verzweigen, wurden als Gruppe III charakterisiert. Neurosekretorische Zellen aus der Gruppe II, IV und V sind in anderen Hirnregionen lokalisiert.

Alle vier Corazonin-produzierenden Zellen von *G. mellonella* gehören zur Gruppe Ia. Die Orientierung und die Zahl ihrer Axone und die Tatsache, dass sie nicht mit einem Antikörper gegen Allatostatin reagieren, unterscheidet sie von der Untergruppe Ia₂ und deutet darauf hin, dass sie zur Untergruppe Ia₁ gehören.

Vier Paare von Corazonin-immunoreaktiven Neuronen wurden auch für die Fliege *Phormia terraenovae* beschrieben (Cantera et al., 1994). Drei gehören zu der Gruppe Ia, wogegen eine mit einer kontralateralen Projektion der Axone zur Gruppe III gehört.

Funktionsanalyse des Corazonins von Galleria mellonella

Die physiologische Rolle von Corazonin ist unbekannt. Das Corazonin-Gen wird bei *G. mellonella* im vorletzten und letzten Larvenstadium, in der Puppe und im adulten Tier exprimiert, ein Hinweis darauf, dass es eventuell eine ähnliche Funktion in allen diesen Entwicklungsstadien erfüllt. Die hohe strukturelle Konservierung - im Vergleich mit anderen Neuropeptiden derselben Größe (z.B. die adipokinetischen Hormone, Gaede et al., 1997) - zeigt, dass es sich um ein evolutionär altes Peptid handelt.

Die unterschiedlichen Zielgebiete der Corazonin-immunoreaktiven Axone deuten auf multiple Funktionen diese Peptids hin. Die feinen Verzweigungen innerhalb des ZNS von *G. mellonella* (Kapitel 4.1.8., Abb. 23) lassen im Zusammenhang mit den Ergebnissen von Untersuchungen an Schaben und Fliegen (Veenstra und Norman, 1993, Cantera et al., 1994) eine Modulation von neuronalen Aktivitäten im ZNS vermuten. Ein ähnlicher modulierender Effekt an einer Nerv/Muskel-Verbindung lässt sich an den verästelten Endigungen der Axone über der Vorderdarm-Oberfläche ablesen. Der größte Anteil des Corazonins wird aber vermutlich in die Hämolymphe sezerniert. Die Nervenendigungen in den *Corpora cardiaca* und die kurzen Verzweigungen in die *Corpora allata* könnten hierbei als Freisetzungsstelle dienen.

Zwei systemische Effekte von Corazonin konnten von anderen Arbeitsgruppen demonstriert werden. Diese Effekte scheinen allerdings speziesspezifisch zu sein.

Der erste identifizierte Effekt, eine Beschleunigung der Frequenz des Herzschlags (daher der Name Corazonin, nach Corazon, span. Herz), konnte bei drei von neun untersuchten Schabenspezies nachgewiesen werden (Veenstra, 1989, Predel et al., 1994).

Der andere bekannte Effekt von Corazonin, die Induktion einer dunklen Pigmentierung, ist bei einem Albinostamm der Heuschrecke *Locusta migratoria* gut dokumentiert (Tawfik et al., 1999), konnte aber nicht bei dem Seidenspinner *Bombyx mori* und der Grille *Gryllus bimaculatus* gefunden werden (Hua et al., 2000).

Beide Effekte wurden in Kooperation mit Prof. Sehnal (Tschechische Akademie der Wissenschaften, Ceské Budejovice) in unserem Labor und in Budweis überprüft.

In einem Experiment mit isolierten dorsalen Körperteilen von *G. mellonella* Vorpuppen konnte nur eine schwache und transiente Stimulation der Herzschlagfrequenz mit hohen Corazonin-Dosen (10^{-6} M) erzielt werden.

Die Injektion von in Rapsöl gelöstem Corazonin (1 mol/100 mg Körpergewicht) in Larven einer Standard- und einer heller pigmentierten Zuchtlinie von *G. mellonella* ergaben keinen Einfluß auf die Pigmentierung und Entwicklung während der folgenden Larvenstadien.

Weiterhin wurden Effekte von Corazonin auf die Produktion von Juvenilhormonen und Ecdysteroiden bei *G. mellonella* unter *in-vitro*-Bedingungen getestet. Juvenilhormon-Produktion durch den *Corpora cardiaca/Corpora allata*-Komplex wurde mit einem „partition assay“ (Feyereisen und Tobe, 1981) und die Ecdysteroid-Produktion mittels eines Radioimmunoassays überprüft. Corazonin in Konzentrationen bis 10^{-5} M im Medium zeigten hierbei keinen klaren Effekt auf die JH- oder Ecdysteroid-Produktion.

Ist Corazonin ein Allatotropin?

Zwei Hinweise deuten darauf hin, dass Corazonin ein Allatotropin bei Larven von *G. mellonella* sein könnte. Zum Einen wurde dieses Neuropeptid durch Immunoscreening einer Expressionsbibliothek identifiziert, wobei Antiseren gegen eine allatotrope Fraktion aus Hirnen von *G. mellonella* verwendet wurden (Bogus und Scheller, 1996). Bogus und Scheller (1996) konnten auch zeigen, dass diese Antikörper die *Corpora cardiaca* erkennen, was gut mit der deutlichen Markierung dieses Neurohämalorgans durch die Corazonin-Antiseren übereinstimmt.

Auf der anderen Seite zeigt die Immunofluoreszenz mit einem Allatotropin-Antiserum eine Reaktion mit zwei Paaren medianer neurosekretorischer Zellen (Scheller und Bogus, 1996). Dies steht im offensichtlichen Gegensatz zu der eindeutigen Identifizierung der Corazonin produzierenden Neurone in der Gruppe Ia₁ der lateralen neurosekretorischen Zellen.

Des weiteren stimmt die errechnete molekulare Masse des Corazonin-Prärohormons (10 kDa) nicht mit der von Bogus und Scheller (1996) identifizierten 20-kDa-Bande des Allatotropins überein.

Die Injektion von Corazonin in frisch geschlüpfte Letztlarven von *G. mellonella* führte selbst bei hohen Konzentrationen nicht zur Ausbildung von Superlarven, was ein Hinweis auf eine allatotrope Aktivität gewesen wäre. Ebenso konnte keine Stimulation der Juvenilhormonproduktion *in vitro* nachgewiesen werden.

Die Tatsache, dass sowohl Juvenilhormon (Penner et al., 1992), als auch His⁷-Corazonin (Tawfik et al., 1992) Einfluß auf Farbänderungen bei der Heuschrecke *Locusta migratoria* haben, könnte ein Hinweis sein, dass diese beiden Hormone evtl. in einer Regulationskaskade wirken. In einer neueren Arbeit (Tanaka, 2000) wurde allerdings gezeigt, dass nach Injektion von Juvenilhormon und Corazonin deutlich voneinander unterscheidbare Farbänderungen hervorgerufen wurden, wobei Juvenilhormon die Synthese von grünen Farbstoffen induziert und Corazonin die von dunkleren Farbstoffen. Dabei werden offensichtlich verschiedene

Farbstoff-Synthesewege aktiviert. Diese Beobachtung kann nicht allein durch einen allatotrophen Effekt von Corazonin erklärt werden.

Als Fazit kann gesagt werden, dass es sich bei Corazonin vermutlich nicht um das gesuchte Allatotropin handelt.

5.2. Analyse der Interaktionen des Hexamerinrezeptors mit Arylphorin und anderen Proteinen

Ein Ziel der vorliegenden Arbeit war den Mechanismus der rezeptorvermittelten Endozytose der Hexamerine genauer zu studieren. Dazu wurden zum Einen die bindenden Domänen des Hexamerinrezeptors von *Calliphora* und seines Liganden Arylphorin mit Hilfe von Two-Hybrid-Experimenten kartiert. Zum Anderen wurden zwei neue Interaktoren des Hexamerinrezeptors identifiziert und ihre Interaktion mit verschiedenen Fragmenten des Rezeptors untersucht.

5.2.1. Konstruktion und Screening einer Two-Hybrid-cDNA-Bibliothek

Zur Identifizierung von Proteinen, die mit dem Hexamerinrezeptor von *C. vicina* interagieren, wurde eine Two-Hybrid-cDNA-Bibliothek hergestellt (siehe 4.2.1.1.). Mit einer Gesamtzahl von 300 000 unabhängigen cDNA-Klonen, die im Leseraster liegen und eine durchschnittliche Länge von 1 kbp aufweisen, kann diese Bibliothek als repräsentativ für die mRNA-Population des Fettkörpergewebes in diesem Entwicklungsstadium angesehen werden (SMART™ cDNA Library-Construction-Kit-User Manual, Clontech).

Die im Rahmen der Screening-Experimente isolierten und analysierten Bibliotheksplasmide enthielten, soweit die Inserts identifiziert werden konnten, in keinem Fall die vollständige cDNA eines Proteins, sondern Fragmente des 3'-Endes. Dies ist eine Konsequenz aus der Verwendung eines poly(T)-Oligonukleotids als Primer für die Erststrangsynthese, der als Startpunkt für eine in diesen Fällen unvollständige reverse Transkriptionsreaktion dient. Eine Erklärungen für das Fehlen von vollständigen Proteinen könnte die Tatsache sein, dass größere Fragmente nicht so effektiv in den Zellkern der Hefe transportiert werden können. Ein weiterer Grund könnte sein, dass sich in den 5'-untranslatierten Bereichen vieler mRNAs Stop-Kodons befinden, die bei der Proteinbiosynthese zu einem vorzeitigen Kettenabbruch führen, wobei kein Hybridprotein gebildet wird. Dies ist zum Beispiel bei einer mRNA Sequenz des *Calliphora* Arylphorins der Fall (Genbank-Zugriffsnummer M76480).

An dem Ergebnis der Screening-Experimente ist eine Eigenschaft des Two-Hybrid-Systems zu erkennen - in einem solchen Experiment findet man Bindungsdomänen aber nur selten vollständige Proteine.

Als „Köder“-Proteine wurden beim Screenen der Bibliothek, Fragmente des Hexamerinrezeptors eingesetzt, um spezifische Interaktoren für verschiedene Domänen dieses Proteins zu identifizieren. Bei der Auswahl der Proteindomänen wurden Fragmente des Rezeptorvorläuferpeptids gewählt, die mit verschiedenen Stufen des Resorptionsprozesses in

Verbindung gebracht werden (Burmester und Scheller, 1997). Zum Einen wurde mit ABP130-bait als Köder gescreent, dem vollständigen Vorläuferpeptid des Hexamerinrezeptors (nur das Signalpeptid am N-Terminus ist deletiert). Das zweite verwendete Köderplasmid - ABP96-bait - enthält die kodierende Sequenz für ABP96. Dieses Peptid ist nach dem Modell von Burmester und Scheller (1997, siehe Abb. 5) der funktionelle Hexamerinrezeptor in der Plasmamembran der Fettkörperzellen.

Insgesamt wurden 17 Hexamerinfragmente unabhängig voneinander in beiden Experimenten als Interaktoren des Hexamerinrezeptors identifiziert. Damit ist nachgewiesen, dass die zwei als „Köder“ verwendeten Rezeptor-Hybridproteine in der Lage sind, in den Zellkern der Hefe zu gelangen, dort an Hexamerinfragmente zu binden und Reportergene zu aktivieren.

Von 17 Hexamerinfragmenten waren 14 Fragmente des Arylphorins. Daneben wurden drei Teilstücke des zweiten bekannten Hexamerins von *Calliphora* - LSP-2 - als Interaktoren identifiziert (Kapitel 4.2.1.2., Tab. 3). In einer früheren Arbeit wurde gezeigt, dass beide Hexamerine von *Calliphora* an denselben Rezeptor binden (Burmester und Scheller, 1997). Diese durch kombinierte Ligand-Immunoblots gewonnenen Ergebnisse werden durch die Tatsache, dass der Rezeptor auch im Two-Hybrid-System in der Lage ist beide Hexamerine zu binden, bekräftigt.

Die Ergebnisse der Two-Hybrid-Screening-Experimente zeigen, dass die Rezeptorbindungsdomäne des Arylphorins in der Domäne-3 des Proteins liegt. Frühere Ergebnisse hatten Hinweise erbracht, dass die Bindungsdomäne in einer Region zwischen den α -Helices 2.2 und 2.3 in der Domäne-2 des Arylphorins lokalisiert ist, da die isolierte Domäne Interaktion mit dem Hexamerinrezeptor im Two-Hybrid-Experiment zeigt (Burmester und Scheller, 2000). Diese relativ schwache Interaktion wurde im Experiment erneut beobachtet (schwache Aktivierung des lacZ-Reporters bei Kombination ABP96-bait/AI-prey, siehe Tab. 13, Kapitel 4.2.1.4.). Keine der im Screen gefundenen Arylphorinfragmente beinhaltet jedoch diese Domäne. Dies und die ungleich stärkere Aktivierung aller getesteten Reportergene durch Fragmente, welche die Domäne-3 beinhalten, machen es unwahrscheinlich, dass dieser Teil der Domäne-2 entscheidend an der Rezeptor/Ligand-Interaktion beteiligt ist.

5.2.2. Kartierung der interagierenden Domänen von Arylphorin und Hexamerinrezeptor

Die Kartierung der interagierenden Domänen von Arylphorin und Hexamerinrezeptor wurde mit Hilfe von Deletionskonstrukten im Two-Hybrid-System vorgenommen, ein Ansatz, der bisher vor allem zur Interaktionsanalyse von Transkriptionsfaktoren verwendet wurde (Van Aelst, 1998, van Crielinge, 1999).

Die rezeptorbindende Domäne des Arylphorins

Die rezeptorbindende Domäne wurde auf 49 AS genau eingegrenzt. In dem 3D-Computermodell des Hexamerin-Monomers (siehe 4.2.3.) zeigt sich, dass diese Domäne an der Oberfläche des Monomers liegt. Dasselbe gilt für das Modell des Hexamers (siehe 4.2.3.2., Abb. 43). Die "Nase", bestehend aus den β -Faltblättern 3B und 3C und der verbindenden Schleife, sind in unserem Modell an der Außenseite des Hexamers exponiert und so dem Rezeptor gut zugänglich. Die Ergebnisse der Two-Hybrid-Analyse passen gut zu dem Homologiemodell des Arylphorin-Monomers bzw. des Hexamers.

Die Ligandenbindungsdomäne des Hexamerinrezeptors

Über die Ligandenbindungsdomäne des Hexamerinrezeptors war bisher bekannt, dass sie im N-terminalen Fragment ABP64 lokalisiert ist (Burmester und Scheller, 1997). Ähnliches gilt für den Hexamerinrezeptor von *Drosophila*, FBP-1, der eine vergleichbare Abfolge von proteolytischen Spaltungen durchläuft (Burmester et al. 2000).

Die Lokalisation der Ligandenbindungsdomäne wurde im Rahmen dieser Arbeit mittels Two-Hybrid-Analyse genauer kartiert (siehe 4.2.1.4.b). Die Ergebnisse (Tab. 14) zeigen, dass die Bindungsaktivität am äußersten N-Terminus von ABP64 liegt.

5.2.3. "Nicht Hexamerin"- Interaktoren des Hexamerinrezeptors

In den Two-Hybrid-Screening-Experimenten mit ABP130- und ABP96-bait wurden nicht nur die beiden bekannten Hexamerin-Interaktoren des Rezeptors identifiziert, sondern auch eine Reihe von neuen möglichen Interaktoren (siehe Kapitel 4.2.1.2., Tab. 4 und 6). Es wurden zwölf Bibliotheksplasmide isoliert und die Inserts ansequenziert. Neun der kodierten Peptide haben keine Ähnlichkeiten zu bekannten Proteinen (b2/3/6/12, ms17/19/31/32/41).

Neben diesen Proteinfragmenten wurde ein typischer "falsch positiver" Klon identifiziert. Der Klon b5 kodiert für den Translations-Elongationsfaktor-2, der in vielen Two-Hybrid-Screens mit verschiedenen Köderproteinen als Interaktor identifiziert worden ist (persönliche Mitteilung, Jäkel, Berlinger, Schäfer).

Zwei Fragmente wurden genauer analysiert, da die abgeleiteten Aminosäuresequenzen Homologien zu bekannten Proteinen aufweisen. Bei dem ersten besteht eine hohe Homologie zu einem „anterior fat body protein“, für das in einer nahe verwandten Spezies eine interessante stadien- und gewebsspezifische Expression beschrieben ist. Das zweite Fragment zeigt eine große Übereinstimmung mit der delta-AP-3-Untereinheit von *D. melanogaster* („garnet“-Genprodukt) und kommt von seiner Funktion her als Interaktor *in vivo* in Frage.

1) Anterior fat body protein (AFP)

In den Screening-Experimenten wurden drei Bibliotheksplasmide isoliert, bei denen die Analyse der 5'- und 3'- Enden der Inserts zeigte, dass sie eine identische Sequenz haben (ms23, b9/13). Die Wahrscheinlichkeit ist groß, dass die drei Plasmide aus einem singulären Ligationereignis hervorgegangen sind. Das cDNA-Insert des Bibliotheksplasmids ms23 wurde vollständig sequenziert (Genbank-Zugriffsnummer AF326959).

Eine BlastX-Analyse des Inserts von ms23 ergab eine 97%ige Identität mit dem kürzlich beschriebenen „anterior fat body protein“(AFP) der Schmeißfliege *Sarcophaga peregrina* (Nakajima und Natori, 2000). Weitere Homologien ergaben sich für das AFP von *D. melanogaster* und das menschliche Regucalcin.

Der Sequenzvergleich mit den drei Proteinen (Abb. 33, Kapitel 4.2.2.2.) zeigt, dass es sich bei ms23 mit hoher Wahrscheinlichkeit um ein am N-Terminus um 39 AS verkürztes Fragment des AFPs von *Calliphora vicina* handelt. AFP ist bisher erst bei *S. peregrina* charakterisiert worden (Nakajima und Natori, 2000). *S. peregrina* und *C. vicina* sind nahe verwandte Arten und gehören beide zur Superfamilie *Oestroidea*.

Bei *S. peregrina* wird das AFP gewebes- und stadienspezifisch ausschließlich im anterioren Teil des Fettkörpers der Larve exprimiert, einem Teil des Fettkörpers, der nach der

Verpuppung relativ schnell abgebaut wird, während Teile des posterioren Fettkörpers bis ins Adultstadium hinein erhalten bleiben (Nakajima und Natori, 2000).

In einer älteren Arbeit beschreiben Butterworth und Rasch einen linearen Gradienten in der Menge der gebildeten Speicherprotein-Granula im Fettkörper von Letztlarven von *D. melanogaster* (Butterworth und Rasch, 1986). Dabei scheint sich mit dem Beginn der Aufnahme von Speicherproteinen aus der Hämolymphe und den als Folge davon auftretenden Speicherprotein-Granula, ein Gradient von anterior nach posterior auszubilden, wobei im anterioren Teil deutlich weniger Protein-Granula gefunden werden, als im posterioren. Die gleiche Beobachtung beschreiben Nakajima und Natori (2000) bei *S. peregrina*, wo im anterioren Teil des Fettkörpers ebenfalls weniger Protein-Granula vorhanden sind.

Über die Funktion des AFPs ist nichts bekannt (Natori, persönliche Mitteilung). Es zeigt jedoch im Gegensatz zu seinem menschlichen Homolog Regucalcin keine Affinität zu Kalzium (Nakajima und Natori, 2000). Die Autoren vermuten, dass die homologen Proteine zwar von einem gemeinsamen Vorläufer abstammen, in Insekten und Vertebraten aber verschiedene Funktionen übernehmen.

Die Interaktion zwischen dem Hexamerinrezeptor und einem Protein, das spezifisch in einem Gewebe exprimiert wird, das nur geringe Mengen an Speicherproteinen resorbiert, kann als Hinweis für eine hemmende Wechselwirkung gedeutet werden.

AFP-prey zeigt im Two-Hybrid-Experiment eine starke Interaktion mit ABP130-bait und ABP96-bait, nicht jedoch mit den kürzeren Fragmenten (siehe Kapitel 4.2.2.2., Tab. 16). Eine Arbeitshypothese könnte sein, dass AFP durch seine Interaktion mit dem C-Terminus des Hexamerinrezeptors diesen im anterioren Fettkörper inaktiviert (siehe Arbeitsmodell, unten).

2) AP-3-delta-Adaptin-Untereinheit

Das cDNA-Insert des im Two-Hybrid-Experiment als Interaktor von ABP130-bait identifizierten Klons ms31 wurde vollständig sequenziert (Genbank-Zugriffsnummer AF329283). Eine BlastX-Analyse des Inserts ms31 ergibt eine 71%ige Identität dieser Domäne mit der entsprechenden Domäne der delta-Adaptin-Untereinheit von *D. melanogaster*, bzw. 41% und 39% Identität mit den entsprechenden Domänen von Maus und Mensch (siehe Sequenzvergleich Kapitel 4.2.2.1., Abb. 31). ms31 enthält demnach ein Insert, das ein Fragment der delta-Adaptin-Untereinheit eines AP-3 Komplexes kodiert (δ -AP-3).

Adaptine sind Adaptor-Proteinkomplexe (APs), die als Verbindungsstück zwischen Clathrin und membranständigen Transportproteinen im Vesikeltransport zwischen den verschiedenen Kompartimenten der Zelle dienen (siehe Review; Kirchhausen, 1999). APs sind

heterotetramere Komplexe mit einer molekularen Masse von ca. 300 kDa, die bei allen eukaryotischen Lebewesen identifiziert wurden. Diese Komplexe sind aus vier verschiedenen Untereinheiten aufgebaut (Hirst et al. 1998). Der AP-3-Komplex besteht aus zwei großen Ketten ($\beta 3, \delta$), einer mittelgroßen ($\mu 3$) und einer kleinen ($\sigma 3$) Kette (Esteban et al, 1997). Abb. 53 zeigt den schematischen Aufbau dieses Komplexes mit einem globulären Kern oder Kopf mit zwei globulären Anhängseln, die als Ohren bezeichnet werden. Die Ohren korrespondieren mit den C-Termini der großen Ketten, die verbindenden Stiele sind flexibel (Heuser und Keen, 1988).

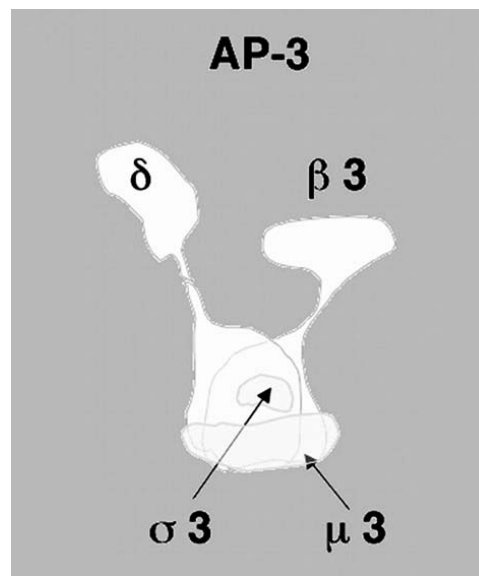


Abb. 53 Schema eines AP-3-Komplexes (Kirchhausen, 1999)

Mutationen in den verschiedenen Ketten des AP-3 Komplexes liegen einigen klassischen Augenfarbenmutanten bei *D. melanogaster* zugrunde. Grund ist eine gestörte Biosynthese der Pigmentgranula (Review s. Mullins et al., 2000). Die δ -Adaptin-Untereinheit konnte dabei der *garnet*-Mutante zugeordnet werden (Ooi et al, 1997); *ruby*-Mutationen betreffen die AP3- β -Kette (Kretzschmar et al., 2000); die *orange*-Mutante hat Defekte in der $\sigma 3$ -Kette (Sevrioukov et al., 1999). Damit ist es sehr wahrscheinlich, dass ein AP-3-Komplex u.a. für den vesikulären Transport von Proteinen zu den Pigmentgranula, spezialisierten Lysosomen der Pigmentzellen des Auges, notwendig ist (Lloyd et al., 1998).

Mutationen im AP-3-Komplex bei Maus und Mensch konnten verschiedenen Syndromen zugeordnet werden (Kantheti et al., 1998; Feng et al., 1999), unter anderem dem Hermansky-Pudlak-Syndrom, das sich durch Defekte in verschiedenen lysosomalen Organellen auszeichnet.

Ein C-terminales Fragment des *garnet*-Proteins wurde als Interaktor des Hexamerinrezeptors, im Two-Hybrid-System identifiziert. Dieses Fragment zeigt in unserem System eine starke Interaktion mit allen drei natürlich vorkommenden Fragmenten des Rezeptors - ABP130, ABP96, ABP64 - nicht jedoch mit einer C-terminal verkürzten Form von ABP64 (siehe Kapitel 4.2.2.1., Tab. 15).

Diese Ergebnisse sind ein Hinweis darauf, dass ein AP-3 Komplex mit der C-terminalen Region des ABP64 interagiert und möglicherweise an der rezeptorvermittelten Endozytose der Hexamerine beteiligt ist.

5.2.4. Modifiziertes Modell des Hexamerinrezeptors und seiner Protein/Protein-Interaktionen

Die beschriebenen Wechselwirkungen des Rezeptors mit verschiedenen Domänen interagierender Proteine wurden in einem Arbeitsmodell zur Steuerung der Aufnahme von Hexamerinen zusammengefaßt. Im Folgenden wird das Modell vorgestellt und die Details im Einzelnen diskutiert.

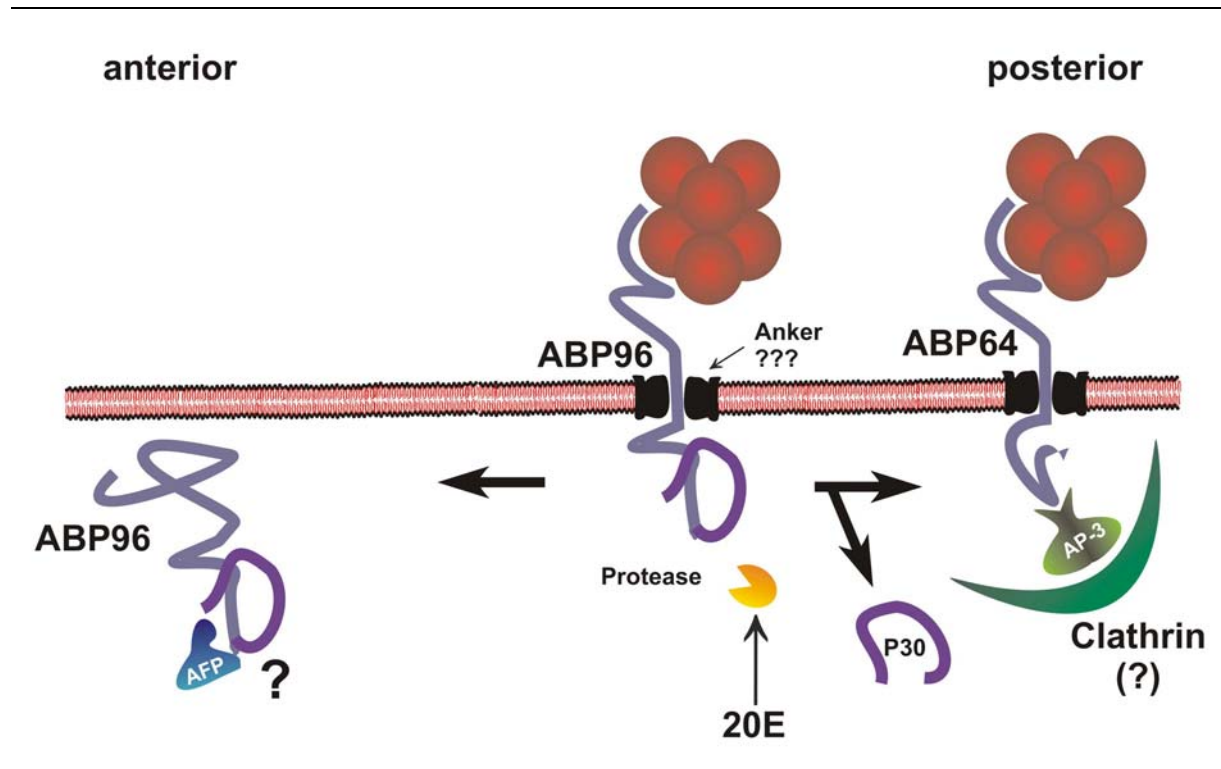


Abb. 54 Arbeitsmodell der Protein/Protein-Interaktionen des Hexamerinrezeptors
 ABP96, ABP64, P30 - Spaltprodukte des Hexamerinrezeptor-Vorläuferpeptids, AP-3 - Adapter Proteinkomplex, Hex - Hexamerin, 20E - 20-Hydroxyecdysen, anterior - vorderer Teil des Fettkörpergewebes, posterior - hinterer Teil.

Abb. 54 zeigt das derzeitige heuristische Arbeitsmodell der Lokalisation und der Protein/Protein-Interaktionen des Hexamerinrezeptors von *C. vicina*.

Die Ligandenbindungsdomäne des Rezeptors

Im Arbeitsmodell befindet sich der N-Terminus auf der Außenseite der Plasmamembran der Fettkörperzelle (in der Hämolymphe) und bindet ein Hexamerin. Verschiedene Beobachtungen bestätigen die Lokalisation der Ligandenbindungsdomäne am N-Terminus des Proteins. Das Hexamerinrezeptor-Vorläuferpeptid von *Calliphora* (ABP130) wurde 1994 von Burmester und Scheller kloniert und sequenziert (Burmester und Scheller, 1994). In einer

späteren Arbeit konnten diese Autoren zeigen, dass die Spaltprodukte ABP96 und ABP64 an der Aufnahme von Hexamerinen beteiligt sind und diese binden. ABP96 wurde als der eigentliche Hexamerinrezeptor bezeichnet (Burmester und Scheller, 1997), ABP64 wurde dabei als kleinstes bindendes N-terminales Fragment identifiziert. Die Daten aus der im Rahmen der vorliegenden Arbeit durchgeführten Two-Hybrid-Interaktionsanalyse zeigen eindeutig, dass die Ligandenbindungsaktivität am N-Terminus von ABP64 im Bereich der ersten 25 AS nach dem Signalpeptid liegt. Dieses kurze Peptid ist in der Lage mit der Domäne-3 des Arylphorins zu interagieren.

Die Transmembrandomäne des Rezeptors

Das Vorhandensein einer Transmembrandomäne im Hexamerinrezeptor ist umstritten. Burmester und Scheller (1997) stellen fest, dass der funktionelle Hexamerinrezeptor ABP96 keine typische Transmembrandomäne nach den Kriterien von Kyte und Doolittle (1982) aufweist. Die Autoren schlagen ein Modell vor, bei dem ABP96 über ein fiktives Ankerprotein an der Außenseite der Plasmamembran präsentiert wird (Burmester und Scheller, 1997, Burmester und Scheller, 1999).

In den Two-Hybrid-Screening-Experimenten konnten neben den beiden bekannten Liganden Arylphorin und LSP-2 auch AFP und δ -AP-3 als Interaktoren des Hexamerinrezeptors identifiziert werden. AFP wurde im Zytoplasma der Fettkörperzellen detektiert (Nakajima und Natori, 2000), die Adaptorproteinkomplexe (APs) sind ebenfalls zytoplasmatisch lokalisiert. Sollten die im Two-Hybrid-Experiment gefundenen Proteininteraktionen des Hexamerinrezeptors mit zwei zytoplasmatisch lokalisierten Proteinen auch *in-vivo* stattfinden, muss eine Transmembrandomäne des Hexamerinrezeptors gefordert werden.

Im Modell ist die Transmembrandomäne mit hypothetischen „Ankerproteinen“ assoziiert, die diese Domäne in der Plasmamembran stabilisieren.

Interaktion mit AFP

Im anterioren Teil des Fettkörpers interagiert AFP mit dem C-Terminus von ABP96.

Im Two-Hybrid-Experiment interagiert das AFP von *C. vicina* mit ABP96, nicht jedoch mit ABP64. Das C-terminale Fragment P30 (siehe Einleitung, Abb. 5) sollte demnach mit AFP interagieren. Dies wurde durch Immunokopräzipitation experimentell bestätigt. Aufgrund der verminderten Aufnahme von Speicherproteinen und der schnellen Degradation des anterioren Fettkörpers nach der Verpuppung wird eine Hemmung des rezeptorvermittelten

Endozytoseprozesses in diesem speziellen Gewebe durch die AFP/P30-Protein/Protein-Interaktion vorgeschlagen.

Interaktion mit AP-3

In unserem Modell verbindet ein AP-3-Adaptorkomplex den Rezeptor mit Clathrin oder einem anderen Hüllprotein und ermöglicht dadurch die Bildung von „coated vesicles“ und damit die Endozytose.

Ecdyson

Die Aktivierung von Hexamerinrezeptoren durch proteolytische Spaltung eines Vorläuferpeptids ist bei *S. peregrina* und *C. vicina* beschrieben (Ueno et al. 1983, Chung et al., 1995, Burmester und Scheller 1997). In beiden Fällen wird die Aufnahme durch 20-Hydroxyecdyson aktiviert. Die Spaltung erfolgt mit Hilfe einer spezifischen Endoprotease, die im Falle von *C. vicina* auch bei abgeschalteter Proteinbiosynthese aktiviert werden kann (Burmester und Scheller, 1997).

Dieses Modell ist eine deutliche Erweiterung und Präzisierung der bisherigen Modellvorstellungen der Wirkungsweise des Hexamerinrezeptors (Burmester und Scheller, 1997, Burmester und Scheller, 2000). Dabei ergeben sich viele neue Fragen und Ansatzpunkte für neue Experimente. Von besonderem Interesse sind dabei die neu identifizierten Interaktoren des Rezeptors - AFP und δ -AP-3. Weitere Forschungen auf diesem Gebiet können Aufschluß über den Mechanismus und die Regulation der rezeptorvermittelten Endozytose von Speicherproteinen geben.

5.2.5. Das HTS-Protokoll

Der intensive Gebrauch von Pestiziden in den letzten Jahrzehnten hat zu einer dramatischen Zunahme von Resistenzen bei Schädlingen gegenüber bestimmten Wirkstoffen geführt. Es besteht großes Interesse an der Entwicklung von Wirkstoffen mit neuartigen Wirkmechanismen. Während in der Vergangenheit die meisten bekannten Pestizide über empirische und analoge Synthese in Kombination mit konventionellen Screening Methoden entwickelt wurden, geht der Trend zur Zeit in Richtung zielgerichteter Ansätze in der Wirkstoffforschung (Londershausen, 1996, Ridley et al., 1998). Die methodischen Fortschritte im Feld der kombinatorischen Chemie und der Naturstoffforschung haben eine großen Menge möglicher Wirkstoffkandidaten hervorgebracht, die über HTS in der Wirkstoffforschung eingesetzt werden (Londershausen, 1996, Hill, 1998, Ridley et al., 1998, Beydon et. al., 2000).

Das Hexamerin/Hexamerinrezeptor-System und der damit verbundene rezeptorvermittelte Endozytoseprozess ist aus folgenden Gründen ein interessanter Ansatzpunkt für eine zielgerichtete Wirkstoffsuche: Dieser Prozess ist für die erfolgreiche Entwicklung der Insektenlarve zum adulten Insekt wichtig (z.B. Aufbau einer adulten Kutikula) und bei allen bisher untersuchten holometabolen Insektenspezies beobachtet worden (Review, siehe Haunerland, 1996). Auf der anderen Seite ist bei Vertebraten kein ähnlicher Prozess bekannt. Ein Wirkstoff, der die Bindung von Hexamerinen an ihren natürlichen Rezeptor verhindert, könnte ein hochspezifisches Insektizid sein, wobei eine Wirkung auf Vertebraten unwahrscheinlich ist (Burmester und Scheller, 2000).

Der Nachweis, dass eine Interaktion zwischen Hexamerinen und Hexamerinrezeptoren im Hefe-Two-Hybrid-System stattfindet und die Konstruktion neuer Reporterplasmide für dieses System ermöglichten die Entwicklung eines kombinierten Proliferations-, Fluoreszenz-HTS-Protokolls, bei dem lebende Hefezellen eingesetzt werden. In einer Serie von Vorversuchen konnte gezeigt werden, dass die Durchführung des HTS-Experiments prinzipiell möglich ist (Kapitel 4.2.4.).

Für jede im Screen getestete Substanz fällt ein Satz von vier Messwerten an (relative Fluoreszenz EGFP Start/Ende, rel. Fluoreszenz RFP, Start/Ende). Bei der Auswertung werden die Differenzen der relativen Fluoreszenz von EGFP und RFP mit einem Standard verglichen. Dabei können „echte“ Inhibitoren von Substanzen unterschieden werden, die das Wachstum von Hefe hemmen, was die erwartete Anzahl der „falsch-positiv“ getesteten Substanzen gegenüber einem Ansatz ohne interner Kontrolle deutlich erniedrigt.

Dieses HTS-Protokoll ermöglicht das Screenen von großen Wirkstoffbibliotheken nach Leitsubstanzen (Inhibitoren der rezeptorvermittelten Endozytose von Hexamerinen), die zur Entwicklung von neuartigen Pestiziden zur Kontrolle holometaboler Insektenlarven benutzt werden können.

Darüber hinaus kann das auf dem Hefe-Two-Hybrid-System basierende HTS-Protokoll auch so modifiziert werden, dass andere Köder/Beute-Interaktionen getestet werden können. Voraussetzung dafür ist, dass die betreffende Protein/Protein-Interaktion über die Aktivierung der Reportergene in der Hefe nachweisbar ist.

Damit ergeben sich vielfältige Möglichkeiten dieses System in der biologischen und (veterinär-) medizinischen Forschung einzusetzen.

6. Literatur

- ADACHI, N., KUBO, T., AND NATORI, S. (1993). Purification and characterization of the arylphorin gene specific binding protein from an embryonic cell line of *Sarcophaga peregrina* (flesh fly). *J Biochem (Tokyo)* **114**, 55-60.
- ADAMS, M., CELNIKER, S., HOLT, R., ET AL. (2000). The genome sequence of *Drosophila melanogaster*. *Science* **287**: 2185–2195.
- AGUI, N., AND HIRUMA, K. (1977). In vitro activation of neurosecretory brain cells in *Mamestra brassicae* by beta-ecdysone. *Gen Comp Endocrinol* **33**, 467-72.
- AGUI, N., GRANGER, N. ET AL. (1979). Cellular-Localization of the Insect Prothoracicotropic Hormone - Invitro Assay of a Single Neurosecretory Cell. *Proc Natl Acad Sci U S A* **76**(11): 5694-5698.
- AGUI, N., GRANGER, N., GILBERT, L. AND BOLLENBACHER, W. (1979). Cellular localization of the insect prothoracicotropic hormone: In vitro assay of a single neurosecretory cell. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **76**: 5694-5698
- ASHBURNER, M., CHIARA, C., MELTZER, P. AND RICHARDS, G.. (1974). Temporal control of puffing activity in polytene chromosomes. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* **38**:655–62
- AUDSLEY, N., WEAVER, R., AND EDWARDS, J. (2000). Juvenile hormone biosynthesis by corpora allata of larval tomato moth, *lacanobia oleracea*, and regulation by *manduca sexta* allatostatin and allatotropin. *Insect Biochem Mol Biol* **30**, 681-9 .
- BEINTEMA, J., STAM, W., HAZES, B., SMIDT, M. (1994). Evolution of arthropod hemocyanins and insect storage proteins (hexamerins). *Mol Biol Evol* **11** :493–503
- BERG, M., UNDISZ, K., THIERICKE, R., MOORE, T., AND POSTEN, C. (2000). Miniaturization of a functional transcription assay in yeast (human progesterone receptor) in the 384- and 1536-well plate format. *J Biomol Screen* **5**, 71-6.
- BEYDON, M., FOURNIER, A., DRUGEAULT, L., BECQUART, J. (2000). Microbiological high throughput screening: an opportunity for the lead discovery process. *J Biomol Screen.* **5**(1):13-22.
- BHATT, T., AND HORODYSKI, F. (1999). Expression of the *Manduca sexta* allatotropin gene in cells of the central and enteric nervous systems. *J Comp Neurol* **403**, 407-20.
- BISHOP, G. (1922). Cell metabolism in the insect fat-body. I. Cytological changes accompanying growth and histolysis of the fat-body of *Apis mellifica*. *J Morphol* **36** :567–601
- BISHOP, G. (1923). Cell metabolism in the insect fat-body. II. A functional interpretation of the changes in structure in the fat-body cells of the honey bee. *J Morphol* **37** :533–553
- BOGUS, M. AND SCHELLER, K. (1991). Activation of Juvenile Hormone Synthesis in vitro by Larval Brains of *Galleria mellonella*. *Zool.Jb. Physiol.* **95**, 197-208
- BOGUS, M. AND SCHELLER, K. (1994). Identification of Allatotropin-Secreting Cells in the Brain of an Insect Larva. *Naturwissenschaften* **81**(2): 87-89.
- BOGUS, M. AND SCHELLER, K. (1996). Allatotropin released by the brain controls larval molting in *Galleria mellonella* by affecting juvenile hormone synthesis. *Int. J. Dev. Biol.* **40**, pp. 205-210.
- BOLLENBACHER, W., SMITH, S., GOODMAN, W. AND GILBERT, L. (1981). Ecdysteroid titer during larval--pupal--adult development of the tobacco hornworm, *Manduca sexta*. *Gen Comp Endocrinol.* **44**(3):302-6.
- BORG, T., BELL, R., AND PICARD, D. (1973). Ultrastructure of neurosecretory cells in the frontal ganglion of the tobacco hornworm, *Manduca sexta*(L). *Tissue Cell* **5**, 259-67.
- BOUNHIOL, J. (1936). Métamorphose après ablation des corpora allata chez le ver à soie (*Bombyx mori* L.). *C.R.*

Acad. Sci. Paris **205**, pp. 388-389.

BOWERMAN, W., GIESY J., BEST D., ET AL. (1995). A review of factors affecting productivity of bald eagles in the Great Lakes region: implications for recovery. *Environ Health Perspect (United States)*, **103** Suppl 4 p51-9

BOWERS, W., FALES, H., THOMPSON, M. AND UEBEL, E. (1966). Juvenile hormone: identification of an active compound from balsam fir. *Science* **25**;154(752):1020-1.

BRADFORD, M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* **72**, 248-54.

BRAKCH, N., BOUSSETTA, H., RHOLAM, M., AND COHEN, P. (1989). Processing endoprotease recognizes a structural feature at the cleavage site of peptide prohormones. The pro-oxytocin/neurophysin model. *J Biol Chem* **264**, 15912-6.

BRAKCH, N., RHOLAM, M., SIMONETTI, M., AND COHEN, P. (2000). Favourable side-chain orientation of cleavage site dibasic residues of prohormone in proteolytic processing by prohormone convertase 1/3. *Eur J Biochem* **267**, 1626-33.

BRAUN, R. AND WYATT, (1996). Sequence of the hexameric juvenile hormone-binding protein from the hemolymph of *Locusta migratoria*. *J Biol Chem.* **271**(49):31756-62.

BURMESTER, T. (1999). Evolution and function of the insect hexamerins. *Eur J Entomol* **96** (in press)

BURMESTER, T. (2001). Molecular evolution of the arthropod hemocyanin superfamily. *Mol Biol Evol.* **18**(2):184-95.

BURMESTER, T. AND SCHELLER, K. (1992). Identification of binding proteins involved in the stage-specific uptake of arylphorin by the fat body cells of *Calliphora vicina*. *Insect Biochem Mol Biol* **22** :211-220

BURMESTER, T. AND SCHELLER, K. (1994). Ecdysteroid-mediated uptake of arylphorin by larval fat bodies of *Calliphora vicina*: involvement and developmental regulation of arylphorin binding proteins. *Insect Biochem. Molec. Biol.* **25**, 799-806

BURMESTER, T. AND SCHELLER, K. (1995). Complete cDNA-sequence of the receptor responsible for arylphorin uptake by the larval fat body of the blowfly, *Calliphora vicina*. *Insect Biochem Mol Biol* **25**, 981-9.

BURMESTER, T. AND SCHELLER, K. (1995A). Ecdysterone-mediated uptake of arylphorin by larval fat bodies of *Calliphora vicina*: involvement and developmental regulation of arylphorin binding proteins. *Insect Biochem Mol Biol* **25**:799-806

BURMESTER, T. AND SCHELLER, K. (1996). Common origin of arthropod tyrosinase, arthropod hemocyanin, insect hexamerin, and dipteran arylphorin receptor. *J Mol Evol* **42**, 713-28.

BURMESTER, T. AND SCHELLER, K. (1997 A). Conservation of hexamerin endocytosis in Diptera. *Eur J Biochem* **244**, 713-20.

BURMESTER, T. AND SCHELLER, K. (1997 B). Developmentally controlled cleavage of the *Calliphora* arylphorin receptor and posttranslational action of the steroid hormone 20-hydroxyecdysone. *Eur J Biochem* **247**, 695-702.

BURMESTER, T. AND SCHELLER, K. (1999). Ligands and receptors: common theme in insect storage protein transport. *Naturwissenschaften* **86**, 468-74.

BURMESTER, T., ANTONIEWSKI, C., AND LEPESANT, J. (1999). Ecdysone-regulation of synthesis and processing of fat body protein 1, the larval serum protein receptor of *Drosophila melanogaster*. *Eur J Biochem* **262**, 49-55.

BURMESTER, T., KOLLING, C., SCHROER, B., AND SCHELLER, K. (1998 A). Complete sequence, expression, and evolution of the hexamerin LSP-2 of *Calliphora vicina*. *Insect Biochem Mol Biol* **28**, 11-22.

BURMESTER, T., MASSEY, H. J., ZAKHARKIN, S., AND BENES, H. (1998 B). The evolution of hexamerins and

the phylogeny of insects. *J Mol Evol* **47**, 93-108.

BURMESTER, T., MATZNER, U., SCHELLER, K. (1995). Effect of 20-hydroxyecdysone on synthesis and uptake of arylphorin by the larval fat body of *Calliphora vicina* (Diptera: Calliphoridae). *Eur J Entomol* **92**:217-227

BUTTERWORTH, F. AND BERENDES, H. (1974). Ecdysone-binding proteins in haemolymph and tissues of *Drosophila hydei* larvae. *J Insect Physiol* **20**, 2195-204.

BUTTERWORTH, F. AND BODENSTEIN, D. (1968). Adipose tissue of *Drosophila melanogaster*. 3. The effect of the ovary on cell growth and the storage of lipid and glycogen in the adult tissue. *J Exp Zool* **167**, 207-17.

BUTTERWORTH, F. AND FORREST, E. (1984). Ultrastructure of the preparative phase of cell death in the larval fat body of *Drosophila melanogaster*. *Tissue Cell* **16**, 237-50.

BUTTERWORTH, F. AND RASCH, E. (1986). Adipose tissue of *Drosophila melanogaster*: VII. Distribution of nuclear DNA amounts along the anterior-posterior axis in the larval fat body. *J Exp Zool* **239**, 77-85.

BUTTERWORTH, F., BODENSTEIN, D., KING, R. (1965). Adipose tissue of *Drosophila melanogaster*: an experimental study of larval fat body. *J Exp Zool* **158**:141-151

BUTTERWORTH, F., EMERSON, L., AND RASCH, E. (1988). Maturation and degeneration of the fat body in the *Drosophila* larva and pupa as revealed by morphometric analysis. *Tissue Cell* **20**, 255-68.

BUYS, C., AND GIBBS, D. (1981). The anatomy of neurons projecting to the corpus cardiacum from the larval brain of the tobacco hornworm, *Manduca sexta* (L.). *Cell Tissue Res* **215**, 505-13.

CAGLAYAN, S. AND GILBERT, L. (1987). In vitro synthesis, release and uptake of storage proteins by the fat body of *Manduca sexta*: putative hormonal control. *Comp Biochem Physiol B*. **87**(4):989-97

CANTERA, R., VEENSTRA, J., AND NASSEL, D. (1994). Postembryonic development of corazonin-containing neurons and neurosecretory cells in the blowfly, *Phormia terraenovae*. *J Comp Neurol* **350**, 559-72.

CARROLL, MILTON, WILLIAMS, (1961). The juvenile hormone. II. Its role in the endocrine control of molting, pupation, and adult development in the *Cecropia* silkworm. *Biol. Bull.* **121**:572-85.

CARROW, G., CALABRESE, R., AND WILLIAMS, C. (1984). Architecture and physiology of insect cerebral neurosecretory cells. *J Neurosci* **4**, 1034-44.

CERNY, V., DOLEJS, L., LABLER, L., SORM, F. AND SLAMA, K. (1967). Dehydrojuvabione - a new compound with juvenile hormone activity from balsam fir. *Tetrahedron Lett.* **12**:1053-7.

CHEN, C., ROWLEY, A., NEWTON, R. AND RATCLIFFE, N. (1999). Identification, purification and properties of a beta-1,3-glucan-specific lectin from the serum of the cockroach, *Blaberus discoidalis* which is implicated in immune defence reactions. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol.* **122**(3):309-19.

CHO, M., CHOI, H., MOON, G., KIM, M., KWON, T., HOMMA, K., NATORI, S. AND LEE, B.(1999). An 86 kDa diapause protein 1-like protein is a component of early-staged encapsulation-relating proteins in coleopteran insect, *Tenebrio molitor* larvae. *FEBS Lett.* **28**;451(3):303-7.

CHUNG, S., KUBO, T., AND NATORI, S. (1995). Molecular cloning and sequencing of arylphorin-binding protein in protein granules of the *Sarcophaga* fat body. Implications of a post-translational processing mechanism. *J Biol Chem* **270**, 4624-31.

CLEVER, U. AND KARLSON, P. (1960). Induktion von Puff-Veränderungen in den Speicheldrüsenchromosomen von *Chironomus tetans* durch Ecdyson. *Expl Cell. Res.* **20**, 623-626

COPENHAVER, P., AND TRUMAN, J. (1986). Control of neurosecretion in the moth *Manduca sexta*: physiological regulation of the eclosion hormone cells. *J Comp Physiol [A]* **158**, 445-55.

COPENHAVER, P., AND TRUMAN, J. (1986). Metamorphosis of the cerebral neuroendocrine system in the moth *Manduca sexta*. *J Comp Neurol* **249**, 186-204.

- CORMACK, B., VALDIVIA, R., AND FALKOW, S. (1996).** FACS-optimized mutants of the green fluorescent protein (GFP). *Gene* **173**, 33-8.
- COWLES, C., ODORIZZI, G., PAYNE, G., AND EMR, S. (1997).** The AP-3 adaptor complex is essential for cargo-selective transport to the yeast vacuole. *Cell* **91**, 109-18.
- CRILKINGE, W. AND BAYAERT, R. (1999).** Yeast Two-Hybrid: State of the Art. *Biological Procedures Online* **2** (1), 1-38
- DANTY, E., ARNOLD, G., BURMESTER, T., HUET, J., HUET, D., PERNOLLET, J., AND MASSON, C. (1998).** Identification and developmental profiles of hexamerins in antenna and hemolymph of the honeybee, *Apis mellifera*. *Insect Biochem Mol Biol* **28**, 387-97.
- DELL'ANGELICA, E., OHNO, H., OOI, C., RABINOVICH, E., ROCHE, K. AND BONIFACINO J. (1997).** AP-3: an adaptor-like protein complex with ubiquitous expression. *EMBO J.* **16**(5):917-28.
- DELL'ANGELICA, E., OOI, C. AND BONIFACINO, J. (1997).** Beta3A-adaptin, a subunit of the adaptor-like complex AP-3. *J Biol Chem.* **13**;272(24):15078-84.
- DELL'ANGELICA, E., OOI, C. AND BONIFACINO, J. (1997).** Beta3A-adaptin, a subunit of the adaptor-like complex AP-3. *J Biol Chem* **272**, 15078-84.
- DELL'ANGELICA, E., SHOTELERSUK, V., AGUILAR, R., GAHL, W. AND BONIFACINO, J. (1999).** Altered trafficking of lysosomal proteins in Hermansky-Pudlak syndrome due to mutations in the beta 3A subunit of the AP-3 adaptor. *Mol Cell* **3**, 11-21.
- DUVE, H., JOHNSEN, A., MAESTRO, J., SCOTT, A., WINSTANLEY, D., DAVEY, M., EAST, P., THORPE, A. (1997).** Lepidopteran peptides of the allatostatin superfamily. *Peptides* **18**(9):1301-9.
- DUVIC, B. AND BREHELIN M. (1998).** Two major proteins from locust plasma are involved in coagulation and are specifically precipitated by laminarin, a beta-1,3-glucan. *Insect Biochem Mol Biol.* **28**(12):959-67.
- DYTE, C. (1972).** Resistance to synthetic juvenile hormone in a population of the flour beetle, *Tribolium*
- ENDERLE, U., KÄUSER, G., REUM, L., SCHELLER, K. AND KOOLMAN, J. (1983).** Ecdysteroids in the haemolymph of blowfly larvae are bound to calliphorin. In: *The Larval Serum Proteins of Insects* (K. Scheller, ed.), Thieme-Verlag, Stuttgart, New York, pp. 40-49
- FASHENA, S., SEREBRIISKII, I., AND GOLEMIS, E. (2000).** LexA-based two-hybrid systems. *Methods Enzymol* **328**, 14-26 .
- FASHENA, S., SEREBRIISKII, I., AND GOLEMIS, E. (2000).** The continued evolution of two-hybrid screening approaches in yeast: how to outwit different preys with different baits. *Gene* **250**, 1-14.
- FENG, L., SEYMOUR, A., JIANG, S., TO, A., PEDEN, A., NOVAK, E., ZHEN, L., RUSINIAK, M., EICHER, E., ROBINSON, M., GORIN, M. AND SWANK, R. (1999).** The beta3A subunit gene (Ap3b1) of the AP-3 adaptor complex is altered in the mouse hypopigmentation mutant pearl, a model for Hermansky-Pudlak syndrome and night blindness. *Hum Mol Genet* **8**, 323-30.
- FEUER, L. AND GAAL, K. (1979).** Effect of glutaurine on plasma renin activity in the rat and the dog. *Gen Comp Endocrinol.* **39**(3):330-5.
- FEUER, L., CSERHALMI, M. AND CSABA, G. (1979).** The effect of glutaurine on the development of amphibian larvae with inhibited RNA and protein synthesis. *Endokrinologie* **74**(3):363-8.
- FEUER, L., NAGY, S. AND CSABA, G. (1982).** Effect of glutaurine (gamma-l-glutamyl-taurine) on the serum glucocorticoid and estriol level in rats. *Endokrinologie* **79**(3):437-8.
- FEYEREISEN, R., AND TOBE, S. (1981).** A rapid partition assay for routine analysis of juvenile hormone release by insect corpora allata. *Anal Biochem* **111**, 372-5.
- FIELDS, S., SONG, O. (1989).** A novel genetic system to detect protein-protein interactions. *Nature (England)*,

340(6230) p245-6

- FINLEY, R. AND BRENT, R. (1996). Two-hybrid analysis of genetic regulatory networks. In The yeast two-hybrid system, P. L. Bartel and S. Fields, eds. (Oxford: Oxford University Press).
- FINNEY, N. (1998) Fluorescence assays for screening combinatorial libraries of drug candidates *Current Opinion in Drug Discovery and Development* **1**(1):92-97
- FLOWER, D. (1999). The lipocalin protein family: structure and function. *Biochemistry* **318**, 1–14.
- GADE, G., HOFFMANN, K., AND SPRING, J. (1997). Hormonal regulation in insects: facts, gaps, and future directions. *Physiol Rev* **77**, 963-1032.
- GARDNER, J., WILDENBERG, S., KEIPER, N., NOVAK, E., RUSINIAK, M., SWANK, R., PURI, N., FINGER, J., HAGIWARA, N., LEHMAN, A., GALES, T., BAYER, M., KING, R., AND BRILLIANT, M. (1997). The mouse pale ear (ep) mutation is the homologue of human Hermansky-Pudlak syndrome. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**, 9238-43.
- GEORGHIOU, G., ARIARATNAM, V., FREELAND, S. (1972) Development of resistance to carbamates and organophosphorus compounds in *Anopheles albimanus* in nature. *Bull World Health Organ.* **46**(4):551-4.
- GILBERT, L. I., RYBCZYNSKI, R. AND TOBE, S. (1996). "Metamorphosis: Post-Embryonic Reprogramming of Gene Expression in Insect and Amphibian Cells" (eds L. I. Gilbert, B. Atkinson, and J. Tata) , Academic Press, N.Y.
- GILBERT, L., AND ROE, R. (2000). The juvenile hormones: historical facts and speculations on future research directions. *Insect Biochem Mol Biol* **30**, 617-44 .
- GILBERT, L., COMBEST, W., SMITH, W., MELLER, V., AND ROUNTREE, D. (1988). Neuropeptides, second messengers and insect molting. *Bioessays* **8**, 153-7.
- GOLEMIS, E., AND BRENT, R. (1992). Fused protein domains inhibit DNA binding by LexA. *Mol Cell Biol* **12**, 3006-14.
- GOLEMIS, E., AND KHAZAK, V. (1997). Alternative yeast two-hybrid systems. The interaction trap and interaction mating. *Methods Mol Biol* **63**, 197-218.
- GOLTZENE, F., LAGUEUX, M., CHARLET, M., HOFFMANN, J. (1978). The follicle cell epithelium of maturing ovaries of *Locusta migratoria*: a new biosynthetic tissue for ecdysone. *Hoppe Seylers Z Physiol Chem* **359**(10):1427-34.
- GORDON D. (1997). A new approach to insect-pest control--combination of neurotoxins interacting with voltage sensitive sodium channels to increase selectivity and specificity. *Invert Neurosci.* **3**(2-3):103-16. Review.
- GRANGER, N., STURGIS, S., EBERSOHL, R., ET AL. (1996). Dopaminergic control of corpora allata activity in the larval tobacco hornworm, *Manduca sexta*. *Arch Insect Biochem Physiol (United States)*, **32**(3-4) p449-66
- GUEX, N., DIEMAND, A., AND PEITSCH, M. (1999). Protein modelling for all. *Trends Biochem Sci* **24**, 364-7.
- GYURIS, J., GOLEMIS, E., CHERTKOV, H., ET AL. (1993). Cdi1, a human G1 and S phase protein phosphatase that associates with Cdk2. *Cell (United States)*, **75**(4) p 791-803
- HANSEN (1998):; Experimente zur Kartierung der rezeptorbindenden Domäne des Arylphorins von *Calliphora* mit dem Hefe "Two Hybrid System"
- HANSEN, I., GUTSMANN, V., SCHELLER, K. (1998). Ecdysteroid controlled processing of the *Calliphora* hexamerin receptor: cleavage points and sites of interaction between the receptor and its ligands. Vth European Congress of Entomology, České Budejovice, Abstracts, p 207
- HARLAND, R. (1991). In situ hybridization: An improved whole-mount method for *Xenopus* embryos. In *Methods in Cell Biology* (ed. B. K. Kay and H. B. Peng), pp. 685-695. New York: Academic Press.

- HAUNERLAND, N. (1996).** Insect storage proteins: gene families and receptors. *Insect Biochem Mol Biol* **26**, 755-65.
- HAUNERLAND, N. AND BOWERS, W. (1986).** A larval specific lipoprotein: purification and characterization of a blue chromoprotein from *Heliothis zea*. *Biochem Biophys Res Commun (United States)* **134**(2) p580-6
- HAUNERLAND, N. AND SHIRK, P. (1994).** Regional and functional differentiation in the insect fat body. *Annu. Rev. Entomol.* **40**, 121-145
- HAUNERLAND, N., NAIR, K. AND BOWERS, W. (1990).** Fat body heterogeneity during development of *Heliothis zea*. *Insect Biochem.* **20**, 829-837
- HEUSER, J., AND KEEN, J. (1988).** Deep-etch visualization of proteins involved in clathrin assembly. *J Cell Biol* **107**, 877-86.
- HILL, D. (1998).** Trends in development of high-throughput screening technologies for rapid discovery of novel drugs. *Current Opinion in Drug Discovery and Development* (**1**) 92-97
- HIRST, J., AND ROBINSON, M. (1998).** Clathrin and adaptors. *Biochim Biophys Acta* **1404**, 173-93.
- HOMBERG, U., DAVIS, N., AND HILDEBRAND, J. (1991).** Peptide-immunocytochemistry of neurosecretory cells in the brain and retrocerebral complex of the sphinx moth *Manduca sexta*. *J Comp Neurol* **303**, 35-52.
- HORSEMAN, G., HARTMANN, R., VIRANT-DOBERLET, M., LOHER, W., AND HUBER, F. (1994).** Nervous control of juvenile hormone biosynthesis in *Locusta migratoria*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**, 2960-4.
- HUA, Y., ISHIBASHI, J., SAITO, H., TAWFIK, A., SAKAKIBARA, M., TANAKA, Y., DERUA, R., WAELKENS, E., BAGGERMAN, G., DE LOOF, A., SCHOofs, L., TANAKA, S. (2000).** Identification of [Arg⁷] corazonin in the silkworm, *Bombyx mori* and the cricket, *Gryllus bimaculatus*, as a factor inducing dark color in an albino strain of the locust, *Locusta migratoria* *J Insect Physiol* **46**(6):853-860
- ISMAIL, S., AND GUPTA, A. (1990).** 20-Hydroxyecdysone mediated activation of larval haemolymph protein uptake by fat body cells of *Corcyra cephalonica* (Insecta) [published erratum appears in *Biochem Int* 1991 Jun; 24(3):593]. *Biochem Int* **22**, 261-8.
- JANET, C. (1898).** Systeme glandulaire tegumentaire de la *Myrmica ruba*: observations diverses sur les fourmis. 30 pp. Paris.
- JANET, C. (1898A).** Sur les limites morphologiques des anneaux du tegument et sur la situation des membranes articulaires chez les Hymenopteres arrives a etat d'imago. *C. R. Acad. Sci. Paris*, **126**: 435-438.
- JOHNSON, M., AND BUTTERWORTH, F. (1985).** Maturation and aging of adult fat body and oenocytes in *Drosophila* as revealed by light microscopic morphometry. *J Morphol* **184**, 51-9.
- JOWETT, T., AND J. POSTLETHWAIT (1981).** Hormonal regulation of synthesis of yolk proteins and a larval serum protein (LsP2) in *Drosophila*. *NATURE*. **292**:633-635.
- JOWETT, T., J.H. POSTLETHWAIT, AND D.B. ROBERTS (1982).** Hormonal regulation of a larval haemolymph protein in *Drosophila*. *Embryonic Development, Part A: Genetic Aspects*. pp. 373-380. Alan R. Liss, New York.
- KAATZ, H., EICHMUELLER, S. AND KREISSL, S. (1994).** Stimulatory effect of octopamine on juvenile hormone biosynthesis in honey bees (*Apis mellifera*): physiological and immunocytochemical evidence. *J Insect Physiol* **40**: 865-872
- KAATZ, H., EICHMÜLLER, S. AND KREISSLE, S., (1994).** Stimulatory effect of dopamine on juvenile hormone biosynthesis in honey bees (*Apis mellifera*): physiological and immunocytochemical evidence. *J. Insect Physiol.* **40**, pp. 865-872.
- KANTHETI, P., QIAO, X., DIAZ, M., PEDEN, A., MEYER, G., CARSKADON, S., KAPFHAMER, D., SUFALCO, D., ROBINSON, M., NOEBELS, J., AND BURMEISTER, M. (1998).** Mutation in AP-3 delta in the mocha mouse links endosomal transport to storage deficiency in platelets, melanosomes, and synaptic vesicles. *Neuron* **21**, 111-22.

- KATAOKA, H., TOSCHI, A., LI, J., CARNEY, R., SCHOOLEY, D. AND KRAMER, S., (1989).** Identification of an allatotropin from adult *Manduca sexta*. *Science* **243**, pp. 1481-1483.
- KAWAKAMI, A., KATAOKA, H., OKA, T., MIZOGUCHI, A., KIMURA-KAWAKAMI, M., ADACHI, T., IWAMI, M., NAGASAWA, H., SUZUKI, A., AND ISHIZAKI, H. (1990).** Molecular cloning of the Bombyx mori prothoracicotropic hormone. *Science* **247**, 1333-5.
- KAWAKAMI, A., KATAOKA, H., OKA, T., MIZOGUCHI, A., KIMURA-KAWAKAMI, M., ADACHI, T., IWAMI, M., NAGASAWA, H., SUZUKI, A. AND ISHIZAKI, H. (1990).** Molecular cloning of the Bombyx mori prothoracicotropic hormone. *Science* **247**, 1333-1335.
- KEELEY, L. AND MCKERCHER, S. (1985).** Endocrine regulations of ovarian maturation in the cockroach, *Blaberus discoidalis*. *Comparative Biochemistry and Physiology (A)* **80**, 115-121.
- KENNY, B., BUSHFIELD, M., PARRY-SMITH, D., FOGARTY, S., AND TREHERNE, J. (1998).** The application of high-throughput screening to novel lead discovery. *Prog Drug Res* **51**, 245-69.
- KIM, J., MATSUMOTO, N., KOMANO, H., AND NATORI, S. (1989).** Stage-specific detection of a DNA-binding protein for the storage protein gene of *Sarcophaga peregrina*. *Biochim Biophys Acta* **1008**, 79-84.
- KIRANKUMAR, N., ISMAIL, S. AND DUTTA GUPTA, A. (1997).** Uptake of storage protein in the rice moth, *Corcyra cephalonica*: identification of storage protein binding proteins in the fat body cell membranes. *Insect Biochem. Mol. Biol.* **27**, (7), 671-679.
- KIRANKUMAR, N., ISMAIL, S., DUTTA-GUPTA, A. (1997).** Uptake of storage protein in the rice moth *Corcyra cephalonica*: identification of storage protein binding proteins in the fat body cell. *Insect Biochem Mol Biol* **27** :671-679
- KIRCHHAUSEN, T. (1999).** Adaptors for clathrin-mediated traffic. *Annu Rev Cell Dev Biol* **15**, 705-32.
- KOENIG, R., NORDIN, J. AND KUNKEL, J.(1986).** The role of the carbohydrate component in binding of vitellin to oocyte membranes of the German cockroach, *Blattella germanica*. *Adv. Invert. Reprod.* **4**: 525.
- KOLB, A. AND NEUMANN, K. (1997).** Beyond the 96-Well Microplate: Instruments and Assay Methods for the 384-Well Format. *Biomol Screening* **2**(2): 103-109
- KOPEC, K. (1922).** Studies on the necessity of the brain for the inception of insect metamorphosis. *Biol. Bull.* **42**: 323-341.
- KOU, R., AND CHEN, S. (2000).** Allatotropic activity in the suboesophageal ganglia and corpora cardiaca of the adult male loreyi leafworm, *Mythimna loreyi*. *Arch Insect Biochem Physiol* **43**, 78-86.
- KRAEMER, B., AND WOLBERT, P. (1998).** Down-regulation of expression of a pupal cuticle protein gene by transcriptional and posttranscriptional control mechanisms during metamorphosis in *Galleria*. *Dev Genes Evol* **208**, 205-12.
- KRAMER, S., TOSCHI, A., MILLER, C., KATAOKA, H., QUISTAD, G., LI, J., CARNEY, R., SCHOOLEY, D. (1991).** Identification of an allatostatin from the tobacco hornworm *Manduca sexta*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **1**;88(21):9458-62.
- KRAMER, S., TOSCHI, A., MILLER, C., KATAOKA, H., QUISTAD, G., LI, J., CARNEY, R. AND SCHOOLEY, D., (1991).** Identification of an allatostatin from the tobacco hornworm *Manduca sexta*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**, pp. 9458-9462.
- KRETZSCHMAR, D., POECK, B., ROTH, H., ERNST, R., KELLER, A., PORSCH, M., STRAUSS, R., AND PFLUGFELDER, G. (2000).** Defective pigment granule biogenesis and aberrant behavior caused by mutations in the *Drosophila* AP-3beta adaptin gene ruby. *Genetics* **155**, 213-23.
- KYTE, J. AND DOOLITTLE, R. (1982).** A simple method for displaying the hydropathic character of a protein. *J Mol Biol* **157**(1):105-111
- LAEMMLI, U. (1970).** Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-5.

- LAFONT-CAZAL, M. AND BAEHR, J.C., (1988). Octopaminergic control of corpora allata activity in an insect. *Experientia* **44**, pp. 895-896.
- LEPESANT, J., KEJZLAROVÁ-LEPESANT, J., GAREN, A. (1978). Ecdysone-inducible function of larval fat bodies in *Drosophila*. *Proc Natl Acad Sci USA* **75**:5570-5574
- LEPESANT, J., LEVINE, M., GAREN, A., ET AL. (1982). Developmentally regulated gene expression in *Drosophila* larval fat bodies. *J Mol Appl Genet (United States)*, **1**(5) p371-83
- LEVENBOOK, L., BAUER, A. (1984). The fate of the larval storage protein calliphorin during adult development of *Calliphora vicina*. *Insect Biochem* **14**:77-86
- LINCK, B., KLEIN, J.M., MANGERICH, S., KELLER, R. AND WEIDEMANN, W. (1993). Molecular cloning of crustacean red pigment concentrating hormone precursor. *Biochem Biophys Res Commun* **195**: 807-813.
- LLOYD, V., RAMASWAMI, M., AND KRAMER, H. (1998). Not just pretty eyes: *Drosophila* eye-colour mutations and lysosomal delivery. *Trends Cell Biol* **8**, 257-9.
- LOCKE, M., COLLINS, J. (1968). Protein uptake into multivesicular bodies and storage granulas in the fat body of an insect. *J Cell Biol* **36**:153-183
- LONDERSHAUSEN, M. (1996). Approaches to New Parasiticides. *Pestic. Sci.* **48**, 269-292
- LORENZ, M., KELLNER, R., HOFFMANN, K. (1995). A family of neuropeptides that inhibit juvenile hormone biosynthesis in the cricket, *Gryllus bimaculatus*. *J Biol Chem.* **270**(36):21103-8.
- MAGEE J, KRAYNACK N, MASSEY HC JR, TELFER WH. (1994). Properties and significance of a riboflavin-binding hexamerin in the hemolymph of *Hyalophora cecropia*. *Arch Insect Biochem Physiol.*; **25**(2):137-57.
- MARKL, J., BURMESTER, T., DECKER, H., SAVEL-NIEMANN, A., HARRIS, J., SULING, M., NAUMANN, U., AND SCHELLER, K. (1992). Quaternary and subunit structure of *Calliphora* arylphorin as deduced from electron microscopy, electrophoresis, and sequence similarities with arthropod hemocyanin. *J Comp Physiol [B]* **162**, 665-80.
- MARTIN, D., PIULACHS, M.D. AND BELLES, X., (1996). Inhibition of vitellogenin production by allatostatin in the German cockroach. *Mol. Cell. Endocrinol.* **121**, pp. 191-196.
- MARTINEZ, T., BURMESTER, T., VEENSTRA, J., AND WHEELER, D. (2000). Sequence and evolution of a hexamerin from the ant *Camponotus festinatus*. *Insect Mol Biol* **9**, 427-31 .
- MASLER, E., KELLY, T. AND MENN, J. (1993). Insect neuropeptides: discovery and application in insect management. *Arch. Insect Biochem. Physiol.* **22**:87-111.
- MATTHEWS, 1997
- MATZ, M., SHAGIN, D., BOGDANOVA, E., BRITANOVA, O., LUKYANOV, S., DIATCHENKO, L. AND CHENCNIK, A. (1999). Amplification of cDNA ends based on template-switching effect and step-out PCR. *Nucleic Acids Res.* **27**: 1558-1560.
- MENN, J. AND BORKOVEC. A. (1989). Insect neuropeptides: potential new insect control agents. *J. Agric. Food Chem.* **37**:271-278.
- MERIAN, MARIA SIBYLLA. *Metamorphosis insectorum Surinamensium* Amsterdam, 1705.
- MOUSSERON-GRALL, S., KEJZLAROVA-LEPESANT, J., BURMESTER, T., CHIHARA, C., BARRAY, M., DELAIN, E., PICTET, R., AND LEPESANT, J. (1997). Sequence, structure and evolution of the ecdysone-inducible *Lsp-2* gene of *Drosophila melanogaster*. *Eur J Biochem* **245**, 191-8.

- MULLINS, C., HARTNELL, L., AND BONIFACINO, J. (2000). Distinct requirements for the AP-3 adaptor complex in pigment granule and synaptic vesicle biogenesis in *Drosophila melanogaster*. *Mol Gen Genet* **263**, 1003-14.
- MUNN, E., FEINSTEIN, A., AND GREVILLE, G. (1971). The isolation and properties of the protein calliphorin. *Biochem J* **124**, 367-74.
- NABERT, A. (1913). Die corpora allata der insekten. *Z. wiss. Zool.* **104**, pp. 181-358.
- NAKAJIMA, Y., AND NATORI, S. (2000). Identification and characterization of an anterior fat body protein in an insect. *J Biochem (Tokyo)* **127**, 901-8.
- NAUMANN U. AND SCHELLER, K.(1991). Complete cDNA and gene sequence of the developmentally regulated arylphorin of *Calliphora vicina* and its homology to insect hemolymph proteins and arthropod hemocyanins. *Biochem Biophys Res Commun* **28**;177(3):963-72.
- NIJHOUT, H. (1975). A threshold size for metamorphosis in the tobacco hornworm *Manduca sexta* (L.). *Biological Bulletin* **149**, 214-225.
- NIJHOUT, H. (1994). Insect hormones. Princeton Univ. Press, Princeton, N.J.
- NIJHOUT, M.M. AND RIDDIFORD, L.M., (1974). The control of egg maturation by juvenile hormone in the tobacco hornworm, moth, *Manduca sexta*. *Biol. Bull.* **146**, pp. 377-392
- OOL, C., MOREIRA, J., DELL'ANGELICA, E., POY, G., WASSARMAN, D., AND BONIFACINO, J. (1997). Altered expression of a novel adaptin leads to defective pigment granule biogenesis in the *Drosophila* eye color mutant garnet. *EMBO J* **16**, 4508-18.
- O'SHEA, M. (1991). Introduction to neuropeptides: perspectives for the parasitologist. *Parasitology* **102**: 871-875.
- PASTOR, D., PIULACHS, M.-D., CASSIER, P., ANDRE, M., BELLES, X. (1991). Etude *in vivo* et *in vitro* de l'action de la dopamine sur la croissance des ovocytes et la production d'hormone juvenile chez *Blattella germanica* (L.) CR Acad Sci Paris, 313, 207-212.
- PAU, R., LEVENBOOK, L. AND BAUER, A. (1979). Inhibitory effect of beta-ecdysone on protein synthesis by blowfly fat body *in vitro*. *Experientia.* **15**;35(11):1449-51.
- PEITSCH MC (1995). ProMod: automated knowledge-based protein modelling tool. *PDB Quarterly Newsletter* **72**:4.
- PEITSCH MC (1995). Protein modelling by E-Mail. *Bio/Technology* **13**:658-660.
- PEITSCH, M., AND TSCHOPP, J. (1995). Comparative molecular modelling of the Fas-ligand and other members of the TNF family. *Mol Immunol* **32**, 761-72.
- PENER, M., GIRARDIE, A., AND JOLY, P. (1992). Neurosecretory and corpus allatum controlled effects on mating behavior and color change in adult locust *Migratoria migratorioides* males. *Gen Comp Endocrinol* **19**, 494-508.
- PIPA, R. (1978). Locations and central projections of neurons associated with the retrocerebral neuroendocrine complex of the cockroach *Periplaneta americana* (L.). *Cell Tissue Res* **193**, 443-55.
- POGGE V. STRANDMANN, E., SENKEL, S., RYFFEL, G., HENGGE, U. (2001). Dimerization Co-factor of hepatocyte nuclear factor 1/pterin-4a-carbinolamine dehydratase is necessary for pigmentation in *Xenopus* and overexpressed in primary human melanoma lesions. *Am. J. Pathol.* **158**: 2021-2029
- POPE, A. AND HERTZBERG, R. (1999). HTS 2010: A Retrospective Look at Screening in the First Decade of the New Millennium. *J Biomolec. Screening* **4**, (5), 231-233
- POWELL, K., HARVEY, J. AND BELLAMY, A.(1984). Reovirus RNA transcriptase: evidence for a conformational change during activation of the core particle. *J. Virol.* **137**:1-8.

- PRATT, G., AND TOBE, S. (1974).** Juvenile hormones radiobiosynthesised by corpora allata of adult female locusts in vitro. *Life Sci* **14**, 575-86.
- PREDEL, R., AGRICOLA, H., LINDE, D., WOLLWEBER, L., VEENSTRA, J.A., PENZLIN, H. (1994).** The insect neuropeptide corazonin: physiological and immunocytochemical studies in Blattariae. *Zoology* **98**, 35-49.
- RACHINSKY, A., (1994).** Octopamine and serotonin influence corpora allata activity in honey bee (*Apis mellifera*) larvae. *J. Insect Physiol.* **40**, pp. 549-554
- RAY, A., MEMMEL, N. AND KUMARAN, A. (1987).** Developmental regulation of the larval hemolymph protein genes in *Galleria mellonella*. *Roux Arch. Dev. Biol.* **196**, 414-420
- RAZVI, E. (1998).** The current status of high-throughput screening and outlook for the future, part 1. *Drug & Market Development* **9**(4): 89-93
- RHOLAM, M., BRAKCH, N., GERMAIN, D., THOMAS, D., FAHY, C., BOUSSETTA, H., BOILEAU, G., AND COHEN, P. (1995).** Role of amino acid sequences flanking dibasic cleavage sites in precursor proteolytic processing. The importance of the first residue C-terminal of the cleavage site. *Eur J Biochem* **227**, 707-14.
- RHOLAM, M., NICOLAS, P., AND COHEN, P. (1986).** Precursors for peptide hormones share common secondary structures forming features at the proteolytic processing sites. *FEBS Lett* **207**, 1-6.
- RICHARDS, G. (1981).** Insect hormones in development. *Biology Review* **56**: 501-549.
- RIDDIFORD, L. (1994).** Cellular and molecular actions of juvenile hormone. I General considerations and premetamorphic actions. *Adv Insect Physiol* **24**:213-274.
- RIDDIFORD, L., HEWES, R., TRUMAN, J. (1994).** Dynamics and metamorphosis of an identifiable peptidergic neuron in an insect. *J Neurobiol.* **25**(7):819-30.
- RIDLEY, S., ELLIOT, A., YEUNG, M. AND YOULE, D. (1998).** High-Throughput Screening as a Tool for Agrochemical Discovery: Automated Synthesis, Compound Input, Assay Design and Process Management. *Pestic. Sci.* **54**, 327-337
- SASS M., KOMUVES L., KOVACS J. AND FEUER L. (1986).** Inhibition of the formation of protein storage granules by glutaurine in the larval fat body cells of *Mamestra brassicae* (Insecta, Lepidoptera). *Acta Biol Hung* **37**(3-4):249-57.
- SHELLER, K. (1983).** *The Larval Serum Proteins of Insects*. Thieme, New York
- SHELLER, K., FISCHER, B., SCHENKEL, H. (1990).** Molecular properties, functions and developmentally regulated biosynthesis of arylphorin in *Calliphora vicina*. In: Hagedorn HH (ed) *Molecular Insect Science*, Plenum, New York
- SCHENKEL, H., MYLLEK, C., KÖNIG, M., HAUSBERG, P. AND SHELLER, K. (1983).** in Scheller, K. (ed.), *The Larval Serum Proteins of Insects: Function, Biosynthesis, Genetics*, Thieme Verlag, Stuttgart, pp. 18-39,
- SCHOOF, L., VEELAERT, D., VANDEN BROECK, J. AND DELOOF, A., (1997).** Peptides in the locusts, *Locusta migratoria* and *Schistocerca gregaria*. *Peptides* **18**, pp. 145-156
- SCHWEDE, T., DIEMAND, A., GUEX, N., AND PEITSCH, M. (2000).** Protein structure computing in the genomic era. *Res Microbiol* **151**, 107-12 .
- SEDLAK, B. (1981).** An ultrastructural study of neurosecretory fibers within the corpora allata of *Manduca sexta*. *Gen Comp Endocrinol* **44**, 207-18.
- SEHNAL, F. (1966).** Kritisches Studium der Bionomie und Biometrik der in verschiedenen Lebensbedingungen gezüchteten Wachsmotte, *Galleria mellonella* L. (Lepidoptera). *Z. Wiss. Zool.* **174**, 53-82.
- SEKERIS, C. AND SHELLER K. (1977).** Calliphorin, a major protein of the blowfly: correlation between the amount of protein, its biosynthesis, and the titer of translatable calliphorin-mRNA during development. *Dev*

Biol. **59**(1):12-23.

SEREBRIISKII, I., ESTOJAK, J., BERMAN, M., AND GOLEMIS, E. (2000). Approaches to detecting false positives in yeast two-hybrid systems. *Biotechniques* **28**, 328-30, 332-6.

SEREBRIISKII, I., TOBY, G., AND GOLEMIS, E. (2000). Streamlined yeast colorimetric reporter activity assays using scanners and plate readers. *Biotechniques* **29**, 278-9, 282-4, 286-8 .

SEVRIOUKOV, E., HE, J., MOGHRABI, N., SUNIO, A., AND KRAMER, H. (1999). A role for the deep orange and carnation eye color genes in lysosomal delivery in *Drosophila*. *Mol Cell* **4**, 479-86.

SHELBY, K. AND WEBB, B. (1994). Polydnavirus infection inhibits synthesis of an insect plasma protein, arylphorin. *J Gen Virol.* **75** (Pt 9):2285

SHELBY, K. AND WEBB, B. (1997) Polydnavirus infection inhibits translation of specific growth-associated host proteins. *Insect Biochem Mol Biol.* Mar **27**(3):263-70.

SHEMSHEDINI, L. AND WILSON, T. (1990). Resistance to juvenile hormone and an insect growth regulator in *Drosophila* is associated with an altered cytosolic juvenile hormone-binding protein. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **87**(6):2072-6.

SLAMA, K. (1971). Insect juvenile hormone analogues. *Annu Rev Biochem* **40**, 1079-102.

SLAMA, K. AND WILLIAMS, C.(1966). 'Paper factor' as an inhibitor of the embryonic development of the European bug, *Pyrrhocoris apterus*. *Nature.* **16**:210(33):329-30.

SLAMA, K., ROMANUK, M. AND SORM, J. (1974). Insect hormones and bioanalogues. New York : Springer-Verlag

SOUTHERN, E. (1975). Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J Mol Biol* **5**:98(3):503-517

SPINDLER, K. (1997). Vergleichende Endokrinologie: Regulation und Mechanismen . 215 S., Thieme-Verlag, Stuttgart

STAY, B., TOBE, S., BENDENA, W. (1994). Identification, primary structures functions and distribution. *Adv. Insect Physiol* **25**, 267-337

STAY, B., WOODHEAD, A.P., JOSHI, S. AND TOBE, S.S., (1991). Allatostatins, neuropeptide inhibitors of juvenile hormone biosynthesis in brain and corpora allata of the cockroach *Diploptera punctata*. In: Menn, J.J., Kelly, T.J. and Masler, E.P., Editors, 1991. *Insect Neuropeptides, ACS Symposium Series 453*, American Chemical Society, Washington, DC, pp. 164-176

TAHARA, T., MAEDA, Y., KUROIWA, A., UENO, K., OBINATA, M., AND NATORI, S. (1982). Identification of storage-protein messenger RNA of the fleshfly *Sarcophaga peregrina*. *Biochem J* **203**, 571-5.

TANAKA, S. (2000). Hormonal control of body-color polymorphism in *Locusta migratoria*: interaction between [Record Supplied By Publisher]. *J Insect Physiol* **46**, 1535-1544 .

TANAKA, S., OSHIMA, T., OHSUE, K., ONO, T., OIKAWA, S., TAKANO, I., NOGUCHI, T., KANGAWA, K., MINAMINO, N., AND MATSUO, H. (1982). Expression in *Escherichia coli* of chemically synthesized gene for a novel opiate peptide alpha-neo-endorphin. *Nucleic Acids Res* **10**, 1741-54.

TAWFIK, A., TANAKA, S., DE, L. A., SCHOOF, L., BAGGERMAN, G., WAELEKENS, E., DERUA, R., MILNER, Y., YERUSHALMI, Y., AND PENER, M. (1999). Identification of the gregarization-associated dark-pigmentotropin in locusts through an albino mutant. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 7083-7.

TAWFIK, D., GREEN, B. AND ESHHAR, Z. (1992). Detection of catalytic monoclonal antibodies. *Anal Biochem.* **202**(1) : 35-9.

TAYLOR, P. R., BHATT, T., AND HORODYSKI, F. (1996). Molecular characterization and expression analysis of *Manduca sexta* allatotropin. *Eur J Biochem* **239**, 588-96.

- TELFER, W., KUNKEL, J. (1991).** The function and evolution of insect storage hexamers. *Annu Rev Entomol* **36**:205–228
- THOMPSON, J., HIGGINS, D. AND GIBSON, T. (1994).** Clustal w: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, positions-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research*, **22**:4673-4680.
- TOBE, S., AND PRATT, G. (1974).** Dependence of juvenile hormone release from corpus allatum on intraglandular content. *Nature* **252**, 474-6.
- TOJO, S., BETCHAKU, T., ZICCARDI, V., WYATT, G. (1978).** Fat body protein granules and storage protein in the silkworm, *Hyalophora cecropia*. *J Cell Biol* **78** :813–838
- TOJO, S., NAGATA, M., KOBAYASHI, M., (1980).** Storage proteins in the silkworm *Bombyx mori*. *Insect Biochem.* **10**, 289303.
- UENO, K. AND NATORI, S. (1982).** Activation of fat body by 20-hydroxyecdysone for the selective incorporation of storage protein in *Sarcophaga peregrina* larvae. *Insect Biochem* **12** :185–191
- UENO, K. AND NATORI, S. (1987).** Possible involvement of lumichrome in the binding of storage protein to its receptor in *Sarcophaga peregrina*. *J Biol Chem* **262**:12780–12784
- UENO, K., AND NATORI, S. (1984).** Identification of storage protein receptor and its precursor in the fat body membrane of *Sarcophaga peregrina*. *J Biol Chem* **259**, 12107-11.
- UENO, K., OHSAWA, F. AND NATORI, S. (1983).** Identification and activation of storage protein receptor of *Sarcophaga peregrina* fat body by 20-hydroxyecdysone. *J Biol Chem* **258**, 12210-4.
- VAFOPOULOU, X., AND STEEL, C. (1989).** Sex differences in the profiles of prothoracic gland synthetic activity and of hemolymph ecdysteroid titers during development in the last larval instar of *Rhodnius prolixus* (Hemiptera). *Gen Comp Endocrinol* **76**, 390-7.
- VAN AELST L., BARR M, MARCUS S., POLVERINO A., WIGLER M. (1993).** Complex formation between RAS and RAF and other protein kinases. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**(13):6213-7.
- VAN AELST, L. (1998).** Two-hybrid analysis of Ras-Raf interactions. *Methods Mol Biol* **84**, 201-22.
- VAN CRIEKINGE, W. AND BEYAERT, R. (1999).** Yeast Two-Hybrid: State of the Art. *Biological Procedures Online* Vol. 2 No. 1
- VAN, C. W., CORNELIS, S., VAN, D. C. M., VANDENABEELE, P., FIERS, W., AND BEYAERT, R. (1999).** GAL4 is a substrate for caspases: implications for two-hybrid screening and other GAL4-based assays. *Mol Cell Biol Res Commun* **1**, 158-61.
- VEENSTRA, J. (1989).** Isolation and structure of corazonin, a cardioactive peptide from the American cockroach. *FEBS Lett* **250**, 231-4.
- VEENSTRA, J. (1989).** Isolation and structure of two gastrin/CCK-like neuropeptides from the American cockroach homologous to the leucosulfakinins. *Neuropeptides* **14**, 145-9.
- VEENSTRA, J. (1991).** Presence of corazonin in three insect species, and isolation and identification of [His7]corazonin from *Schistocerca americana*. *Peptides* **12**, 1285-9.
- VEENSTRA, J. (1994).** Isolation and structure of the *Drosophila* corazonin gene. *Biochem Biophys Res Commun* **204**, 292-6.
- VEENSTRA, J. (2000).** Mono- and dibasic proteolytic cleavage sites in insect neuroendocrine peptide precursors. *Arch Insect Biochem Physiol* **43**, 49-63.
- VEENSTRA, J. AND COSTES, L. (1999).** Isolation and identification of a peptide and its cDNA from the mosquito *Aedes aegypti* related to *Manduca sexta* allatotropin. *Peptides* **20**, 1145-51.

- VEENSTRA, J. AND DAVIS, N. (1993). Localization of corazonin in the nervous system of the cockroach *Periplaneta americana*. *Cell Tissue Res* **274**, 57-64.
- VEENSTRA, J., LAU, G., AGRICOLA, H. AND PETZEL, D. (1995). Immunohistological localization of regulatory peptides in the midgut of the female mosquito *Aedes aegypti*. *Histochem Cell Biol* **104**, 337-47.
- VEENSTRA, J., LEHMAN, H. AND DAVIS, N. (1994). Allatotropin is a cardioacceleratory peptide in *Manduca sexta*. *J Exp Biol* **188**, 347-54.
- VENTER, J., ADAMS, M., MYERS, E., ET AL. (2001). The sequence of the human genome. *Science (United States)*, **291**, 1304-51
- Virant-Doberlet, M., Horseman, G., Loher, W., and Huber, F. (1994). Neurons projecting from the brain to the corpora allata in orthopteroid insects: anatomy and physiology. *Cell Tissue Res* **277**, 39-50.
- VOIT, R., FELDMAIER-FUCHS, G., SCHWEIKARDT, T., DECKER, H., AND BURMESTER, T. (2000). Complete sequence of the 24mer hemocyanin of the tarantula *Eurypelma californicum*: structure and intramolecular evolution of the subunits. *J Biol Chem*.
- Volbeda, A., and Hol, W. (1989). Crystal structure of hexameric haemocyanin from *Panulirus interruptus* refined at 3.2 Å resolution. *J Mol Biol* **209**, 249-79.
- VOLBEDA, A., FEITERS, M., VINCENT, M., BOUWMAN, E., DOBSON, B., KALK, K., REEDIJK, J. AND HOL, W. (1989). Spectroscopic investigations of *Panulirus interruptus* hemocyanin in the crystalline state. *Eur J Biochem* **181**, 669-73.
- WALHOUT, A., BOULTON, S., VIDAL, M. (2000). Yeast two-hybrid systems and protein interaction mapping projects for yeast and worm. *Yeast* **17**(2):88-94. Review
- WALHOUT, A., SORDELLA, R., LU, X., HARTLEY, J., TEMPLE, G., BRASCH, M., THIERRY-MIEG, N. AND VIDAL, M. (2000). Protein Interaction Mapping in *C. elegans* Using Proteins Involved in Vulval Development. *Science* **7**; 287: 116-122.
- WANG, Z., AND HAUNERLAND, N. (1993). Storage protein uptake in *Helicoverpa zea*. Purification of the very high density lipoprotein receptor from perivisceral fat body. *J Biol Chem* **268**, 16673-8.
- WANG, Z., HAUNERLAND, N. (1994A). Receptor-mediated endocytosis of storage proteins by the fat body of *Helicoverpa zea*. *Cell Tissue Res* **278**:107-115
- WANG, Z., HAUNERLAND, N. (1994B). Storage protein uptake in *Helicoverpa zea*: Arylphorin and VHDL share a single receptor. *Arch Insect Biochem Physiol* **26**:15-26
- WEBB, B., RIDDIFORD, L. (1988). Synthesis of two storage proteins during larval development of the tobacco hornworm, *Manduca sexta*. *Dev Biol.* ;**130**(2):671-81.
- WEDLIN, R. (1999). Bright ideas for high-throughput screening. *Modern Drug Discov.* **3**: 61-71
- WENTWORTH, P. AND JANDA, K.(1998). Generating and analyzing combinatorial chemistry libraries. *Curr. Opin. Biotechnol.* **9**:109, 1998.
- WIGGLESWORTH, V.B., (1935). Functions of the corpus allatum of insects. *Nature* **136**, p. 338.
- WIGGLESWORTH, V.B., (1936). The function of the corpus allatum in the growth and reproduction of *Rhodnius prolixus* (Hemiptera). *Quart. J. Micr. Sci.* **79**, pp. 91-121.
- WILLIAMS, C. (1961). The juvenile hormone. II. Its role in the endocrine control of molting, pupation, and adult development in the *Cecropia* silkworm. *Biol. Bull.* **121**:572-85
- WILLIAMS, C. AND RIDDIFORD. M. (1967). The effects of juvenile hormone analogues on the embryonic

development of silkworms. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **57**:595-601

WILLIAMS, C. AND SLAMA, K. (1966). The Juvenile hormone III. Effect of the "Paper factor" on the growth and metamorphosis of the bug. *Pyrrhocoris apterus*. *Biol. Bull.*, **130**(2) : 247-253.

WOLFGANG, W.J. AND RIDDIFORD, L.M., (1986). Larval cuticular morphogenesis in the tobacco hornworm, *Manduca sexta*, and its hormonal regulation. *Dev. Biol.* **113**, pp. 305-316.

WOODRING, J. AND HOFFMANN, K.H., (1994). The effects of octopamine, dopamine and serotonin on juvenile hormone synthesis, in vitro, in the cricket, *Gryllus bimaculatus*. *J. Insect Physiol.* **40**, pp. 797-802.

YU, C., STAY, B., DING, Q., BENDENA, W. AND TOBE, S. (1995). Immunochemical identification and expression of allatostatins in the gut of *Diptera punctata*. *J. Insect Physiol* **41**, pp. 1035-1043

YUI, R., IWANAGA, T., KURAMOTO, H., AND FUJITA, T. (1985). Neuropeptide immunocytochemistry in protostomian invertebrates, with special reference to insects and molluscs. *Peptides* **6 Suppl 3**, 411-5.

ZHEN, L., JIANG, S., FENG, L., BRIGHT, N., PEDEN, A., SEYMOUR, A., NOVAK, E., ELLIOTT, R., GORIN, M., ROBINSON, M., AND SWANK, R. (1999). Abnormal expression and subcellular distribution of subunit proteins of the AP-3 adaptor complex lead to platelet storage pool deficiency in the pearl mouse. *Blood* **94**, 146-55.

ZITNAN, D., KINGAN, T., KRAMER, S., AND BECKAGE, N. (1995). Accumulation of neuropeptides in the cerebral neurosecretory system of *Manduca sexta* larvae parasitized by the braconid wasp *Cotesia congregata*. *J Comp Neurol* **356**, 83-100.

ZITNAN, D., SEHNAL, F., BRYANT, P. (1993). Neurons producing specific neuropeptides in the central nervous system of normal and pupariation-delayed *Drosophila*. *Dev Biol* **156**(1):117-35.

7. ANHANG

I. Primer

| Primer | „Labor-Bezeichnung“ | Nukleotidsequenz (5'-3') |
|--------------------------------------|-------------------------------------|------------------------------------|
| A. Primer für Sequenzierungen | | |
| S1 | → TriplEx2seq5' (Clontech) | TCCGAGATCTGGACGAGC |
| S2 | ← TriplEx2seq3' (Clontech) | TAATACGACTCACTATAGGG |
| S3 | → Crz5' Seq1 | TAGTCAACGATTGCTCCTTTGAACGT |
| S4 | → Crz5' Seq2 | GATCTTGAGCCCATGTGAGAT |
| S5 | ← Crz3' Seq1 | TACTACAATAACAACATTGTTGTCAACATTTTCA |
| S6 | → pEG202 Sequenzierungs-Primer | CGTCAGCAGAGCTTCACCATTG |
| S7 | → pJG4-5 5'-Sequenzierungs-Primer | CCAGCCTCTTGCTGAGTGGAGATG |
| S8 | ← pJG4-5 3'-Sequenzierungs-Primer | GACAAGCCGACAACCTTGATTGGAG |
| S9 | ← pJG4-5 3'-Sequenzierungs-Primer-2 | CCGACAAGCCGACAACCTTGATTG |
| S10 | → LacZ 3'-5' Seq. | TGGAGCCCGTCAGTATCGGCGG |
| S11 | ← LacZ 5'-3' Seq. | TGCAAGGCGATTAAGTTGGGTAAC |
| S12 | → pSH18-34 Seq | CCAGTGGTTATATGTACAGTACTG |

B. Primer für DNA - Amplifikationen

| | | |
|-----|------------------------------|---|
| A1 | → ABP96 5'-Ende XhoI | <u>CTCGAGGGT</u> GTTATAATGGATCGAGGTGGACGAGT |
| A2 | ← ABP130 3'-Ende XhoI | <u>CTCGAGATTCAATTATTTAGTACAAATGGCTAAGAGGCATTT</u> |
| A3 | ← ABP96 3'-Ende XhoI | <u>GCCCTCGAGAGGCAACAACAGACGATGAGGCAACTTATT</u> |
| A4 | → Calliphorin 5'-Ende + XhoI | <u>CTCGAGCCGATTCTCAATAGTTAACACCATTTTAAATG</u> |
| A5 | ← Calliphorin 3'-Ende + XhoI | <u>CTCGAGTTAATGATAGTAGCTGTAGTCGAAGTGGCC</u> |
| A6 | → pJG4-5-855-882 Pos | CTATTCACCGTAACCGTGAGTCAAACGTTCC |
| A7 | ← A prey-1036-1008 Neg | CTATTCACCGTAACCGTGAGTCAAACGTTCC |
| A8 | ← A prey-1558-1562 Neg | CTAAACATTAACGTCCTTTATGGTAACACCAGGGAA |
| A9 | ← Domänen 1 | ^P - <u>GAATTCGGGAGAGGCATAATCTGGC</u> |
| A10 | → Domänen 2 | ^P - <u>TAACTCGAGAAGCTTTGGACTTCTTCGC</u> |
| A11 | → Domänen 3 | ^P - <u>TACACTCACGAAGAATTGTTGTTCCCTG</u> |
| A12 | ← Domänen 4 | ^P - <u>AATATCACGAGTGTAGTCAACAGGCATGA</u> |
| A13 | → Domänen 5 | ^P - <u>GAATTCCTTCAACAAGGAATCTGTCTGTCTT</u> |
| A14 | → CvAryl1850-Sfila | <u>GGCCATTATGGCCGAAATCTGGTGTCAATGAGTTCAAACGC</u> |
| A15 | → CvAryl2050-Sfila | <u>GGCCATTATGGCCGGATGCAATTCTTCTTACATTGCACCCTA</u> |
| A16 | ← CvAryl3'-Sfilb | <u>GGCCGAGGCGCCGGATGCTACATTGCACCCTACAATTCTTCTT</u> |
| A17 | → BDa 5' primer | <u>GGCCATTATGGCCATACTCACGAAGAATTGTTGTTCCCT</u> |
| A18 | → BDc 5' primer | <u>GGCCATTATGGCCATGTTTCTGAATTGGTTACCTACTTCGA</u> |
| A19 | ← BDb 3' primer | <u>GGCCAGGCGGCCCTTAGGTGTAGATGAAGCTGTCAATTTCCA</u> |
| A20 | ← BDd 3' primer | <u>GGCCGAGGCGGCCCTTAAGGCTTGTGGTTGAGGC</u> |
| A21 | → ABP 5'-Ende+EcoRI | <u>GAATTCGGT</u> GTTATAATGGATCGAGGTGGAC |
| A22 | ← ABP64 3'-Ende+XhoI | <u>CTCGAGACCAGAGATCTCATCATTATCATTGTAATT</u> |
| A23 | ← ABP64 3'-3187+XhoI | <u>CTCGAGTCTGCCACCCAAAATATTGCCT</u> |
| A24 | ← Reporter 1 | GGATCCGGGCTTGGCCAAGCTT |
| A25 | → Reporter2 | TAATAATAACCGGGCAGGCCATGTCTG |
| A26 | → EGFP5' | CGCCACCATGGTGAGCAAGGGC |
| A27 | ← EGFP3' | TTACTTGTACAGCTCGTCCATGCC |
| A28 | → RFP5' | ^P GCCACCATGGTGCCTCCTC |
| A29 | ← RFP3' | ^P CTACAGGAACAGGTGGTGGCGG |

C. sonstige Primer

| | | | |
|-------|---|-----------------|---|
| MCS_u | → | MCS-upper Oligo | ^P AATTCGGCCATTATGGCCATCGATCCCGGGGGCCGCTCGGCC |
| MCS_l | ← | MCS-lower Oligo | ^P TCGAGGGCCGAGGCGGCCCGGGATCGATGGCCATAATGGCCG |

Schnittstellen der Oligonukleotide, die für die Subklonierung der PCR-Produkte verwendet wurden, sind einfach unterstrichen dargestellt. Eingefügte Stopcodons der Oligonukleotid-sequenz sind fett gedruckt dargestellt.

II. Abkürzungen und Amerikanismen

| | |
|------------------|---|
| 20E | 20-Hydroxyecdysol |
| aa | amino acid |
| AD | transkriptionsaktivierende Domäne |
| AS | Aminosäuren |
| Assay | Experiment |
| BD | bindende Domäne |
| blunt end | „stumpfes Ende“ |
| bp | Basen-Paare |
| CA | corpora allata |
| DNA | Desoxyribonukleinsäure |
| dsDNA | doppelsträngige DNA |
| EtBr | Ethidiumbromid |
| FPLC | fast-protein-liquid-chromatography |
| HTS | High throughput screen = Hochdurchsatz Sortiersuche |
| IP | isoelektrischer Punkt |
| JH | Juvenilhormone |
| kbp | kilo-Basen-Paare |
| kDa | kiloDalton |
| Mas-AS | Allatostatin von <i>Manduca sexta</i> |
| MAS-AT | Allatotropin von <i>Manduca sexta</i> |
| MCS | multiple cloning site |
| OD | optische Dichte |
| Oligo | DNA-Oligonukleotid |
| ORF | open reading frame = offenes Leseraster |
| PAGE | Polyacrylamid-Gelelektrophorese |
| PNK | Polynukleotid-Kinase |
| Primer | DNA-Oligonukleotid |
| PTTH | Prothoracotropes Hormon |
| review | Übersichtsartikel |
| RNA | Ribonukleinsäure |
| rpm | Umdrehungen pro Minute |
| RT | Raumtemperatur (20-24°C) |
| Screen/screening | Suche/durchsuchen |
| ssDNA | einzelsträngige DNA |
| ssSS | einzelsträngige Lachsspermien-DNA |
| sticky end | „klebriges Ende“ |
| U | Einheiten (Units), Spannung |
| USP | ultraspiracle |
| ZNS | Zentralnervensystem |

III. Publikationen

Veröffentlichungen in wissenschaftlichen Zeitschriften

- **HANSEN I. A., SEHNAL, F., MEYER, S.R. AND SCHELLER K. (2001).** Corazonin gene expression in the waxmoth *Galleria mellonella*. *Insect Mol Biol.*; **10**(4):341-6.
- **HANSEN I. A., MEYER, S.R., SCHÄFER, I. AND SCHELLER, K. (2001).** Identification of the anterior fat body protein as an interactor of the hexamerin receptor in the blowfly *Calliphora vicina*. *Eur J Biochemistry, In revision*.
- **SEHNAL, F., HANSEN, I. A. AND SCHELLER, K. (2001).** The cDNA-structure of the prothoracicotropic hormone (PTTH) of the silkworm *Hyalophora cecropia*. *Insect Molecular Biology and Biochemistry, In press*.
- **SCHELLER K., SEKERIS, C.E., KROHNE, G., HOCK, R., HANSEN, I.A, AND SCHEER U.(2000).** Localization of glucocorticoid hormone receptors in mitochondria of human cells. *Eur J Cell Biol.* **79**(5):299-307.

Vorträge

- **HANSEN, I.A., GUTSMANN, V. AND SCHELLER, K.** Ecdysteroid induced endocytosis of hexamerins: Binding sites of the ligands and the receptor. 13th Ecdysone workshop, Jena, Germany, July 1998
- **HANSEN, I.A., GUTSMANN, V. AND SCHELLER, K.** Ecdysteroid controlled processing of the *Calliphora* hexamerin receptor: cleavage points and sites of interaction between receptor and its ligands. 6th European Congress of Entomology, Ceske Budejovice, Czech Republic, August 1998

Poster

- **HANSEN, I.A. AND SCHELLER, K.** Identification of the binding domains of *Calliphora* hexamerins and the hexamerin receptor. International Conference on Life Sciences in the Next Millenium, Hyderabad, India, December 1999.
- **HANSEN, I.A., MEYER, S.R., GUTSMANN, V. AND SCHELLER, K.** The yeast-2-hybrid system as a tool to indentify proteins involved in ecdysteroid-controlled hexamerin endocytosis. 14th Ecdysone Workshop, Rapperswil, Swizerland, July 2000.
- **SEHNAL, F., HANSEN, I.A. AND SCHELLER, K.** Prothoracicotropic neurohormones of lepidopteran insects. 14th Ecdysone Workshop, Rapperswil, Swizerland, July 2000.
- **BERLINGER, M., HANSEN, I.A. AND SCHELLER, K.** Interaction of ecdysteroid receptors with non-nuclear proteins in insect cells. 14th Ecdysone Workshop, Rapperswil, Swizerland, July 2000.
- **SCHÄFER, I., HANSEN, I.A. AND SCHELLER, K.** Ecdysteroid controlled biosynthesis of hexamerin in *Tenebrio molitor*. 14th Ecdysone Workshop, Rapperswil, Swizerland, July 2000.

IV. Tabellarischer Lebenslauf

Immo Alex Hansen

| | |
|----------------------|---|
| Geburtstag | 22.04.1969 in Bad Hersfeld, Deutschland |
| Eltern | Rotraut und Alex Hansen |
| Familienstand | verheiratet, zwei Kinder |
| Schulbesuch | 1975 - 1979 Grundschule an der Sommerseite in Bad Hersfeld 1979 - 1985 Gesamtschule Stadtmitte (Konrad-Duden-Schule) in Bad Hersfeld 1979 - 1988 Modellschule Obersberg in Bad Hersfeld, Abschluß: Abitur |
| Militärdienst | 07.1988- 09.1989 in Munster/Oertze und Hessisch Lichtenau |
| Ausbildung | 09.1989 - 08.1991 Ausbildung zum Landwirtschaftlich- technischem Assistenten (LTA) an der Hessische Lehr- und Forschungsanstalt für Grünlandkunde und Feldfutterbau, Eichhof in Bad Hersfeld |
| Studium der Biologie | 11.1991 - 02.1998 an der Bayerische Julius-Maximilians- Universität, Würzburg, Abschluß: Diplom |
| Promotionsstudium | 02.1998 – 12.2000 im Labor von Prof. Dr. Klaus Scheller im Institut für Zell- und Entwicklungsbiologie (Zoologie I), an der Bayerische Julius-Maximilians-Universität, in Würzburg |
| Berufstätigkeit | 02.1998 – 12.2000 Wissenschaftlicher Mitarbeiter am Lehrstuhl für Zell- und Entwicklungsbiologie der Universität Würzburg seit 01.2001 Wissenschaftlicher Mitarbeiter im Schwerpunkt für Endokrinologie und Diabetologie der Medizinischen Klinik der Universität Würzburg |



Und fröhlich sieht er das Insekt
Am Boden leblos ausgestreckt.

Willhelm Busch
"Und die Moral von der Geschicht"