

**Inhibitorische Liganden-gesteuerte
Ionenkanäle bei der Fruchtfliege
Drosophila melanogaster (Meigen, 1830)**

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
des Fachbereichs Biologie
der Universität Hamburg

vorgelegt von Ines Witte
Hamburg, 2004

Genehmigt vom
Fachbereich Biologie der
Universität Hamburg
auf Antrag von Herrn Prof. Dr. M. GEWECKE
Weitere Gutachter der Dissertation:
Herr Priv.-Doz. Dr. T. ROEDER

Tag der Disputation: 23. April 2004

Hamburg, den 12. April 2004



Professor Dr. Arno Frühwald
Dekan

Inhaltsverzeichnis

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	1
1 EINLEITUNG	4
1.1 Die Fruchtfliege <i>Drosophila melanogaster</i>	4
1.1.1 Das visuelle System von <i>Drosophila melanogaster</i>	6
1.2 Inhibitorische Liganden-gesteuerte Ionenkanäle	10
1.3 Inhibitorische Liganden-gesteuerte Ionenkanäle der Fruchtfliege <i>D. melanogaster</i>.....	14
1.4 Zielsetzung der Arbeit.....	16
2 MATERIAL UND METHODEN	18
2.1 Versuchstiere.....	18
2.1.1 Haltung und Zucht	18
2.1.2 Fliegenstämme	18
2.2 Firmennachweis	19
2.3 Geräte.....	20
2.4 Chemikalien.....	21
2.5 Puffer, Medien und Lösungen	22
2.6 Gebrauchsfertige Reagenziensysteme.....	24
2.7 Bakterienstämme	24
2.8 Enzyme.....	25
2.9 Oligonukleotide (Primer)	26
2.9.1 Oligonukleotide zur Amplifikation von Promotorsequenzen	26
2.9.2 Oligonukleotide für die cDNA Synthese	26
2.9.3 Oligonukleotide für die 5`- und 3`-RACE	27
2.9.4 Oligonukleotide zur Amplifikation von Rezeptorklonen	27
2.9.5 Oligonukleotide zur Erzeugung von Sonden für <i>in-situ</i> Hybridisierungen ...	28
2.9.6 Oligonukleotide zur Analyse der gewebespezifischen Verteilung	29
2.9.7 Oligonukleotide zur Erzeugung von Sonden für Northern Blots	30
2.9.8 Oligonukleotide zur Erzeugung transgener <i>D. melanogaster</i>	31
2.9.9 Oligonukleotide zur Sequenzierung klonierter DNA	32
2.10 Plasmide.....	32
2.11 Präparation von Gewebe aus <i>D. melanogaster</i>.....	32

2.12	Allgemeine molekularbiologische Methoden.....	33
2.12.1	Isolierung von RNA.....	33
2.12.2	Isolierung genomischer DNA.....	33
2.12.3	cDNA Synthese.....	34
2.12.4	PCR (Polymerase Chain Reaction).....	36
2.12.5	5`- und 3`-RACE (Rapid Amplification of cDNA Ends).....	37
2.12.6	Bestimmung von DNA- und RNA-Konzentrationen.....	38
2.12.7	Elektrophorese in Agarosegelen.....	39
2.12.8	Isolierung von Nukleinsäuren aus Agarosegelen.....	40
2.13	Homologie-Vergleiche und Phylogenetische Analysen mit Hilfe externer Datenbanken.....	40
2.14	Analyse der gewebsspezifischen Verteilung der Liganden-gesteuerten Chlorid-Kanäle mittels RT-PCR.....	40
2.15	Analyse der entwicklungsspezifischen Verteilung der Liganden-gesteuerten Chlorid-Kanäle mittels Northern-Blot.....	41
2.15.1	Gewinnung Entwicklungsstadien-spezifischer RNA.....	42
2.15.2	Northern Blot.....	42
2.15.3	Hybridisierung mit radioaktiv markierten Sonden.....	43
2.16	Klonierung und Extraktion von DNA.....	44
2.16.1	Restriktionsverdau von DNA.....	44
2.16.2	Dephosphorylierung von DNA-Enden.....	44
2.16.3	Ligation von DNA.....	45
2.16.4	Herstellung chemokompetenter Bakterienzellen.....	45
2.16.5	Transformation von Plasmid-DNA in prokaryotische Zellen.....	46
2.16.6	Plasmid-DNA-Präparation.....	46
2.16.7	Sequenzierung klonierter DNA.....	47
2.17	<i>In-situ</i> Hybridisierungen.....	47
2.17.1	Synthese Digoxigenin-markierter RNA-Sonden.....	48
2.17.2	Kontrolle der <i>in-vitro</i> transkribierten RNA Sonden.....	48
2.17.3	Hybridisierung von Kopfschnitten und Signaldetektion.....	49
2.18	Erzeugung transgener <i>D. melanogaster</i> durch Mikroinjektion.....	51
2.18.1	Konstruktion der Vektoren für RNA-Interferenz Versuche.....	51
2.18.2	Mikroinjektion in die Embryonen von <i>D. melanogaster</i>	54
2.18.3	Selektion transformierter Fliegen.....	56
2.19	Phänotypische Analysen transgener Tiere.....	57
2.19.1	Untersuchungen zur Vitalität.....	58
2.19.2	Untersuchungen zum Entwicklungszyklus.....	59
3	ERGEBNISSE.....	60
3.1	Bioinformatische Analysen zu Homologie und Phylogenie der Liganden-gesteuerten Chlorid-Kanäle.....	60
3.2	Identifizierung und Charakterisierung des Histamin-gesteuerten Chlorid-Kanals von <i>D. melanogaster</i>.....	62

3.2.1	Expressionsanalysen mittels RT-PCR	63
3.2.2	Nachweis der Zellspezifität durch <i>in-situ</i> Hybridisierung	65
3.2.3	Nukleotid- und Aminosäuresequenz.....	69
3.2.4	Herstellung und Analyse transgener Promotor-GAL4 <i>Drosophila</i> -Linien	74
3.3	Entwicklungsspezifische Expression der Liganden-gesteuerten Chlorid-Kanäle von <i>D. melanogaster</i>	79
3.4	Gewebespezifische Expression der Liganden-gesteuerten Chlorid-Kanäle von <i>D. melanogaster</i>	83
3.5	Generierung und phänotypische Analyse transgener Tiere	88
3.5.1	Herstellung transgener <i>Drosophila</i> -Linien für RNA-Interferenz Versuche ...	89
3.5.2	Zeit- und gewebespezifische-Aktivierung der Transkription	90
3.5.3	Phänotypische Analyse temporärer <i>knockout</i> Fliegen	95
4	DISKUSSION	104
4.1	Selektive Steuerung der RNA-Interferenz durch das GAL4/UAS System	105
4.2	Der Histamin-gesteuerte Chlorid-Kanal von <i>Drosophila melanogaster</i>.....	106
4.2.1	Expressionsmuster	107
4.2.2	Topologie und Phylogenie	110
4.2.3	<i>In vivo</i> Funktion der Untereinheiten <i>Dm</i> HA-Cl I und II	112
4.3	Spezifische Expression der Liganden-gesteuerten Chlorid-Kanäle von <i>D. melanogaster</i>	114
4.4	<i>In vivo</i> Funktion ausgewählter Untereinheiten der Liganden-gesteuerten Chlorid-Kanäle von <i>D. melanogaster</i>	119
4.5	Zusammenfassung	122
4.6	Ausblick	125
5	LITERATURVERZEICHNIS	127

Abkürzungsverzeichnis

aa	<i>amino acid(s)</i> (Aminosäuren)
A.dest.	Aqua destillata
Amp.	Ampicillin
Ant	Antennen
AP	alkalische Phosphatase
ATP	Adenosin-5'-Triphosphat
BCIP	5-Brom-4-chlor-3-indolyl-phosphat
bidest	doppelt destilliert
bp	Basenpaar(e)
cDNA	complementary DNA (komplementäre DNA)
D	Darm
DEPC	Diethylpyrocarbonat
dT	Desoxy-Thymidin Ribonukleotid
DNA	desoxyribonucleic acid (Desoxyribonukleinsäure)
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP(s)	2'-Desoxyribonukleotid-5'-Triphosphat(e)
dsDNA	doppelsträngige DNA
dsRNA	doppelsträngige RNA
<i>E.coli</i>	Escherichia coli
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ERG	Elektroretinogramm
EtOH	Ethanol
GFP bzw. <i>gfp</i>	Grünfluoreszenz-Protein bzw. Gen codierend für GFP
GTP	Guanosin-5'-Triphosphat
h	Stunde
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-Piperazino-)-Ethansulfonsäure
Hsp70	<i>heat shock</i> Promotor
kBp	kilo Basenpaare (1000 Basenpaare)
l	Liter
La	Lamina
LB	Luria Broth Medium
LMC	Lamina Monopolarzellen

Lo	Lobula
LP	Lobula Platte
M	Molar
MCS	<i>multiple cloning site</i> (multiple Klonierungssequenz)
min	Minute
ml	Milliliter
mM	millimolar
M-MLV	Moloney-Maus Leukämie Virus
MOPS	3-(N-Morpholino)-Propansulfonsäure
mRNA	messenger ribonucleic acid (Boten-Ribonukleinsäure)
Mu	Muskel
NaAc	Natriumacetat
NBT	4-Nitroblue-tetrazolium-chlorid
OD	optische Dichte
oL	optischer Lobus
PCR	polymerase chain reaction (Polymerase-Kettenreaktion)
PEG	Polyethylenglykol
R1-8	Photorezeptoren
Ret	Retina
RNA	ribonucleic acid (Ribonukleinsäure)
RNAi	RNA-Interferenz
RNase	Ribonuklease
rpm	rounds per minute (Umdrehungen pro Minute)
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse Transkriptions PCR
s	Sekunde
SDS	Sodiumdodecylsulfat (Natriumdodecylsulfat)
ssDNA	<i>single stranded</i> DNA (Einzelstrang DNA)
TAE	Tris-Acetat-EDTA
<i>Taq</i>	<i>Thermus aquaticus</i>
TB	Terrific Broth Medium
TBE	Tris/Boratsäure/EDTA
TE	Tris-EDTA
Tg	Thorakalganglion
Tris	2-Amino-2-(hydroxymethyl)-1,3-Propandiol

Tub	Tubulin Promotor
U	Unit (Enzymaktivitätseinheit)
UAS	<i>Upstream Activating Sequence</i>
ÜNK	Übernachtkultur
UV	Ultraviolett
WT	Wildtyp
w/v	<i>weight per volume</i> (Gewicht pro Volumen)
zG	zentrales Gehirn
ZNS	Zentralnervensystem

1 Einleitung

1.1 Die Fruchtfliege *Drosophila melanogaster*

Die Fruchtfliege *Drosophila melanogaster* wurde erstmals 1830 von J. H. Meigen beschrieben. Bei *D. melanogaster* handelt es sich um ein ca. 3mm langes, holometaboles Insekt, das zu den best untersuchten Organismen unserer heutigen Zeit zählt. Seine geringe Größe, der kurze Lebenszyklus sowie die einfache Haltung und Zucht machen diese Fliege zu einem idealen Forschungsobjekt.

Ein adultes *Drosophila* Weibchen kann bis zu hundert Eier am Tag legen (Sullivan et al., 2000). Bereits 24 Stunden nach der Fertilisation ist bei einer Umgebungstemperatur von 25°C das Embryonalstadium abgeschlossen und die Larven des ersten Stadiums (L1) schlüpfen. Die Tiere durchlaufen innerhalb von 96 Stunden drei Larvalstadien (L1-3), bei denen die Larven des dritten Stadiums das Nährmedium verlassen um sich zu verpuppen. Das Pupaarium dauert ca. 120 Stunden, in der die Metamorphose zur geschlechtsreifen adulten Fliege stattfindet. Bereits 12 Stunden nach der Beendigung des Puppenstadiums sind die adulten Tiere fertil.

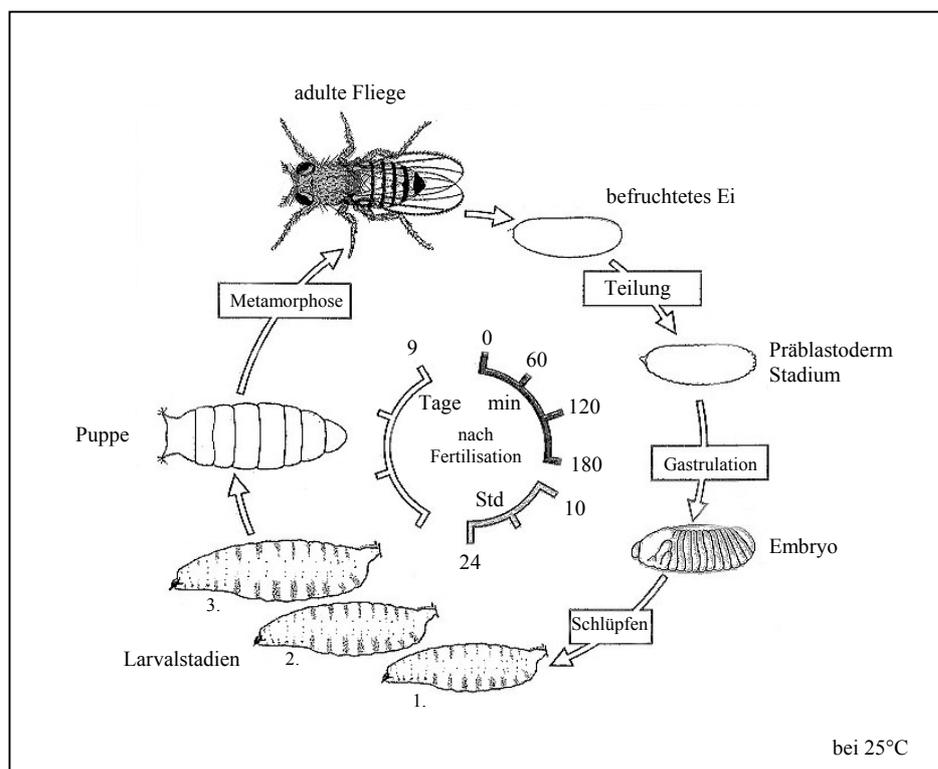


Abbildung 1.1-1: Schematische Darstellung des Lebenszyklus von *Drosophila melanogaster*. Die Embryonalentwicklung lässt sich nach Bownes in 17 Stadien einteilen (Bownes, 1975). Der übersichtshalber sind hier jedoch nur drei Stadien (1.Stadium = befruchtetes Ei, 2.Stadium = Präblastoderm und das 7.Stadium = nach erfolgter Gastrulation) dargestellt. Es folgen die drei Larvalstadien die mit dem Verpuppen der L3 Larven enden. Während des Pupariums findet die Metamorphose zum adulten Tier statt. (Modifiziertes Schema aus biological sciences, University of California)

Drosophila melanogaster verfügt über 4 Chromosomen im haploiden Genom. Hierzu gehören die Geschlechtschromosomen X/Y sowie die Autosomen 2,3 und 4. Die Größe des Genoms beträgt ungefähr 165 Millionen Nukleotide und beinhaltet 13.600 Gene (Adams et al., 2000). Um einen Eindruck von der Größe des Genoms und der Anzahl an Genen zu erhalten, sei hier ein Vergleich mit dem menschlichen Genom (2.910 Millionen Nukleotide; 30.000 Gene (Venter et al., 2001)) und dem der Hefe *Saccaromyces* (13,5 Millionen Nukleotide; 5800 Gene) aufgeführt. Seit dem Jahr 2000 ist die vollständige Sequenz des Genoms von *Drosophila* bekannt (Adams et al., 2000). Die Verfügbarkeit der vollständigen genomischen Sequenz und einiger tausend transgener Fliegenlinien mit unterschiedlichsten kartierten Defekten innerhalb des Genoms machen *Drosophila melanogaster* zu einem idealen Versuchstier der Genetik. Die Entschlüsselung des Genoms ist jedoch nur ein erster Schritt, um grundlegende Mechanismen wie biochemische Abläufe in den Zellen zu verstehen. Eine der größten Herausforderungen unserer heutigen Zeit ist es, die Funktion individueller Gene im Kontext des gesamten Organismus zu erforschen.

Intensive biomedizinische Forschung zeigte, dass viele Gene der Fruchtfliege denen des Menschen entsprechen oder zumindestens ähneln. Ein Beispiel hierfür ist das Pax-6 Gen, das sowohl die Augenentwicklung von *Drosophila* als auch vom Menschen und der Maus steuert (Eggert et al., 1998). So führten viele klonierte *Drosophila* Gene in der Vergangenheit zur Identifizierung von homologen Genen mit ähnlicher Funktion in Säugetieren, einschließlich des Menschen. Dies macht die besondere Bedeutung von *Drosophila melanogaster* als Modellorganismus deutlich.

Von den 13.600 Genen werden 241 dem Funktionskreis der Signaltransduktion zugeordnet. Bei 47 Genen hiervon handelt es sich um potentielle Liganden-gesteuerte Ionenkanäle, von denen die inhibitorischen Kanäle Gegenstand dieser Arbeit sind.

1.1.1 Das visuelle System von *Drosophila melanogaster*

Eine der besonderen Herausforderungen dieser Arbeit bestand in der Identifizierung und Charakterisierung des Histamin-gesteuerten Chlorid-Kanals, einem Mitglied der Familie der inhibitorischen Liganden-gesteuerten Ionenkanäle von *D. melanogaster*. Aufgrund der wichtigen Rolle dieses Rezeptors im visuellen System von *Drosophila melanogaster* (Hardie und Raghu, 2001) soll hier ein Einblick in dieses System gegeben werden.

Das visuelle System adulter *Drosophila melanogaster* besteht aus den Komplexaugen, den Ocellen und den optischen Loben, die sich aus Lamina, Medulla und Lobula Komplex zusammensetzen.

Die Retina der Komplexaugen setzt sich aus ca. 800 Ommatidien zusammen, von denen jedes als einzelnes Auge betrachtet werden kann. Unterhalb der Retina befindet sich durch eine Basalmembran getrennt die Lamina und proximal davon die Medulla. Am weitesten von der Retina entfernt befindet sich der Lobula Komplex, der sich aus Lobula und Lobula Platte zusammensetzt.

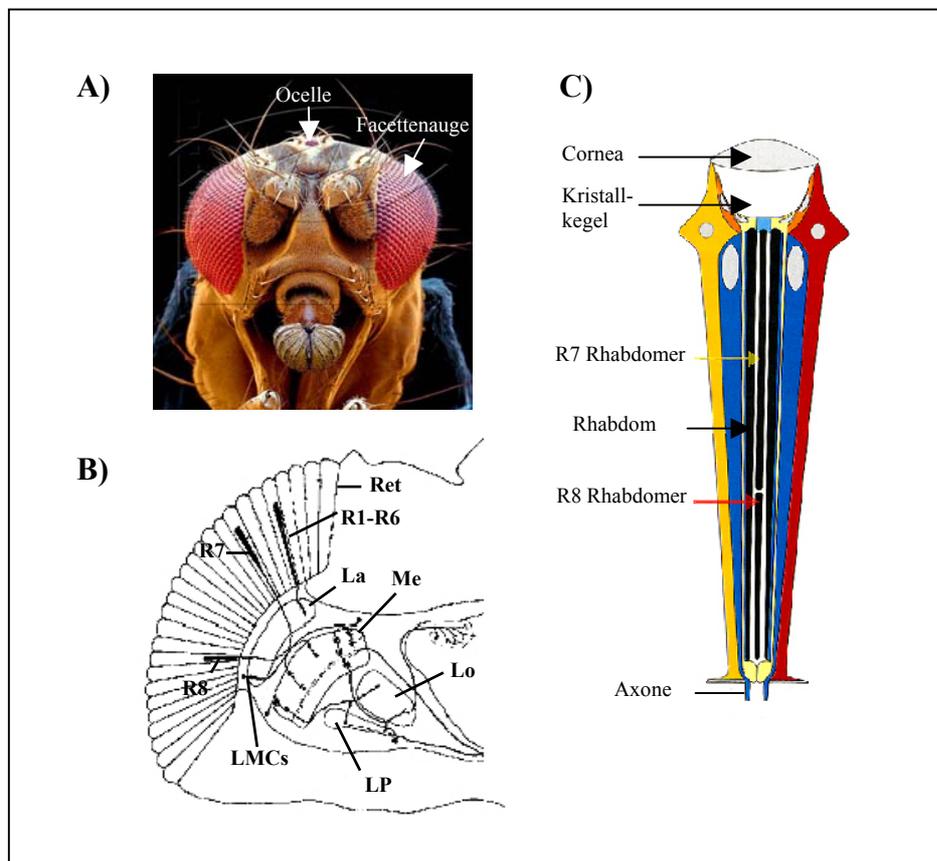


Abbildung 1.1.1-1: Übersicht über das visuelle System von *Drosophila melanogaster*. **A)** Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme der Frontalansicht des Kopfes von *D. melanogaster* in 140facher Vergrößerung. Zu sehen sind die paarigen Facettenaugen mit jeweils ~800 hexagonal angeordneten Ommatidien, aus denen die Retina zusammengesetzt ist. Zusätzlich ist im dorsalen Kopfbereich einer von drei Ocellen zu erkennen (Abb. modifiziert aus <http://www.moosbaum.de/verlag>). In Abb. **B)** ist eine schematische Horizontalschnitt durch eine Kopfhälfte von *Drosophila* dargestellt. Zu erkennen sind die unterschiedlichen Gewebe des optischen Lobus, nämlich die Lamina (La), die Medulla (Me) und der Lobula Komplex bestehend aus Lobula (Lo) und Lobula Platte (LP). Die Photorezeptorzellen R1-6, sowie R7 und R8 wurden der Übersicht halber in verschiedene Ommatidien der Retina (Ret) eingezeichnet. Zusätzlich sind noch die Lamina Monopolarzellen (LMCs) eingezeichnet, die ihr Somata im Cortex der Lamina haben und mit ihren Axonen bis in die Medulla dringen. (Schema modifiziert nach (Pflugfelder und Heisenberg, 1995)). **C)** Schematischer Aufbau eines Ommatidiums in Längsansicht. Die Rhabdomere R1-R6 erstrecken sich über die gesamte Länge des Ommatidiums und sind um die zentralen Rhabdomere R7 und R8 angeordnet. R7 liegt in der distalen Hälfte, R8 in der proximalen. (Schema modifiziert aus (Wolff und Ready, 1993)).

Jedes einzelne Ommatidium bildet einen Zusammenschluss aus ca. 20 Zellen, darunter die 8 Photorezeptorzellen R1-R8 sowie weitere Zellen, die nicht direkt an der Signalperzeption beteiligt sind (Wolff und Ready, 1993). Die Photorezeptorzellen werden aufgrund der Lage ihrer Rhabdomere, dem exprimierten Rhodopsin und ihres Projektionsortes in den optischen Loben in drei Gruppen eingeteilt. Die Rhabdomere der Photorezeptorzellen R1-R6 liegen ringförmig um die zentralen Photorezeptorzellen R7 und R8. Sie erstrecken sich über die gesamte Länge des Ommatidiums und exprimieren ein einziges Rhodopsin (Rh1) das ein breites Absorptionsspektrum mit einem Maximum bei 478nm hat (Zuker et al., 1985). Die Axone dieser Photorezeptoren enden in der Lamina (Braitenberg, 1967; Fischbach und Dittrich, 1989; Shaw et al., 1989). Die Photorezeptoren R7 und R8 liegen im Zentrum des Ommatidiums, wobei der R7 Rezeptor sich in der distalen-, der R8 Rezeptor in der proximalen Hälfte befindet. Die Axone beider Rezeptoren enden gemeinsam in der Medulla, jedoch in unterschiedlichen Schichten (Braitenberg, 1967; Fischbach und Dittrich, 1989; Shaw et al., 1989). Ein weiterer Unterschied der R7 und R8 zu den R1-R6 Rezeptoren besteht in den verwendeten Rhodopsinen. Das Rhabdomer des R7 Rezeptors verwendet eines von zwei möglichen (Rh3 oder Rh4) Rhodopsinen, die ein Absorptionsmaximum von 345nm bzw. 375nm aufweisen (Fryxell und Meyerowitz, 1987; Montell et al., 1987). Das Rhabdomer von R8 verwendet ebenfalls eines von zwei möglichen Rhodopsinen, jedoch handelt es sich hier um die Rhodopsine Rh5 oder Rh6, die ein

Absorptionsmaximum von 437nm und 508nm haben (Huber et al., 1997; Chou et al., 1999; Salcedo et al., 1999).

Die Lamina setzt sich aus verschiedenen neuronalen Komponenten zusammen (Strausfeld und Campos-Ortega, 1977; Shaw, 1981). Hierzu gehören die synaptischen Endigungen der R1-R6 Zellen, die Axone der R7 und R8 Zellen, die Lamina Monopolarzellen (LMC) L1-L5 mit ihren Axonen und Dendriten sowie die Endigungen dreier Zelltypen, deren Somata in der Medulla liegen (C2, C3 und T1). Des weiteren befinden sich verschiedene Arten von Gliazellen in der Lamina, die in sechs morphologisch unterscheidbaren Schichten angeordnet sind (Saint Marie und Carlson, 1985). Mit den Zellen der Satelliten-Glia beginnt der Lamina-Cortex, in dem sich die Zellkörper der Lamina Monopolarzellen L1-L5 befinden (Trujillo-Cenoz, 1965). Die Axone der LMCs durchziehen das Lamina-Neuropil, wobei sie mehrere synaptische Verknüpfungen mit den Axonen der Photorezeptoren R1-R6 bilden. Die Axone der Photorezeptoren R7 und R8 bilden keine synaptischen Kontakte innerhalb der Lamina. Die einzigen Zellen mit Zellkörpern im Lamina-Neuropil sind die epithelialen Gliazellen, die der Isolierung der einzelnen Komponenten der Lamina untereinander dienen. Die Axone der R1-R6 Rezeptoren konvergieren auf eine *Cartridge* der Lamina, wo sie auf Neurone 2. Ordnung umgeschaltet werden. Die Projektion dieser Rezeptorneurone erfolgt nach dem Prinzip des neuralen Superpositionsauges (Kirschfeld, 1967; Kirschfeld, 1969). Die proximale Grenze der Lamina wird durch eine Schicht marginaler Gliazellen gebildet, die für die Entwicklung der optischen Loben von großer Bedeutung ist, da sie das Wachstum der R1-R6 Axone stoppt (Trujillo-Cenoz, 1965; Winberg et al., 1992). Die Axone der R7 und R8 sowie der LMCs durchbrechen diese Schicht und dringen von dort über das erste optische Chiasma in die Medulla ein.

Die Medulla ist in Bezug auf Zelltypen, Zellzahl und Verschaltung deutlich komplexer aufgebaut als die Lamina und daher noch nicht erschöpfend untersucht (Meinertzhagen und Hanson, 1993). Die Axone der Photorezeptoren R7 und R8 enden in der Medulla und werden hier auf Neurone 2. Ordnung umgeschaltet. Innerhalb einer Säule der Medulla terminieren sowohl die Axone der R7 und R8 als auch die L1-L5 Axone der Lamina Monopolarzellen, die denselben Bereich im Sichtfeld wahrnehmen und aus dem selben Ommatidium stammen. Jede Säule erhält so direkt Informationen von genau einem Punkt im Sichtfeld. In der Medulla finden außerdem erste Verschaltungen zu höheren Bereichen des Gehirns sowie direkte Verbindungen zu den Muskeln statt.

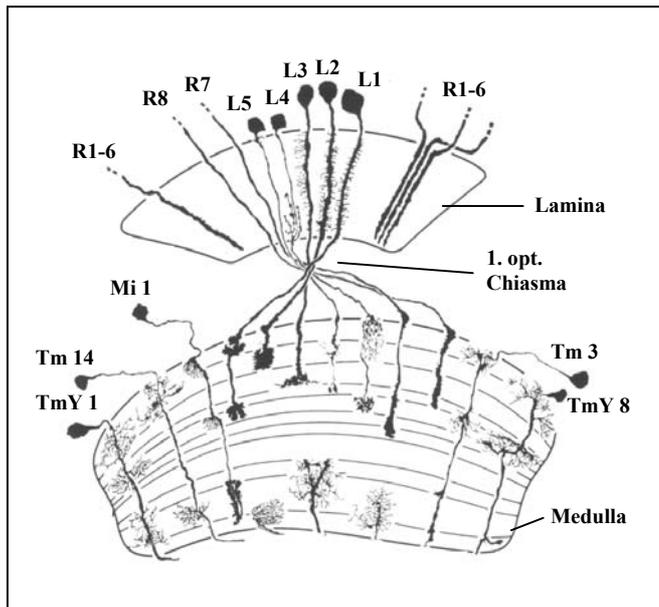


Abbildung 1.1.1-2: Organisation der neuronalen Zellen der Lamina und Medulla. Dargestellt ist ein horizontales Diagramm der Photorezeptorterminalen in Lamina und Medulla der optischen Loben von *D. melanogaster*. R1-6, R7 und R8 = Photorezeptoren; L1-5 = Lamina Monopolarzellen; Mi 1 = intrinsisches Medullaneuron; Tm 3 + 14 = Verbindungsneurone Medulla-Lobula; TmY 1 + 8 = Verbindungsneurone Medulla-Lobula und Lobula Platte. (modifiziertes Schema nach (Fischbach und Dittrich, 1989))

Proximal der Medulla befindet sich der Lobula Komplex, der sich aus der anterioren Lobula und posterioren Lobula Platte zusammensetzt. Der Lobula Komplex und die Medulla sind über das innere optische Chiasma miteinander verbunden. Der Lobula Komplex erhält kein direktes Signal von den Photorezeptoren, sondern nur ein indirektes durch die Neurone aus der Medulla (Fischbach und Dittrich, 1989). Der Lobula Komplex ist ebenfalls direkt mit Muskeln verbunden, was auf eine Funktion bei der Bewegungswahrnehmung und Steuerung hindeutet (Frye und Dickinson, 2001).

Die visuelle Signaltransduktion soll hier nicht im Detail besprochen werden. Aufgrund der entscheidenden Rolle des Histamin-gesteuerten Chlorid-Kanals bei der Signalweiterleitung soll sie jedoch kurz erwähnt werden.

Der Ort der Lichtaufnahme sind die Rhabdomere, die sich im Inneren der Ommatidien befinden. Lichteinfall löst hier eine Signalkaskade aus, die letztendlich zum Öffnen von Kationenkanälen führt (Hardie und Raghu, 2001). Der Einstrom von Kationen in die Photorezeptorzelle führt zu einer Depolarisation selbiger, was die Ausschüttung des Neurotransmitters Histamin bewirkt. Durch die Bindung des Neurotransmitters an einen inhibitorischen ionotropen Rezeptor der postsynaptischen Membran wird ein Einstrom von Cl^- Ionen bewirkt, was zu einer Inhibierung der Zelle aufgrund einer Hyperpolarisation führt (Hardie, 1989). Eine Weiterleitung des Signals erfolgt somit nur, wenn kein Histamin ausgeschüttet wird. Für eine sensitive Signalübertragung ist es daher notwendig, dass der Transmitter so schnell wie möglich aus dem synaptischen Spalt entfernt oder inaktiviert wird, um die postsynaptische Inhibierung wieder aufzuheben. Eine Inaktivierung kann durch den Abbau des Transmitters bewirkt

werden, so wie dies bei dem Neurotransmitter Acetylcholin durch die Acetylcholinesterase der Fall ist. Viele Neurotransmitter werden jedoch auch direkt aus dem synaptischen Spalt entfernt, vor allem bei Synapsen mit hoher Neurotransmitterausschüttung, wie dies auch bei den Photorezeptoren der Fall ist. Für die Photorezeptoren von *Balanus nubilus* konnte zum Beispiel nachgewiesen werden, dass das Histamin aus dem synaptischen Spalt zurückgewonnen wird (Stuart et al., 1996). Auf Grund der langsamen *de novo* Synthese scheint sogar ein Großteil des Histamins über Wiederaufnahme in die Synapsen zu gelangen (Morgan et al., 1999). Außerdem stellte sich heraus, dass Histamin bei Dunkelheit in den Gliazellen angereichert wird, während es in den Photorezeptorzellen verringert zu sein scheint (Stuart et al., 1996). Eine Beteiligung der Gliazellen am Rückführungsprozess ist demnach nicht ausgeschlossen. Für *Drosophila* konnte ein derartiger Prozess indirekt durch Fütterungsexperimente mit Histamin nachgewiesen werden (Melzig et al., 1998).

1.2 Inhibitorische Liganden-gesteuerte Ionenkanäle

Die inhibitorischen Liganden-gesteuerten Ionenkanäle gehören zu der Familie der ionotropen Rezeptoren. Hierbei handelt es sich um membrandurchspannende Protein-Komplexe, die aus mehreren Peptiduntereinheiten bestehen. In der Regel sind dies 5 Untereinheiten, die sich zu einem Makromolekülkomplex zusammenlagern, der sowohl die Ligandenbindungsstelle als auch den Ionenkanal enthält. Jede Untereinheit besitzt 4 transmembrane Domänen. Sowohl das amino- als auch das carboxyterminale Ende befinden sich auf der extrazellulären Seite. Die große extrazelluläre N-terminale Domäne und die hier lokalisierte Cys-Cys Brücke sind charakteristisch für die Mitglieder dieser Familie. Der wohl bekannteste Vertreter der Familie der ionotropen Rezeptoren ist der nicotinische Acetylcholin (nACh) Rezeptor (Numa et al., 1983; Unwin, 1993).

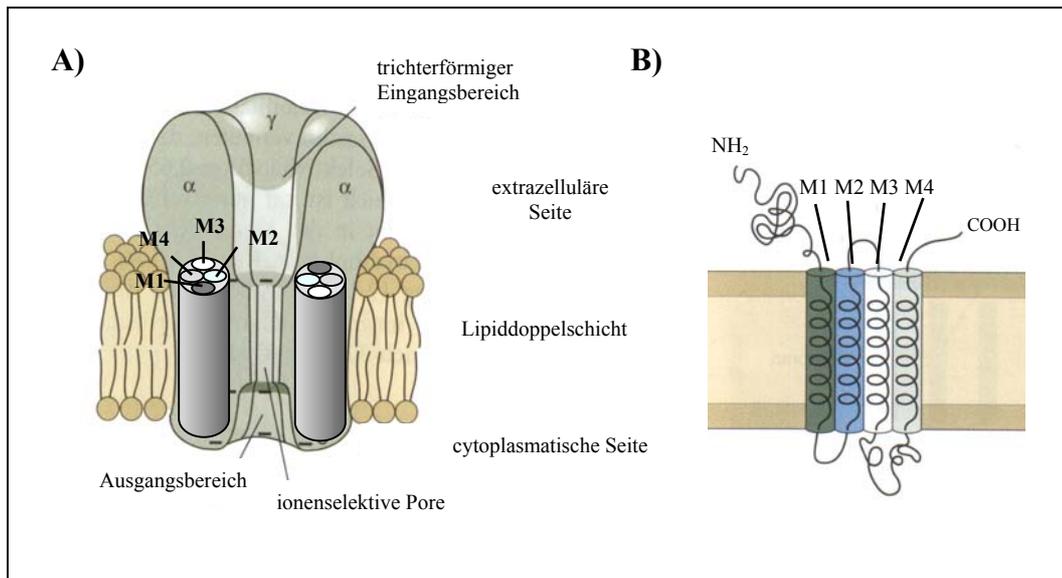


Abbildung 1.2-1: Funktionsmodell des nicotinischen Acetylcholin Rezeptors und molekulares Modell einer einzelnen Untereinheit. In Abb. A) ist ein Längsschnitt durch ein Funktionsmodell dieses Rezeptors dargestellt. Drei der fünf Untereinheiten (α , α , β , γ , δ) sind abgebildet, wobei die beiden α Untereinheiten identisch sind. Jede Untereinheit setzt sich aus 4 membrandurchspannenden α -Helices zusammen (M1-M4), was mittels eines Zylinders schematisch für die α Untereinheiten dargestellt wurde. Die Untereinheiten sind so angeordnet, dass sie eine Pore bilden, wobei das M2-Segment jeder Untereinheit nach innen gewandt ist und die Pore auskleidet. Der Ein- und Ausgangsbereich dienen möglicherweise bereits als Vorfilter für Kationen. In Abb. B) ist eine einzelne Untereinheit mit den 4 membrandurchspannenden α -Helices M1-M4 dargestellt. Sowohl der N- als auch der C-Terminus des Proteins befindet sich auf der extrazellulären Seite. Bei beiden Abbildungen handelt es sich um ein modifiziertes Schema aus (Kandel et al., 1996) basierend auf weiteren Untersuchungen (Numa et al., 1983; Toyoshima und Unwin, 1990; Unwin, 1993).

Die Anlagerung eines oder mehrerer Transmittermoleküle verursacht eine Konformationsänderung des Rezeptorproteins, wodurch die Kanalpore geöffnet wird (Kandel et al., 1996). Hierdurch wird der Kanal für Ionen wie Na^+ , K^+ oder Cl^- passierbar, was zu postsynaptischen Potentialen führt. Man unterscheidet inhibitorische und exzitatorische postsynaptische Potentiale. Ob eine Transmitterfreisetzung in den synaptischen Spalt erregend oder hemmend auf die postsynaptische Zelle wirkt, hängt nicht von dem Transmitter sondern von den vorhandenen Ionenkanälen der postsynaptischen Membran ab. Als Beispiel sei hier der Neurotransmitter Glutamat aufgeführt, der bei *Drosophila melanogaster* sowohl in der Lage ist einen kationenselektiven als auch einen anionenselektiven Kanal zu öffnen (Betz et al., 1993; Cully et al., 1996).

Bei inhibitorischen Ionenkanälen führt die Bindung des Liganden zur Öffnung eines Cl⁻ Kanals, was zu einer Hyperpolarisation der Membran führt, da das Gleichgewichtspotential dieser Ionen niedriger als das Ruhepotential ist. Die synaptische Übertragung wird hierdurch erschwert oder sogar ganz gehemmt. Als Liganden derartiger Rezeptoren sind die Neurotransmitter Glycin, Glutamat, Serotonin, GABA (γ -Aminobuttersäure) und Histamin bekannt (Hardie, 1989; French-Constant et al., 1991; Ortells und Lunt, 1995; Cully et al., 1996; Ranganathan et al., 2000).

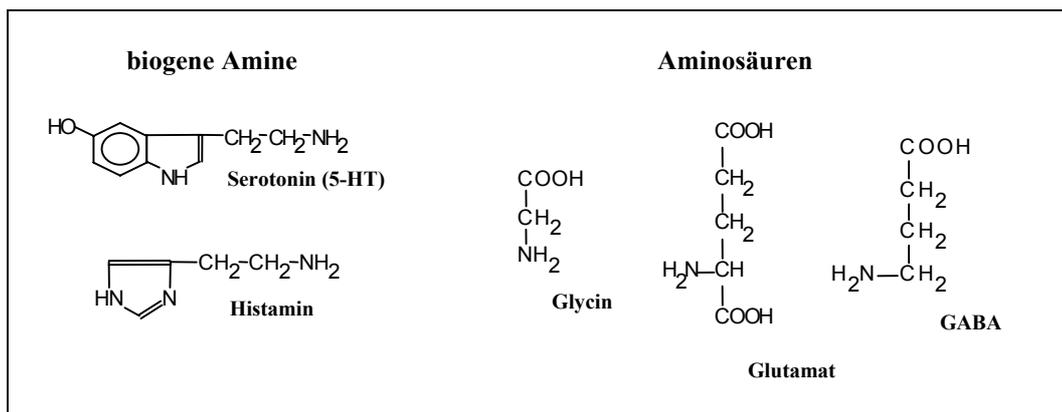


Abbildung 1.2-2: Chemische Struktur der Neurotransmitter inhibitorischer Ligandengesteuerter Chlorid-Kanäle. Dargestellt sind die biogenen Amine Serotonin und Histamin, sowie die Aminosäuren Glycin, Glutamat und GABA (γ -Aminobuttersäure).

Die schnelle synaptische Signalübertragung durch diese Rezeptoren ist von großer Bedeutung. Dies wird besonders deutlich bei den ionotropen GABA Rezeptoren, die sowohl bei Vertebraten als auch bei Invertebraten eine entscheidende Rolle bei der Regulation der neuronalen Aktivität im Nervensystem spielen (Mody et al., 1994; Hosie et al., 1997). Humane GABA_A Rezeptoren bilden die Angriffsstelle für Benzodiazepine und Barbiturate. Zu den Benzodiazepinen gehören die Substanzklassen Diazepam (=Valium) und Chlordiazepoxid (Librium), die eine angstlösende und muskelrelaxierende Wirkung auf den Organismus ausüben. Die Barbiturate gehören zu der Gruppe der Schlafmittel (= Hypnotika) und besitzen eine sedierende, hypnotische und narkotische Wirkung. Die Bindung dieser Substanzen erfolgt an unterschiedlichen funktionellen Domänen des GABA_A Rezeptors und steigert den Cl⁻ Einstrom durch diesen Kanal. Die Bindung eines der drei Liganden (GABA, Benzodiazepin oder Barbiturat) beeinflusst die Affinität des Rezeptors gegenüber den anderen Liganden. Sowohl Benzodiazepine als auch Barbiturate binden stärker, wenn gleichzeitig GABA an den Rezeptor bindet (Kandel et al., 1996).

Auch bei Invertebraten sind diese Rezeptoren wichtige Angriffspunkte unterschiedlicher chemischer Substanzen. Ivermectin ist ein Breitspektrumantiparasitikum aus der Gruppe der Avermectine und zählt zu den Insektiziden der zweiten Generation (Dettner und Peters, 1999). Bei GABA-gesteuerten Chlorid-Kanälen bewirkt die Bindung von Avermectinen eine Potenzierung der Wirkung der γ -Aminobuttersäure (GABA). GABA ist für die Übermittlung inhibitorischer Signale von den Interneuronen zu den Motorneuronen in Nematoden und von den Motorneuronen zu den Muskelzellen bei Arthropoden verantwortlich und reguliert als inhibitorischer Transmitter den Cl⁻ Einstrom in die Zelle (Campbell, 1981; Campbell et al., 1983). Avermectine stimulieren die präsynaptische GABA Freisetzung und erhöhen die Affinität der postsynaptischen GABA-Rezeptoren. Hierdurch kommt es zu einer längerfristigen Öffnung der Chlorid-Kanäle der Membranen der Nervenzellen und somit zu einer Blockierung der Erregungsüberleitung (Campbell, 1981; Wang und Pong, 1982; Campbell et al., 1983; Tranquilli et al., 1987; Sutherland und Campbell, 1990).

Avermectine binden auch an die Glutamat-gesteuerten Chlorid-Kanäle der Nervenzellen von Nematoden sowie an die der Nerven- und Muskelzellen von Arthropoden (Turner und Schaeffer, 1989). Glutamat-gesteuerte Chlorid-Kanäle sind typisch für Wirbellose und kommen bei höheren Tieren nicht vor. Die Bindung von Avermectinen führt zum Öffnen der Kanäle, wodurch ein Cl⁻ Einstrom und eine hieraus resultierende Hyperpolarisation der Zellemembran bewirkt wird. Hierdurch kommt es zu einer Blockierung der Erregungsüberleitung, in Folge dessen keine exzitatorischen Stimuli die Motorneurone (Nematoden) und Muskelzellen (Arthropoden) mehr erreichen. Dies führt zu einer schlaffen Paralyse und zum Tod der Tiere (Cully et al., 1996; Jagannathan et al., 1999; Kane et al., 2000).

Die enorme physiologische Relevanz dieser Rezeptoren wird ebenfalls an dem humanen Glycin-gesteuerten Chlorid-Kanal (GLRA1) deutlich. Eine Punktmutation im extrazellulären Bereich des M2 Segmentes führt zu der Krankheit Hyperekplexie, die auch als *stiff baby* Syndrom oder *startle disease* bekannt ist (Langosch et al., 1994). Menschen mit Hyperekplexie leiden unter Bewegungsstörungen, die denen einer subletalen Strychninvergiftung gleichen. Strychnin zählt zu den Interneuronengiften und führt durch eine Aufhebung der physiologischen Hemmung der Interneurone im ZNS zu einer gesteigerten Erregbarkeit (Krämpfe) (Hildebrandt, 1993). Dies erfolgt durch die Bindung des Antagonisten Strychnin an die Glycin Rezeptoren, woraus eine Blockierung dieser Kanäle resultiert (Langosch et al., 1994). Davon ist besonders die

Muskulatur betroffen, die durch einen Wegfall der Hemmung zu einer gleichzeitigen Kontraktion der Beuge- und Streckmuskulatur an Gelenken führen kann. Die hierdurch verursachten Krämpfe sind sehr schmerzhaft und laufen bei vollem Bewusstsein ab. Ist die Atemmuskulatur an den Krämpfen beteiligt, kann es zum Tod durch Atemlähmung kommen.

1.3 Inhibitorische Liganden-gesteuerte Ionenkanäle der Fruchtfliege *D. melanogaster*

Über die inhibitorischen Liganden-gesteuerten Ionenkanäle von *D. melanogaster* ist noch sehr wenig bekannt. Lediglich 4 Gene konnten bisher als Untereinheiten derartiger Rezeptoren identifiziert werden. Hierbei handelt es sich um die drei Untereinheiten ionotroper GABA Rezeptoren Lcch3, Grd und Rdl (Aronstein et al., 1996; Hosie et al., 1997), sowie um die Untereinheit des Glutamat Rezeptors GluCl (Cully et al., 1996).

Für weitere inhibitorische ionotrope Rezeptoren existierten bis zum Beginn dieser Arbeit nur Vorhersagen, die mit Hilfe von Sequenzvergleichen bereits identifizierter Untereinheiten ionotroper Rezeptoren mit den potentiellen Genen aus der genomischen DNA von *Drosophila* abgeleitet wurden (<http://flybase.bio.indiana.edu/>).

GABA Rezeptoren und GABAerge Neurone konnten im zentralen Nervensystem aller Entwicklungsstadien von *D. melanogaster* nachgewiesen werden (Buchner et al., 1988; Jackson et al., 1990; Harrison et al., 1996; Yasuyama et al., 2002). Der Glutamat-gesteuerte Chlorid-Kanal konnte bisher in den Muskeln der Larven von *Drosophila* (Delgado et al., 1989), sowie in Muskeln und Nervensystemen verschiedenster Insekten nachgewiesen werden (Cull-Candy, 1976; Horseman et al., 1988).

Sowohl Glutamat- als auch GABA-Rezeptoren sind als Ziel für Insektizide seit langem bekannt (Eldefrawi und Eldefrawi, 1987; Ffrench-Constant, 1994) (vergleiche 1.2). Der chlorierte Kohlenwasserstoff Dieldrin gehört zu den Insektiziden der ersten Generation und hat früher eine breite Anwendung in der Schädlingsbekämpfung gefunden (Dettner und Peters, 1999). Die Applikation von Dieldrin führt zu einer stark verringerten Öffnungswahrscheinlichkeit der GABA Rezeptoren (Ikeda et al., 1998). Es zeigte sich jedoch, dass bei der Verwendung dieses Insektizides sehr schnell Resistenzen auftraten. Anhand von *Drosophila melanogaster* konnte diese Resistenz gegen Dieldrin auf eine Mutation innerhalb einer Untereinheit des GABA-gesteuerten Chlorid-Kanals Rdl

zurückgeführt werden (Ffrench-Constant et al., 1993; Ffrench-Constant et al., 2000). Für diese Untereinheit wurden bereits zahlreiche Mutationen beschrieben, die wichtige Einblicke in die physiologischen Relevanz dieser Rezeptor Untereinheit und ihre Rolle bei der Wirkungsweise von Insektiziden ermöglicht haben (Ffrench-Constant et al., 1991; Ffrench-Constant et al., 1993; Stilwell et al., 1995; Stilwell und Ffrench-Constant, 1998; Kane et al., 2000). Zusätzlich sind für dieses Gen bisher drei Spleißvarianten beschrieben worden, die sich geringfügig in ihrer Affinität gegenüber GABA unterscheiden (Ffrench-Constant und Rocheleau, 1993; Hosie et al., 2001).

Für die Untereinheit des Glutamat-gesteuerten Chlorid-Kanals GluCl wurden bisher zwei Mutationen beschrieben. Hierbei handelt es sich zum einen um die GluCl α^{glc^1} Mutation, bei der an Position 299 des Proteins die Aminosäure Prolin gegen die Aminosäure Serin vertauscht wurde (Kane et al., 2000), sowie um die GluCl KG09220 Mutation die unter der Stock Nummer BL-15172 im Bloomington Stock Center (<http://fly.bio.indiana.edu/>) zur Verfügung steht. Durch Untersuchungen an Fliegen der *glc¹* Mutante konnten neurologische Defekte, die vermutlich auf die Rolle dieses Gens im Nervensystem zurückzuführen sind, aufgezeigt werden (Kane et al., 2000). Des Weiteren konnte eine erhöhte Resistenz gegen das Insektizid Ivermectin (s. 1.2) bei Fliegen mit dieser Mutation festgestellt werden. Dieses Gen ist gerade im Hinblick auf die Wirkung von Insektiziden von großem Interesse, da es keine Glutamat-gesteuerten Chlorid-Kanäle bei Vertebraten gibt und dieser Rezeptor somit einen sehr spezifischen Angriffspunkt bieten würde.

In einer Studie von Ludmerer et al. konnte gezeigt werden, dass die beiden Untereinheiten GluCl und Rdl *in vivo* gemeinsam, eventuell mit weiteren noch nicht identifizierten Untereinheiten einen heteromultimeren Kanal bilden (Ludmerer et al., 2002).

Glutamat und GABA sind jedoch nicht die einzigen Neurotransmitter der inhibitorischen Liganden-gesteuerten Ionenkanäle von *Drosophila melanogaster*. Histamin, das zu der Gruppe der biogenen Amine gehört, ist ein seit langem bekannter Ligand inhibitorischer Ionenkanäle bei Invertebraten (McClintock und Ache, 1989; Buchner et al., 1993; Melzig et al., 1998). Der Histamin-gesteuerte Chlorid-Kanal ist der wichtigste Rezeptor im visuellen System von Arthropoden. Auch bei *Drosophila* ist dieser Rezeptor bisher vorwiegend durch seine entscheidende Rolle im visuellen System bekannt (Hardie, 1989; McClintock und Ache, 1989). Aber auch innerhalb des mechanosensorischen Systems ist der Histamin-gesteuerte Chlorid-Kanal von

Bedeutung, auch wenn seine Funktion innerhalb dieses Systems noch sehr wenig untersucht wurde (Melzig et al., 1996).

Sowohl immunhistochemisch (Nassel et al., 1988; Pollack und Hofbauer, 1991; Sarthy, 1991) als auch elektrophysiologisch (Hardie, 1987, 1989) konnte bisher gezeigt werden, dass Histamin der wichtigste Neurotransmitter in den optischen Loben der Arthropoden ist (Hardie, 1987; Stuart et al., 1996; Stuart, 1999). Eine Identifizierung der Untereinheiten dieses bedeutenden ionotropen Rezeptors der Arthropoden auf molekularbiologischer Ebene, sowie eine umfassende Charakterisierung war bis zum Beginn dieser Arbeit jedoch noch nicht erfolgt.

1.4 Zielsetzung der Arbeit

Ziel dieser Doktorarbeit war es, genauere Kenntnisse über die Expression und Funktion der Mitglieder der Familie der inhibitorischen Liganden-gesteuerten Chlorid-Kanäle von *Drosophila melanogaster* zu erhalten. Ein besonderer Schwerpunkt lag dabei auf der Identifizierung und Charakterisierung der Untereinheiten des Histamin-gesteuerten Chlorid-Kanals.

Durch bioinformatische Analysen sollten alle potentiellen Liganden-gesteuerten Chlorid-Kanäle von *D. melanogaster* ermittelt werden. Die anschließende Identifizierung der Untereinheiten des Histamin-gesteuerten Chlorid-Kanals sollte über deren Expressionsmuster, basierend auf den Kenntnissen über die Projektion der Photorezeptoren in den optischen Loben, erfolgen. Zu diesem Zweck sollten Expressionsanalysen mit sämtlichen potentiellen Kandidaten aus der Familie der inhibitorischen Liganden-gesteuerten Chlorid-Kanäle durchgeführt werden. Für die aufgrund dieser ersten Analyse eingegrenzte Gruppe potentieller Kandidaten sollte eine genaue zellspezifische Analyse des Expressionsmusters erfolgen. Die hieraus resultierenden potentiellen Gene des Histamin-gesteuerten Rezeptors sollten kloniert und sequenziert werden.

Um einen Einblick in die *in vivo* Funktion der potentiellen Untereinheiten des Histamin-gesteuerten Chlorid-Kanals zu erhalten, war die Herstellung spezieller UAS-RNAi Vektoren sowie die Erzeugung transgener Fliegen durch Mikroinjektion vorgesehen. Mit Hilfe derartiger transgener Fliegenlinien sollte die Generierung temporärer *knockouts* der untersuchten Gene durch RNA-Interferenz ermöglicht werden. Durch das

GAL4/UAS System (Brand und Perrimon, 1993) sollte eine zeit- und gewebespezifische Steuerung des *knockout* Effektes ermöglicht werden. Hierbei handelte es sich um eine bisher nicht etablierte Methode in der Arbeitsgruppe. Die Etablierung dieser Methode war daher von grundlegender Bedeutung und ein wichtiges Ziel dieser Arbeit.

Für eine exakte Ermittlung des räumlichen und zeitlichen Expressionsmusters der Untereinheiten des Histamin-gesteuerten Chlorid-Kanals war die Erzeugung von Promotor-GAL4-Fusionsvektoren zur Mikroinjektion in die Embryonen von *D. melanogaster* geplant.

Um erste Aussagen über mögliche Interaktionen zwischen einzelnen Mitglieder der Familie der inhibitorischen Liganden-gesteuerten Chlorid-Kanäle machen zu können, sollten alle Mitglieder einer Analyse des gewebespezifischen Expressionsmusters unterzogen werden. Für einzelne Mitglieder war eine Verifizierung dieser Ergebnisse auf zellspezifischer Ebene geplant. Aufgrund ihrer großen physiologischen Relevanz sollten für die Untereinheiten der GABA- und Glutamat-gesteuerten Chlorid Kanäle, sowie die Untereinheiten des Histamin-gesteuerten Chlorid Kanals die entwicklungspezifische Expression dargestellt werden. Abschließend waren erste Analysen zur *in vivo* Funktion einzelner Gene durch RNA-Interferenz geplant. Zu diesem Zweck war die Herstellung spezieller UAS-RNAi Vektoren, sowie die Injektion dieser Vektoren in die Embryonen von *D. melanogaster* vorgesehen.

2 Material und Methoden

2.1 Versuchstiere

2.1.1 Haltung und Zucht

Für die allgemeinen Untersuchungen der Liganden-gesteuerten Chlorid-Kanäle wurde als Versuchstier *Drosophila melanogaster* des Laborstammes Canton-S (CS) verwendet. Die Haltung der Tiere erfolgte in Mini-Life-Stopfen Gläser (Bioform), die zu ~1/4 mit Standardnährmedium gefüllt waren, bei 25°C und einer relativen Luftfeuchtigkeit von 50-60 %. Als Nahrungsquelle diente *Drosophila* Standardnährmedium (s. 2.5), der zum Schutz gegen Milben und Pilze mit Propionsäure (3,3 ml/L) und Nipaginlösung (2 ml/100 ml) versetzt wurde.

Das Umsetzen der Tiere in neue Futtergläser erfolgte nach 1-2 Wochen durch betäuben der adulten Tiere mit Stickstoff und Transfer in die neuen Gläser.

2.1.2 Fliegenstämme

WT Canton-S	Dieser Fliegenstamm wurde freundlicherweise von Herrn Prof. Heisenberg (Universität Würzburg) zur Verfügung gestellt.
w1118	Dieser Fliegenstamm wurde freundlicherweise von Herrn Dr. Fiala (Universität Würzburg) zur Verfügung gestellt.
yw; P{tub-GAL4; TM3, Sb}	Dieser Fliegenstamm wurde freundlicherweise von Herrn Prof. Heisenberg (Universität Würzburg) zur Verfügung gestellt.

Die folgenden *Drosophila* Stämme stammen alle aus dem Bloomington *Drosophila* Stock Center

w[*]; P{w[+mC]=GAL4-Hsp70.PB}89-2-1

w[*];P{w[+mC]=Nrv2-GAL4.S}3;P{w[+mC]=Nrv2-GAL4.S}8

w[1118]; P{w[+mC]= UAS-Cameleon.2.1}82

Die folgenden Fliegenstämme wurden durch Miroinjektion selbst erzeugt:

w[1118]; P{UAS – Glu – 14-3-3zeta dsRNA}

w[1118]; P{UAS – 34515 – 14-3-3zeta dsRNA}

w[1118]; P{UAS – 21430 – 14-3-3zeta dsRNA}

2.2 Firmennachweis

Ambion, Henkelstrasse 15, D-65187 Wiesbaden

Amersham Buchler GmbH & Co. KG, D-30419 Hannover

Appligene Oncor, D-69120 Heidelberg

Beckmann Instruments GmbH, D-80807 München

Bioform, 90419 Nürnberg

Biometra GmbH, D-37079

BioRad Laboratories GmbH, D-80939 München

Biozym Diagnostik GmbH, D-31883 Hessisch Oldendorf

Bloomington *Drosophila* Stock Center, Bloomington, Indiana 47405, USA

Boehringer Ingelheim Bioproducts Partnership, D-69112 Heidelberg

Carl Roth GmbH & Co., D-76185 Karlsruhe

Edge Bio Systems, 19208 Orbit Drive, Gaithersburg, MD 20879-4149, USA

Eppendorf-Netheler-Hinz GmbH, D-22331 Hamburg

FMC-Bioproducts, 32 Pearl Street, Cambridge, MA 02139-4041

Genomed GmbH, Wielandstrasse 28a, D-32545 Bad Oeynhausen

Gibco BRL Life Technology GmbH, D-76339 Eggenstein

Haereus Instruments GmbH, D-63450 Hanau

Invitrogen, San Diego, CA, USA

Kisker GbR, D-48543 Steinfurt

Lehman & Voss & Co, Alsterufer 19, D-20354 Hamburg

Leica Mikrosysteme Vertrieb GmbH, D-64625 Bensheim
MBI Fermentas, D-68789 St.Leon-Rot
Macherey + Nagel GmbH & Co. KG, Postfach 101352, D-52313 Düren
Membra Pure, Reinstwasser, Am Kuemmerling 37a, D-55294 Bodenheim
Merck KGaA, D-64271 Darmstadt
Microm International GmbH, Robert-Bosch-Straße 49, D-69190 Walldorf
Mo Bi Tec, Wagenstieg 5, D-37077 Göttingen
MWG-Biotech AG, D-85560 Ebersberg
Narishige, 2961 Veteran Avenue, Los Angeles, CA 90064, USA
PeqLab Biotechnologie GmbH, Am Weichselgarten 7, D-91058 Erlangen
PerkinElmer Life Sciences GmbH, Ferdinand Porsche Ring 17, D-63110 Rodgau
Pharmacia Biotech Europe GmbH, D-79111 Freiburg
Promega GmbH, High-Tech-Park, D-68199 Mannheim
Qiagen GmbH, D-40724 Hilden
Roche, D-69112 Heidelberg
RothGmbH, D-76185 Karlsruhe
Sakura Finetek Inc., Torrance, CA 90501, USA
Science Products GmbH, Hofheimer Straße 63, D-65719 Hofheim
Serva Feinbiochemica & Co. KG, D-69042 Heidelberg
Sigma-Aldrich Chemie GmbH, D-82039 Deisenhofen
Stratagene GmbH, D-69000 Heidelberg
TaKaRa Bio Whittaker Europe, D-82024 Taufkirchen
Tropix Sience, USA-Bedford (Mass.)
Whatman, Springfield Mill, UK
Zeiss, D-07745 Jena

2.3 Geräte

Die Standard Geräte, wie z.B. Gelkammern für Agarosegele und Inkubatoren, die in jedem Labor vorhanden sind, wurden hier nicht gesondert aufgeführt.

Biofuge 13

Haereus

BioPhotometer

Eppendorf

Centrifuge 5415 D	Eppendorf
Dark Reader™ (Model DR-45 M)	Mo Bi Tec
Elektrodenpuller (Model PC-10)	Narishige
Fluoreszenzmikroskop DM IRBE	Leica
Gel-Dokumentation	MWG
Hybridisierungsöfen (APT Line)	Biometra
Konfokales Laserscannermikroskop DM_IRBE	Leica
Mikrotom Kryostat (HM 500 OM)	MICROM Laborgeräte GmbH
Robocycler Gradient 96	Stratagene
Stratalinker 1800	Stratagene

2.4 Chemikalien

Die Chemikalien, die hier nicht mit aufgeführt sind, wurden über die Firma Merck bezogen.

Agarose	Sigma
Ampicillin	Roth
Bactotrypton	Serva
BCIP	Roth
Borsäure	Roth
Cäsiumchlorid	Serva
Cholesterol	Sigma
dNTP	MBI Fermentas
DEPC	Serva
EDTA	Serva
Essigsäureanhydrid	Sigma
Ethanol	Roth
Ethidiumbromid	Sigma
Glycerol	Roth
I-Block	Tropix
Isoamylalkohol	Roth
Isopropanol	Roth

Lachssperma	Sigma
LB-Agar	Gibco BRL
LB-Medium	Gibco BRL
Levamisol	Sigma
NBT	Roth
OCT	Sakura
Phenol	Roth
Polyethylenglycol	Sigma
SDS	Serva
SOB-Medium	Invitrogen
SYBER Gold	FMC Bio Products
Triethanolamin	Sigma
Tris	Sigma
Triton X-100	Serva
Tween-20	Serva
ULRAhyb	Ambion
Voltalef H10S Öl	Lehmann & Voss & Co
Yeast Extract	Serva

2.5 Puffer, Medien und Lösungen

Acetylierungslösung	250 ml A.bidest, 4,63g Triethanolamin, 625µl Essigsäureanhydrid
Ampicillin	50 mg/ml Ampicillin in A.bidest
Apfelsaft-Agar Platten	30g Select-Agar ad 1L H ₂ O autoklavieren, 33g Saccharose ad 333,3ml Apfelsaft aufkochen, beides auf 60°C abkühlen lassen und mischen
BCIP	50 mg/ml in Dimethylformamid
Blockierlösung	0.5% I-Block in Maleinsäurepuffer
DNA-Ladepuffer 6x	40% (w/v) Saccharose, 0,25% (w/v) Bromphenolblau, 0,25% Xylencyanol

<i>Drosophila</i> Ringer	182mM KCl, 46mM NaCl, 3mM CaCl ₂ , 10mM Tris/HCl ad 1Liter A.dest, pH 7,2 mit 1 N HCl einstellen, autoklavieren
Standardnährmedium	1 g Select Agar (Invitrogen) in 333,3 ml H ₂ O lösen, autoklavieren. 66,6 g Weizenmehl, 47 g Zucker und 17 g Yeast Extract ad 666 ml H ₂ O, aufkochen, mit dem autoklavierten Agar mischen, erneut aufkochen
Heptan Kleber	2 Rollen tesa Fotostrip Nr.5338 abwickeln, mit 40 ml Heptan versetzen und unter schütteln mind. 2 Std. inkubieren
LB-Agar	32 g LB Agar (Lennox L Agar) ad 1L A.dest., autoklavieren
LB-Medium	20 g LB (Lennox L Broth Base) ad 1L A.dest., autoklavieren
Maleinsäurepuffer	23,31g Maleinsäure, 17,53g NaCl, 16g NaOH-Pellets in ca. 1,9L A.bidest lösen, pH auf 7,5 einstellen und auf 2L auffüllen
MOPS	400 mM MOPS, 100 mM Natrium Acetat, 20 mM EDTA
NBT	75 mg/ml in 70% Dimethylformamid
Nipaginlösung	1 g Nipagin in 10 ml 50% Ethanol lösen
PBS pH 7.4	140 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 10 mM Na ₂ HPO ₄ , 1,8 mM KH ₂ PO ₄
PBS pH 9.5	140 mM NaCl, 10 mM Na ₂ PO ₄
4% Paraformaldehyd	4g PFA ad 100 ml PBS pH 9,5, auf 50-60°C erhitzen bis alles gelöst ist und anschließend steril filtrieren
Reaktionspuffer	100 mM Tris/HCL pH 9,5, 100 mM NaCl, 50 mM MgCL ₂ , 0,1% Tween, sterilfiltrieren mit 0,45µl Filter (Schaeren-Wiemers, 1993)
RNA Ladepuffer	2,88 ml deionisiertes Formamid, 0,32 ml 20x MOPS, 1,0 ml Formaldehyd, 0,72 ml DEPC H ₂ O, 0,02% Bromphenolblau, 0,02% Xylenecyanol
SOB-Medium	30,7 g SOB Medium (Invitrogen) ad 1L A.dest, autoklavieren
SSC 20x	3 M NaCl, 0,3 M Trinatriumcitrat x 2H ₂ O, ad 1L A.dest, pH 7 mit 25% HCl einstellen

STE Puffer	0,438 g NaCl ad 40 ml TE Puffer, pH mit HCl oder NaOH auf 8,0 einstellen und mit TE Puffer auf 50 ml auffüllen.
TAE 50x	2 M Tris, 0,5 M Essigsäure, 50 mM EDTA, pH 7,5
TBE 10x	108 g Tris, 55 g Borsäure, 40 ml 0,5 M EDTA, pH 8 mit HCl einstellen, ad 1L A.dest.
TE	10 mM Tris/HCl, 1 mM EDTA, pH 8,0
TFB 1	30 mM Kaliumacetat, 10 mM CaCl ₂ , 50 mM MnCl ₂ , 100 mM CsCl, 15% (Vol) Glycerol, ad 500 ml A.dest, pH 5,8 mit Essigsäure eingestellt und steril filtriert.
TFB 2	10 mM MOPS, 75 mM CaCl ₂ , 10 mM CsCl, 15% (Vol) Glycerol, ad 100 ml A.dest., pH 6,5 mit KOH, steril filtriert.

2.6 Gebrauchsfertige Reagenziensysteme

AmpliScribe™ T7 High Yield Transcription Kit	Biozym
DIG RNA Labeling Kit	Roche
G50 ProbeQuant Säulen	Ammersham-Pharmacia
Jetquick Gel Extraction Spin Kit	Genomed
Jetquick PCR Purification Spin Kit	Genomed
Jetstar Plasmid Mini-,Midi- bzw. Maxi-Kit	Genomed
Perfect RNA, Eukaryotic, Mini Kit	Eppendorf
Qiagen-tip 100/G for Genomic DNA	Qiagen

2.7 Bakterienstämme

DH5α (<i>E. coli</i>)	Stratagene
-------------------------	------------

2.8 Enzyme

Alle zu den Enzymen dazugehörigen Puffer wurden stets von der gleichen Firma bezogen und nach Anleitung des Herstellers eingesetzt.

Superscript TM II ⁺	Invitrogen
T4-DNA-Ligase	MBI Fermentas
Taq-Polymerase	Appligene
Pwo-Polymerase	PeqLab
RNaseOut	Gibco BRL
T3 RNA Polymerase	Ambion
T7 RNA Polymerase	Ambion
SP6 RNA Polymerase	Ambion
CIAP	MBI Fermentas

Verwendete Restriktionsenzyme:

Bam H I	MBI Fermentas
Eco RI	MBI Fermentas
Hind III	MBI Fermentas
Kpn I	MBI Fermentas
Mlu I	MBI Fermentas
Nhe I	MBI Fermentas
Not I	MBI Fermentas
Pst I	MBI Fermentas
Sal I	MBI Fermentas
Spe I	MBI Fermentas
Xba I	MBI Fermentas
Xho I	MBI Fermentas

2.9 Oligonukleotide (Primer)

2.9.1 Oligonukleotide zur Amplifikation von Promotorsequenzen

CT22815 Prom. Gal

5'-GAGAGCGGCCGCGCGGCTACAGGTTTGTTTGT-3' Sinn-Primer
(Not I)

5'-GAGAGGGTACCTGTGAGCTCTTCTGTGTGGA-3' Gegensinn-Primer I
(Kpn I)

5'-GAGAGGGTACCAGTTGGTGGCGAACAGATTT-3' Gegensinn-Primer II
(Kpn I)

CT 34515 Prom. Gal

5'-GAGAGCGGCCGCCACTGGCTGATTGCAAAAGA-3' Sinn-Primer
(Not I)

5'-GAGAGGGTACCCACACTACCTTCGGCTTTGA-3' Gegensinn-Primer I
(Kpn I)

5'-GAGAGGGTACCATTTCGCTTTCATTGGCATTC-3' Gegensinn-Primer II
(Kpn I)

Die unterstrichenen Bereiche markieren eingefügte Schnittstellen für Restriktionsenzyme. Das jeweilige Restriktionsenzym ist in Klammern unter der Sequenz angegeben.

2.9.2 Oligonukleotide für die cDNA Synthese

CapFinder I

5'-GAGAGAACGCGTGACGAGAGATCGACArGrGrG-3'

CapFinder II

5'-GAGAGAACGCGTGACGAGAGACTGACAG-3'
(Mlu I)

Oligo-dT I

5'-biotin-ACTCTATGAGAATTCGATGAGCGATCTG(T)₂₅G/A/C-3'

Oligo-dT II

5'-ACTCTATGGAAATTCGATGAGCGATCTG-3'

(Eco RI)

Die unterstrichenen Bereiche markieren eingefügte Schnittstellen für Restriktionsenzyme. Das jeweilige Restriktionsenzym ist in Klammern unter der Sequenz angegeben.

2.9.3 Oligonukleotide für die 5'- und 3'-RACE**DH-CI 2 Gegensinn 1**

5'-GAGGATCCAATGGCAGTGCTGGATCGATT-3' Gegensinn-Primer

DH-CI 2 Gegensinn 2

5'-GAGGATCCGGAGCGAAAGACTCGACTCGT-3' Gegensinn-Primer

DH-CI Gegensinn 1

5'-GAGGATCCGGCGGTCTCATCTTGTCGTAAC-3' Gegensinn-Primer

DH-CI Gegensinn 2

5'-GAGGATCCACCGTCACATGGAAGTAGACTATCGT-3' Gegensinn-Primer

DH-CI Sinn 1

5'-GAGGATCCCTCAAGCGGGCTATATATATAGATCGG-3' Sinn-Primer

DH-CI Sinn 2

5'-GAGGATCCGGACGCCTTTATGTCCGTTTG-3' Sinn-Primer

DH-CI 2 Sinn 1

5'-GAGGATCCAAAGGCAATGAAGGGGTATTCG-3' Sinn-Primer

DH-CI 2 Sinn 2

5'-GAGGATCCCAGAATACCCAGTCGCAAC-3' Sinn-Primer

Die unterstrichenen Bereiche markieren die eingefügte Bam H I Schnittstelle

2.9.4 Oligonukleotide zur Amplifikation von Rezeptorklonen**DH-CI 1 F-I**

5'-GAGAAGCTTCCACCATGGGTTCCAAATAATAATCCTGGTGAT-3' Sinn-Primer

(Hind III)

5'-GAGAGAGCGGCCGCTTATAGATACTCGTAGAACACAC-3' Gegensinn-Primer

(Not I)

DH-CI 2 F-1

5'-GAGGATCCACCATGCAAAGCCCAACTAGCAAATTGGT-3' Sinn-Primer

(Bam I)

5'-GAGAGCGGCCGCTCAGCTTGGGCGATATATCCCATC-3' Gegensinn-Primer

(Not I)

Die unterstrichenen Bereiche markieren eingefügte Schnittstellen für Restriktionsenzyme. Das jeweilige Restriktionsenzym ist in Klammern unter der Sequenz angegeben.

2.9.5 Oligonukleotide zur Erzeugung von Sonden für *in-situ* Hybridisierungen

CT 19189

5'-GAGGATCCAGCCAAAATGTGATAAACGACG-3' Sinn-Primer

(Bam HI)

5'-GAAAGCTTCCAACAAAAACAAAACCCGAA-3' Gegensinn-Primer

(Hind III)

CT 21430

5'-GAAAGCTTGATGGCACAGTGATCGTTTCG-3' Sinn-Primer

(Hind III)

5'-GAGAATTCGTAAAAGCCAACCACTCGCGT-3' Gegensinn-Primer

(Eco RI)

CT 22815

5'-GAAAGCTTGGAGAATATGACACAGGAATACCGC-3' Sinn-Primer

(Hind III)

5'-GAGAATTCGAAAACGTAGTAAACCAAACGACGC-3' Gegensinn-Primer

(Eco RI)

CT 34515

5'-GAAAGCTTCAGTATCGCATATTGGATTCGACT-3' Sinn-Primer

(Hind III)

5'-GAGGATCCGCTTCTGGTTTTATCCAAAACGATATC-3' Gegensinn-Primer

(Bam HI)

CT 5896

5'-GAAAGCTTACTCGGGAAGTGGGCTACTACG-3' Sinn-Primer

(Hind III)

5'-GAGAATTCGTTTCTCCTTCGACGAATCGC-3' Gegensinn-Primer

(Eco RI)

Die unterstrichenen Bereiche markieren eingefügte Schnittstellen für Restriktionsenzyme. Das jeweilige Restriktionsenzym ist in Klammern unter der Sequenz angegeben.

2.9.6 Oligonukleotide zur Analyse der gewebespezifischen Verteilung

CT 19189

5'-ACAAAAACCCGAAATGCAAA-3' Sinn-Primer

5'-CATTCCATTCCAGCCAAAAT-3' Gegensinn-Primer

CT 21430

5'-TCCTCCAAATGCGATACCTC-3' Sinn-Primer

5'-GTTATCGGACGCTTCTGCTC-3' Gegensinn-Primer

CT22815

5'-CGAGGTGGACTGGCTAAAAA-3' Sinn-Primer

5'-GTACAGTCCGCCGTTTCATT-3' Gegensinn-Primer

CT 25610

5'-TGGAAAAATCAGGACGATGC-3' Sinn-Primer

5'-ACAGGGTGGCAATGCAGTA-3' Gegensinn-Primer

CT34515

5'-CGCATATTGGATGTCGACTG-3' Sinn-Primer

5'-GGCAACTCAATCTCCGTGTT-3' Gegensinn-Primer

CT 5896

5'-TGGATACACTTGGGATTTTCG-3' Sinn-Primer

5'-AGACCCTGCACCGTAAACTG-3' Gegensinn-Primer

CT23187

5'-GATGATCGTGGCCATCTCTT-3' Sinn-Primer

5'-TCGTGGTGTCAATGTGGATT-3' Gegensinn-Primer

CT 23391

5'-CCGTATACTTCCGCTTCGAG-3' Sinn-Primer

5'-GTACCTTGGGTATGCGGTTC-3' Gegensinn-Primer

RDL (CT29555)

5'-CGTTCGATGGGCTACTACCT-3' Sinn-Primer

5'-TTCGGCTATCTTTTGGATCG-3' Gegensinn-Primer

Lcch3 (CT38330)

5'-GAGAACTAGTATGAGATTCACCACGACCCT-3' Sinn-Primer

5'-GAGACTCGAGTGCTAATGGTGGTCATGGTG-3' Gegensinn-Primer

Actin

5'-CACGGTATCGTGACCAACTG-3' Sinn-Primer

5'-CGGTCAGGATCTTCATCAGG-3' Gegensinn-Primer

2.9.7 Oligonukleotide zur Erzeugung von Sonden für Northern Blots**CT 21430**

5'-GAAAGCTTGATGGCACAGTGATCGTTTCG-3' Sinn-Primer

5'-GAGAATTCGTAAAAGCCAACCACTCGCGT-3' Gegensinn-Primer

CT 22815

5'-GAAAGCTTGGAGAATATGACACAGGAATACCGC-3' Sinn-Primer

5'-GAGAATTCGAAAACGTAGTAAACCAAACGACGC-3' Gegensinn-Primer

CT 34515

5'-GAGAACTAGTCAAGTTCATTCTCAAGCGCA-3' Sinn-Primer

5'-GAGACTCGAGAGGGAATGGGCAAATGTC-3' Gegensinn-Primer

GRD (CT 22917)

5'-GAGAAAGCTTATTAGACCGGCAACAACAGC-3' Sinn-Primer

5'-GAGAGAATTCGGTTATTGCTCTGGGTGAGC-3' Gegensinn-Primer

GluCl (CT 23049)

5'-GAGAAAGCTTAGAGAATCGATGTTATATCGCGGA-3' Sinn-Primer

5'-GAGAATTCGCAACGTATCCCTCGGTATA-3' Gegensinn-Primer

RDL (CT 29555)

5'-GAGAAAGCTTACCACAGGCAACTATTCCGC-3' Sinn-Primer

5'-GAGAATTCTGGCAAAGACCATAACGAAGCTA-3' Gegensinn-Primer

LCC (CT 38330)

5'-GAAAGCTTAGATATGACATGTTTTACGCGCG-3' Sinn-Primer

5'-GAGAATTCCATCATCATTCTCATCGTCGA-3' Gegensinn-Primer

2.9.8 Oligonukleotide zur Erzeugung transgener *D. melanogaster***CT21430**

5'-GAGAACTAGTATGCGCGCCTACATCTACTT-3' Sinn-Primer
(SpeI)

5'-GAGACTCGAGGGACCAGTTCCGACGTATTG-3' Gegensinn-Primer
(Xho I)

CT22815

5'-GAGAACTAGTGTCGTCTTTGCCACCTGTTT-3' Sinn-Primer
(SpeI)

5'-GAGACTCGAGATTATCCGCGACTCCTGTC-3' Gegensinn-Primer
(Xho I)

CT34515

5'-GAGAACTAGTCAAGTTCATTCTCAAGCGCA-3' Sinn-Primer
(SpeI)

5'-GAGACTCGAGAGGGAATGGGCAAAATGTC-3' Gegensinn-Primer
(Xho I)

Lcch3

5'-GAGAACTAGTATGAGATTCACCACGACCCT-3' Sinn-Primer
(SpeI)

5'-GAGACTCGAGTGCTAATGGTGGTCATGGTG-3' Gegensinn-Primer
(Xho I)

GluI

5'-GAGAACTAGTACCTTCCGTGAACAGTGGAC-3' Sinn-Primer
(SpeI)

5'-GAGACTCGAGTCCAGCCATCTAAAATAATG-3' Gegensinn-Primer genomisch
(Xho I)

5'-GAGACTCGAGTCCAGCCATAGCTGGCCATC-3' Gegensinn-Primer cDNA
(Xho I)

Die unterstrichenen Bereiche markieren eingefügte Schnittstellen für Restriktionsenzyme. Das jeweilige Restriktionsenzym ist in Klammern unter der Sequenz angegeben.

2.9.9 Oligonukleotide zur Sequenzierung klonierter DNA

pSport I

5'-TAAAACGACGGCCAGTGAATTGAAT-3' Sinn-Primer

5'-AACAGCTATGACCATGATTACGCCAAGCT-3' Gegensinn-Primer

M13

5'-CCCAGTCACGACGTTGTAAAACG-3' Sinn-Primer

5'-AGCGGATAACAATTTTCACACAGG-3' Gegensinn-Primer

2.10 Plasmide

pSport 1	Gibco
pcDNA 3.1	Invitrogen
pTR-RNAi	Diese Plasmid wurde durch Herrn Dr. Roeder (Universität Marburg) zur Verfügung gestellt
pUChs Δ 2-3	Diese Plasmid wurde freundlicherweise von Herrn Dr. Fiala (Universität Würzburg) zur Verfügung gestellt
pUAST	Diese Plasmid wurde freundlicherweise von Herrn Prof. E. Buchner (Universität Würzburg) zur Verfügung gestellt
pPTGAL4	Dieses Plasmid wurde freundlicherweise von Herrn Daniel F. Eberl (University of Iowa) zur Verfügung gestellt.

2.11 Präparation von Gewebe aus *D. melanogaster*

Für die Präparation von adulten Tieren wurden diese durch ein 5 s Einleiten von Stickstoff in die Zuchtgläser betäubt und 10-15 Fliegen beiderlei Geschlechts auf ein eisgekühltes Blockschälchen überführt. Die Präparationen erfolgten stets auf Eis bei 25-50facher Vergrößerung unter einem Binokular (WILD/Heerbrugg). Zuerst wurde die Kopfkapsel dorsal mit Hilfe zweier Pinzetten geöffnet, das Gehirn mit Hilfe der

Pinzetten vorsichtig von der Kutikula gelöst, herausgehoben, in ein neues Blockschälchen mit *Drosophila* Ringer (s. 2.5) überführt und von evtl. noch anhaftenden Tracheen und Geweberesten befreit. Die Trennung verschiedener Abschnitte des Gehirns wie Retina, optische Loben und zentrales Gehirn wurde in eisgekühlten *Drosophila* Ringer durchgeführt. Nach der Trennung wurden die verschiedenen Gewebe sofort in 0,5 ml Eppendorf Reaktionsgefäße überführt, in flüssigen Stickstoff eingefroren und bis zur weiteren Verwendung bei -70°C gelagert.

Die Präparation des Thorakalganglions sowie von Darm, Muskeln, Malpighi-Gefäßen, Tracheen und Fettkörper erfolgte, indem der Thorax vorsichtig von ventral geöffnet, die einzelnen Gewebe mit Hilfe der Pinzetten rausgetrennt und in Ringer überführt wurden. Die weitere Vorgehensweise entsprach der oben beschriebenen Methode.

Die Präparation von Antennen erfolgte durch ein vorsichtiges Abtrennen vom Kopf am ersten Segment, sofortiges überführen in ein 0,5 ml Eppendorf Reaktionsgefäße und einfrieren in flüssigen Stickstoff. Bis zur weiteren Verwendung wurden auch diese Präparate bei -70°C gelagert.

2.12 Allgemeine molekularbiologische Methoden

2.12.1 Isolierung von RNA

Für die Extraktion von gesamt RNA aus *Drosophila* Gewebe und Embryonen wurde das Perfect RNA, Eukaryotic, Mini Kit benutzt und nach Angaben des Herstellers angewendet. Anschließend wurde die Konzentration der RNA photometrisch bestimmt (s. 2.12.6).

2.12.2 Isolierung genomischer DNA

Für die Isolierung genomischer DNA wurden Wildtyp *Drosophila melanogaster* des Stammes Canton-S verwendet. Die Isolierung erfolgte stets mit dem Qiagen-tip 100/G for Genomic DNA Kit nach Angaben des Herstellers. Die Konzentration der DNA wurde anschließend photometrisch bestimmt (s. 2.12.6).

2.12.3 cDNA Synthese

Für die cDNA Synthese wurde die sogenannte CapFinder-Methode mit der Festphasen- (solid phase) cDNA-Synthese kombiniert (Schramm et al., 2000).

Bei der CapFinder Methode nutzt man die Eigenschaft der MMLV (Moloney murine Leukemia virus) reversen Transkriptase aus, die beim Beenden der Transkription an der 7-Methylguaninium-Kappe der *template*-mRNA einige Cytosinreste an das neu synthetisierte 3'-Ende der cDNA anhängt. Die Anzahl der angehängten Cytosinreste variiert zwischen 2 - 4 und steht in Abhängigkeit zu den Reaktionsbedingungen. Durch die Bindung eines sogenannten CapFinder-Primers an diese Nukleotide wird eine neue Matrize für die reverse Transkriptase erschaffen (*template switch*).

Die cDNA Synthese gliederte sich in drei Schritte auf. Der erste Schritt war hierbei die Isolierung der mRNA, der zweite die Erststrangsynthese und zuletzt die Doppelstrangsynthese.

mRNA Isolierung:

Die Isolierung der mRNA erfolgte durch eine Bindung der Poly-A⁺-RNA an Oligo-dT-Nukleotide nach Schramm et al. (Schramm et al., 2000). Hierfür wurden biotinylierte Oligo-dT-Primer verwendet, die an Avidin-Polystyrene-Partikel (Kisker) gekoppelt wurden und somit eine Abtrennung der hybridisierten RNA durch Zentrifugation ermöglichten.

Zum Koppeln der Biotin-oligo-dT-Primer an die Avidin-Polystyrene-Partikel wurden 25µl der Partikel zweimal mit TE-Puffer gewaschen und in 50µl 2x Biotin-Bindungspuffer (10mM Tris/HCl pH 7.5, 1mM EDTA, 2M NaCl) aufgenommen. Anschließend wurden dem Ansatz 5µl Oligo-dT I Primer (10mM) zugesetzt, mit 45µl A.bidest komplettiert und für 30 min bei 37°C inkubiert. Nach Beendigung der Inkubationszeit wurden die Partikel dreimal in TE-Puffer gewaschen, in 100µl TE-Puffer aufgenommen und bis zur Verwendung bei 4°C gelagert.

Für die Kopplung der mRNA an die Partikel wurde 1µg der isolierten gesamt RNA (s. 2.12.1) in 50µl DEPC-H₂O aufgenommen, bei 65°C denaturiert, mit 100µl 2x mRNA-Bindungspuffer (20 mM Tris/HCl pH 7,5, 2 mM EDTA, 1 M LiCl) und 3µl der gekoppelten Partikel versetzt und mit A.bidest auf 200µl aufgefüllt. Die Hybridisierung erfolgte bei 37°C für 30 min.

Die gekoppelte mRNA wurde durch Zentrifugation (10 min bei 5000 x g) vom Überstand abgetrennt, zweimal mit mRNA-Waschpuffer (10 mM Tris/HCl pH 7,5, 1

mM EDTA, 0,15 mM LiCl) und einmal mit cDNA Synthesepuffer (Invitrogen) gewaschen, erneut vom Überstand befreit und direkt für die Erststrangsynthese eingesetzt.

Erststrangsynthese:

Das Umschreiben der mRNA in eine Einzelstrang-DNA erfolgte unter Verwendung eines viralen Enzyms, der Reversen Transkriptase (Superscript II⁺).

Reaktionsansatz (20µl):

4µl 5x Synthesepuffer
2µl dNTPs (10 mM)
2µl DTT (100 µM)
0,75µl Superskript II⁺ (200 U/µl)
0,5µl MnCl₂ (40 mM)
1µl RNase Out (40 U/µl)
8,75µl A.bidest

Der gesamte Ansatz wurde auf die gekoppelte mRNA gegeben, für 45 min bei 42° C inkubiert, anschließend mit 1µl CapFinder I-Primer versetzt und weitere 10 min bei 37°C inkubiert.

Im Anschluss an die Synthese wurde die Erststrang cDNA zweimal in TE Puffer gewaschen, in 40µl TE Puffer aufgenommen und bis zur weiteren Verwendung bei 4°C gelagert.

Doppelstrangsynthese:

Das sofortige Umschreiben der Einzelstrang-cDNA in eine Doppelstrang-cDNA ist sehr wichtig, da die ds-cDNA wesentlich stabiler ist und somit auch über längere Zeiträume mehrmals eingesetzt werden kann. Bei der verwendeten Methode handelte es sich um eine LA-PCR (long and accurate PCR) (Barnes, 1994), bei der man aufgrund der eingesetzten oligo-dT-Primer und CapFinder Primer eine hohe Anzahl an sogenannten „full length“-Klonen erhält. Als Matrize für die PCR sind ca. 15 ng (entspricht 1 µl) Erststrang-cDNA eingesetzt worden.

Um möglichst immer gleiche Konzentrationen an cDNA zu erreichen wurde die Anzahl der Zyklen variiert und lag zwischen 18-20 Zyklen. Die genaue Anzahl richtete sich nach der jeweiligen cDNA Konzentration, die mit Hilfe eines Agarosegels kontrolliert wurde.

Reaktionsansatz (50µl):

5µl 10x PCR-Puffer
1µl dNTPs (10mM)
1µl Oligo-dT II (10mM)
1µl CapFinder II
1µl Erststrang-cDNA
0,3µl Taq/Pwo (1U/µl)
40,7µl A.bidest

Reaktionsprofil:

1 Zyklus 1min 95°C
18-20 Zyklen 20sec 95°C, 20sec 58°C, 10min 68°C

Die Reaktion erfolgte in einem Robocycler Gradient 96 mit Deckelheizung, was ein überschichten des PCR Ansatzes mit Mineralöl erübrigte.

2.12.4 PCR (Polymerase Chain Reaction)

Bei der PCR handelt es sich um eine *in vitro*-Methode zur enzymatischen Synthese spezifischer DNA-Sequenzen die sich zwischen zwei Oligonukleotid-Primern befinden. Hierfür wird eine doppelsträngige DNA (Matrizen-DNA) denaturiert und an den entsprechenden komplementären DNA-Einzelsträngen werden zwei Oligonukleotid-Primer, welche die zu amplifizierende Region flankieren, hybridisiert. Durch eine thermostabile DNA-Polymerase werden die jeweiligen komplementären DNA-Stränge synthetisiert. Die repetitive Folge von Matrizen-Denaturierung, Primer-Hybridisierung und von den Primern ausgehende Strangsynthese durch die Polymerase führt zu einer exponentiellen Anreicherung der Ziel-DNA, deren Enden durch die Primer festgelegt sind.

Die PCR-Reaktionen wurden nach (Saiki et al., 1988) durchgeführt.

Das jeweilige Reaktionsprofil richtete sich nach der Länge der zu amplifizierenden Sequenz und der Stringenz der Primer, wobei von einer DNA-Syntheserate der Taq-Polymerase von ~2800 Nukleotiden pro Minute auszugehen ist.

<u>Reaktionsansatz (50µl):</u>	<u>Reaktionsprofil:</u>
5µl 10x PCR-Puffer	1 Zyklus 1min 95°C
1µl dNTPs (10mM)	20-35 Zyklen 20s 95°C, 20s 48-58°C, 60s-120s 72°C
1µl Sinn-Primer (10mM)	
1µl Gegensinn-Primer (10mM)	
1µl DNA (6-10ng)	
0,3µl Taq-Polymerase (5U/µl)	
40,7µl A.bidest	

2.12.5 5'- und 3'-RACE (Rapid Amplification of cDNA Ends)

Die 5'- und 3'-RACE-Reaktion wurde für die Untereinheiten CT22815 und CT34515 durchgeführt. Hierbei handelt es sich um eine auf einer PCR basierenden Methode, die eine Analyse der vollständigen 5' und 3' Enden einer cDNA erlaubt (Schramm et al., 2000). Dies erfolgte mittels einer geschachtelten (nested) PCR (Loh et al., 1989), d.h. es wurden zwei PCR Reaktionen durchgeführt, wobei das Produkt der ersten Reaktion als Matrize für die zweite Reaktion in Verbindung mit einem zweiten transkriptionspezifischen Primer (nested-Primer) durchgeführt wurde, der sich in einer Region kurz vor dem ersten Primer anlagert. Die zweite PCR-Amplifikation dient hierbei der Erhöhung der Ausbeute des spezifischen Produktes, während der Hintergrund reduziert wird (Schaefer, 1995; Schramm et al., 2000).

Als Matrize für die erste PCR Reaktion diente Erststrang cDNA von adulten *D. melanogaster*. Als Gegensinn Primer wurde bei der 5'-RACE für die Untereinheit CT22815 der DH-CI AS 2 Primer verwendet, für die Untereinheit CT34515 der DH-CI 2 AS 2 Primer (s. 2.9.3).

<u>Reaktionsansatz (50µl):</u>	<u>Reaktionsprofil:</u>
5µl 10x PCR-Puffer	2 Zyklen 1min 95°C, 40 sec 58°C, 1,5 min 68°C
1µl dNTPs (10mM)	40 Zyklen 30sec 95°C, 30sec 58°C, 1,5 min 68°C
1µl Gegensinn Primer	
1µl CapFinder II	
1µl Erststrang-cDNA	
0,3µl Taq/Pwo 1U/µl)	
40,7µl A.bidest	

Sowohl der Reaktionsansatz als auch das Reaktionsprofil entsprachen bei der zweiten PCR Reaktion dem ersten, jedoch wurden die jeweiligen Gegensinn Primer durch *nested-reverse*-Primer (DH-Cl Gegensinn bzw. DH-Cl 2 Gegensinn) ausgetauscht und als Matrize 1 µl der ersten PCR verwendet.

Bei der 3'-RACE entsprachen sowohl der Reaktionsansatz als auch das Reaktionsprofil beider PCR Reaktionen denen der 5'-RACE, nur das an Stelle des CapFinder II Primers der Oligo-dT II (s. 2.9.2) Primer eingesetzt wurde und in der ersten Reaktion der DH-Cl Sinn 2 Primer für das CT22815 Gen und der DH-Cl 2 Sinn 2 Primer für das CT34515 Gen. In der zweiten Reaktion wurden diese beiden Primer durch die beiden *nested-sense-Primer* DH-Cl Sinn 1 bzw. DH-Cl 2 Sinn 1 ausgetauscht.

Sowohl nach der ersten als auch nach der zweiten PCR wurden die Ansätze zur Kontrolle auf einem Agarosegel getrennt. Sofern die zweite PCR eine Bande in der zu erwartenden Größe aufwies, wurde der gesamte Ansatz auf ein präparatives Gel aufgetragen und das gewünschte DNA Fragment aus dem Gel eluiert (s. 2.12.8). Anschließend folgte mit Hilfe der Restriktionsenzyme Bam HI/Mlu I eine Klonierung der 5'-RACE Fragment, sowie mit den Restriktionsenzymen Bam HI/Eco RI eine Klonierung der 3'-RACE Fragmente in den pSport I Vektor.

2.12.6 Bestimmung von DNA- und RNA-Konzentrationen

Zur Bestimmung der Konzentration von Nukleinsäuren wurde der molare Extinktionskoeffizient E der Proben bei einer Wellenlänge von 260 nm in einem Spektralphotometer gemessen und in Abhängigkeit von der definierten Schichtdicke d die Nukleotidkonzentration bestimmt. Ein Adsorptionswert von $E_{260} = 1$ bei einer Schichtdicke von $d = 1\text{cm}$ entspricht einem Gehalt von 50 µg/ml doppelsträngiger DNA oder 40 µg/ml einzelsträngiger RNA. Um den Proteingehalt der Lösung zu messen wurde zusätzlich die Extinktion bei einer Wellenlänge von 280 nm bestimmt. Der Quotient aus E_{260}/E_{280} stellt einen Wert für die Reinheit der Lösung dar und sollte zwischen 1,7 und 2,0 liegen.

2.12.7 Elektrophorese in Agarosegelen

Die Agarose-Gelelektrophorese wurde zur Analyse und präparativen Isolierung von DNA und RNA eingesetzt. Das Agarosegel stellt dabei eine Art feinporiges Sieb dar, das der Migration von Molekülen, abhängig von ihrer Größe, einen Widerstand entgegensetzt. Die Migrationsrate linearer DNA-Moleküle ist umgekehrt proportional zum \log_{10} ihrer Länge, d.h. kleinere Moleküle können die Gelporen leichter durchqueren als größere.

Die Konzentration der Agarose wurde der Größe der aufzutrennenden Fragmente angepasst und lag bei 0,5% (für DNAs mit 5-10 kBp), 1% (für DNAs mit 1,5-6 kBp) oder 2% (für DNAs mit 0,1-1,5 kBp). Die Größe der untersuchten DNA-Fragmente wurde durch die Verwendung von DNA-Größenstandards ermittelt, die mit der DNA aufgetrennt wurden.

Die Agarose wurde in 1 x TBE-Puffer gelöst, kurz in einer Mikrowelle aufgeköcht, auf 60° C abgekühlt, mit 0.5 µg/ml Ethidiumbromid versetzt und in die Gießkammer gefüllt. Nach Aushärtung der Agarose wurden die DNA Proben mit 1/6 Volumen DNA-Ladepuffer versetzt und in die Taschen des Gels pipettiert. Die Auftrennung der DNA erfolgte in 1 X TBE-Puffer. Das Ethidiumbromid interkaliert mit der DNA und kann unter UV-Licht auf einem Transilluminator sichtbar gemacht werden.

Bei einer präparativen Gelelektrophorese wurde der Agarose kein Ethidiumbromid zugefügt. Das Gel wurde in diesem Fall anschließend mit SYBR- Gold gefärbt, indem ca. 1-2 ml SYBR- Gold (1/10000 verdünnt in 1x TBE-Puffer) nach der Elektrophorese auf das Gel gegeben wurden. Die visuelle Darstellung der aufgetrennten Fragmente erfolgte unter Blaulicht-Anregung mit Hilfe des Dark Reader (Model DR-45 M). Dadurch konnte eine eventuelle Beschädigung der DNA durch das UV-Licht vermieden werden.

Für die elektrophoretische Trennung von RNA wurde ein 1% RNA-Agarosegel eingesetzt. Hierfür wurde 1 g Agarose in 89,25 ml DEPC-H₂O gelöst, kurz aufgeköcht und auf 60° C abgekühlt. Anschließend wurden dem Gel 5 ml 20 X MOPS Puffer (s. 2.5) sowie 5,75 ml Formaldehyd und 0.5 µg/ml Ethidiumbromid zugesetzt und in die Gießkammer gefüllt. Die Trennung der RNA erfolgte in 1 X MOPS Puffer.

2.12.8 Isolierung von Nukleinsäuren aus Agarosegelen

Die Isolierung von Nukleinsäuren aus Agarosegelen wurde eingesetzt um aus einem Gemisch von DNA-Fragmenten unterschiedlicher Länge ein einzelnes Fragment zu isolieren. Hierzu wurde der Ansatz in einem Agarosegel elektrophoretisch getrennt und die DNA anschließend durch eine Färbung mit SYBR-Gold (s. 2.12.7) unter Blaulicht-Anregung sichtbar gemacht. Dies ermöglichte ein Ausschneiden des Gelstückes mit dem gewünschten Fragment.

Die anschließende Elution der DNA aus dem Gelstück erfolgt stets mit Hilfe des Jetquick Gel Extraction Spin Kit nach Angaben des Herstellers.

2.13 Homologie-Vergleiche und Phylogenetische Analysen mit Hilfe externer Datenbanken

Um Aussagen über die Ähnlichkeit der Primärstruktur der mutmaßlichen Liganden-gesteuerten Chlorid-Kanälen von *Drosophila melanogaster* (Adams et al., 2000) zu weiteren Liganden-gesteuerten Chlorid-Kanälen sowohl von Invertebraten als auch von Vertebraten machen zu können, wurde sich der WWW-Alignment-Software BLAST bedient (Altschul et al., 1997).

Für die Analyse der Verwandtschaftsverhältnisse wurden die Aminosäuresequenzen sämtlicher vorhergesagter Liganden-gesteuerter Chlorid-Kanäle von *Drosophila* mit einer repräsentativen Gruppe von Kanälen aus selbiger Familie von Invertebraten und Vertebraten mit dem clustalX Programm verglichen (Thompson et al., 1997). Hierbei wurden nur die hoch konservierten Regionen dieser Familie betrachtet.

Die anschließende Erstellung eines Stammbaumes erfolgte mit dem PAUP 4.01β Programm (Swofford, 1998).

2.14 Analyse der gewebsspezifischen Verteilung der Liganden-gesteuerten Chlorid-Kanäle mittels RT-PCR

Die Analyse der gewebsspezifischen Verteilung der Liganden-gesteuerten Chlorid-Kanäle erfolgte mittels einer sogenannten RT-PCR. Bei der RT-PCR handelt es sich um

eine Kombination aus reverser Transkription und Amplifikation der cDNA mit Hilfe spezifischer Primer, mit der gewebespezifisch exprimierte Gene auf RNA-Ebene nachgewiesen werden können (Brenner et al., 1989). In Abwandlung dieser Methode wurde die cDNA-Synthese getrennt vorgenommen (s.2.12.4), um die anschließende PCR mit für die jeweiligen Kanäle spezifischen Sinn- und Gegensinn-Primern (s.2.9.6) durchführen zu können.

Als Matrize für die PCR wurden cDNAs der Gewebe Retina, optische Loben, Zentral Gehirn, Thorakalganglion, Antennen, Darm und Muskel verwendet, die mit den unter 2.11 und 2.12 erläuterten Methoden synthetisiert wurden.

Die Anzahl der Zyklen bei der PCR wurde für jedes Amplifikat optimiert und lag zwischen 12 - 24. Die Zyklenanzahl wurde dann als optimal bewertet wenn die PCR Amplifikation sich in der exponentiellen Phase befand.

Reaktionsansatz (50µl):

5µl 10x PCR-Puffer

1µl dNTPs (10mM)

1µl Sinn-Primer (10mM)

1µl Gegensinn-Primer (10mM)

1µl cDNA

0,3µl Taq/Pwo (1U/µl)

40,7µl A.bidest

Reaktionsprofil:

1Zyklus 1min 95°C

12-24Zyklen 20s 95°C, 20s 56°C, 45s 68°C

2.15 Analyse der entwicklungspezifischen Verteilung der Ligandengesteuerten Chlorid-Kanäle mittels Northern-Blot

Um das zeitliche Expressionsmuster der untersuchten Kanäle auf RNA-Ebene bestimmen zu können, wurde die Methode des Northern Blots gewählt. Hierfür wurde Gesamt RNA aus unterschiedlichen Entwicklungsstadien von *Drosophila melanogaster* isoliert.

Für sämtliche Arbeiten mit RNA wurden ausschließlich frisch autoklavierte Reaktionsgefäße und Filter-Tip Spitzen (Safeseal-Tips, Biozym) verwendet. Alle Lösungen wurden mit DEPC-H₂O angesetzt und Glasmaterialien 2 Stunden bei 180°C gebacken um eine Kontamination mit RNasen zu vermeiden.

2.15.1 Gewinnung Entwicklungsstadien-spezifischer RNA

Für die Gewinnung von Embryonen unterschiedlicher Entwicklungsstadien wurden 5 – 10 Tage alte adulte *Drosophila melanogaster* des Stammes CantonS für eine halbe Stunde zum Eierlegen auf Apfelsaft-Agar Platten (s. 2.5) gesetzt, die zur Ernährung der Fliegen mit ca. 0,5ml Frischhefe-Brei (5ml 1% Essigsäure mit ½ Frischhefewürfel) bestrichen wurden. Die Eier wurden bei 25°C für 0, 4, 8, 12, 16, 20, 24 Stunden bebrütet und anschließend die RNA isoliert (s.2.12.1). Für die Isolierung von RNA aus den unterschiedlichen Larvalstadien wurden diese mit Hilfe von *Drosophila* Ringer (s. 2.5) aus dem Nährmedium gewaschen, nach Stadien (L1, L2, L3 und Puppen) getrennt und für die RNA Extraktion eingesetzt.

2.15.2 Northern Blot

Für die Northern Blot Analysen wurden jeweils 10µg gesamt-RNA der einzelnen Entwicklungsstadien in einem 1% RNA Agarosegel (s. 2.12.7) elektrophoretisch getrennt und durch einen Kappilartransfer auf die Nylon Membran (Hybond N) transferiert.

Zum Denaturieren der RNA Proben vor dem beladen des Gels wurden diese mit 2 Volumen RNA-Ladepuffer (s.2.5) versetzt, zweimal für 1 min bei 1100 rpm gevortext und für 10 min bei 68°C inkubiert. Anschließend wurden die Proben erneut für 1 min bei 1100 rpm gevortext, für zwei Minuten auf Eis gestellt, auf das Gel aufgetragen und elektrophoretisch aufgetrennt.

Das im Ladepuffer enthaltene Xylencyanol diente als Marker, da es mit einer ähnlichen Laufeigenschaft wie eine RNA mit der Länge von ~40 nt läuft. Das Gel wurde so lange bei 5 - 10 V je cm Elektrodenabstand laufen gelassen bis sich der Marker im unteren Drittel des Gels befand. Die Größe der untersuchten RNAs wurde durch die Verwendung von RNA-Größenstandards ermittelt, die mit der RNA aufgetrennt wurden. Anschließend wurde das Gel entnommen und mit Hilfe eines Transilluminators die Trennung der RNA im Gel kontrolliert und dokumentiert.

Vor dem Aufbau des Blots wurden das Gel, die Nylon-Membran und das Blottingpapier (3 MM Whatman) in 20 x SSC äquilibriert und anschließend für einen „up-side-down“ Blot eingesetzt. Bei diesem Blot befindet sich zuunterst ein großer Stapel trockenen

Fliespapiers als Saugreservoir, das exakt der Größe des Gels entspricht, darüber zwei Lagen Blottingpapier, dann die Nylon Membran und darauf, mit der Oberseite nach unten, das Gel. Auf dem Gel wurde ein weiteres 20 x SSC getränktes Blottingpapier von der Größe des Gels platziert und anschließend mehrere mit 20 x SSC getränkte Schwämme. Das 20 x SSC diente hierbei als Transferpuffer. Nach 5 Stunden war der Transfer abgeschlossen und die RNA konnte durch beidseitiges *Crosslinken*, mit 120 mJ UV-Licht in einem Stratalinker, auf der Membran fixiert werden.

2.15.3 Hybridisierung mit radioaktiv markierten Sonden

Für die Detektion der mRNA der Liganden-gesteuerten Chlorid-Kanal Untereinheiten von *Drosophila* in den verschiedenen Entwicklungsstadien, wurden radioaktiv markierte cDNA Sonden verwendet. Zu diesem Zweck wurden mit Hilfe spezifischer Oligonukleotide (s. 2.9.7) aus der cDNA von *Drosophila* (s. 2.12.3) ca. 300bp lange Sequenzen der zu untersuchenden Kanal Untereinheiten mittels einer PCR amplifiziert (s. 2.12.4). Die PCR Ansätze wurden auf ein 1% Agarosegel aufgetragen, auf Ihre Länge hin überprüft und anschließend mit dem Jetquick PCR Purification Spin Kit nach Angaben des Herstellers gereinigt.

Die anschließende radioaktive Markierung der cDNA Sonden sowie die Hybridisierung der Sonden mit den Northern Blots wurde von Frau Dr. Iris Bruchhaus im Bernhard-Nocht-Institut für Tropenmedizin durchgeführt. Die radioaktive Markierung der Sonden erfolgte mit dem "Prime-a-Gene Labeling system" (Promega) nach Angaben des Herstellers. Die Hybridisierung der Northern Blots mit den radioaktiven cDNA Sonden erfolgte in 0,5M Na₂HPO₄, 7% SDS und 1mM EDTA (pH 7,2) bei 50°C. Anschließend wurden die Membranen mit 40mM Na₂HPO₄ und 1% SDS (pH 7,2) bei 55°C gewaschen und mittels eines Phosphorimager ausgewertet.

2.16 Klonierung und Extraktion von DNA

2.16.1 Restriktionsverdau von DNA

Für den Restriktionsverdau von DNA wurden Restriktionsendonukleasen verwendet. Diese Enzyme erkennen spezifische Basensequenzen in einem DNA-Doppelstrang und schneiden beide Stränge an spezifischen Stellen (Erkennungssequenzen). Unterschiedliche Enzyme, die identische Spaltstellen aufweisen, bezeichnet man als Isoschizomer.

Alle verwendeten Restriktionsenzyme wurden von der Firma MBI Fermentas bezogen und mit dem vom Hersteller empfohlenen Puffer und Inkubationstemperatur eingesetzt. Die Inkubationsdauer betrug im allgemeinen 1h. Die Menge des eingesetzten Enzyms richtete sich nach der DNA-Menge, wobei davon ausgegangen wurde, dass unter optimalen Bedingungen 1 Unit Restriktionsenzym 1 µg DNA innerhalb von 1 h vollständig schneidet. Das Gesamtvolumen eines Ansatzes betrug 20-30 µl pro 1 µg DNA. Eine Kontrolle des Verdau erfolgte durch eine Gelelektrophorese (s. 2.12.7). Die Reaktion wurde durch eine Hitzeinaktivierung des Enzyms beendet.

Sofern ein Plasmid mit zwei Restriktionsenzymen verdaut werden sollte wurde ein Kreuzverdau durchgeführt (Sambrook J, 1989). Hierfür teilt man das Plasmid in zwei Ansätze auf, gibt jeweils eines der beiden Enzyme hinzu und inkubiert sie. Mit Hilfe einer anschließenden elektrophoretischen Trennung auf einem Agarosegel (s. 2.12.7) wurde geprüft ob beide Enzyme das Plasmid schnitten. Die getrennten Ansätze wurden anschließend mit dem jeweils anderen Enzym ergänzt und die Pufferkonzentrationen gegebenenfalls entsprechend eingestellt.

2.16.2 Dephosphorylierung von DNA-Enden

Um die Religation von restriktionsverdauten Plasmiden zu verhindern, wurde die Phosphatgruppe am 5'-Ende hydrolytisch mit Hilfe der alkalischen Phosphatase (CIAP) abgespalten. Bei DNA-Fragmenten wurde dieses Verfahren i.d.R. nicht angewendet, da die Phosphatgruppe für eine anschließende Ligation nötig ist.

Die Dephosphorylierung erfolgte ggf. im Anschluss an den Restriktionsverdau, wobei der Ansatz direkt in der Dephosphorylierungs-Reaktion eingesetzt wurde. Eine

Reinigung erfolgte i.d.R. nicht. Statt dessen ist der Ansatz mit A.dest auf ein mehrfaches seines Volumens aufgefüllt worden, wodurch störende Einflüsse wie Proteine oder Salze des Restriktions-Puffers gemindert wurden.

Der Restriktionsansatz (20-30 μ l) wurde in einem Gesamtvolumen von 100 μ l 1 x Dephosphorylierungspuffer mit 1 U alkalischer Phosphatase für 30 min bei 37° C inkubiert. Das Beenden der Reaktion erfolgte durch eine Hitzeinaktivierung des Enzyms bei 65° C für 10 min.

2.16.3 Ligation von DNA

Bei der DNA-Ligase handelt es sich um ein Enzym, das ATP-abhängig die Phosphodiester-Bindung zwischen einer 5'-Phosphatgruppe an einem DNA-Ende und der 3'-OH-Gruppe an dem anderen Ende schließt.

Das Volumen des Ligationsansatzes betrug stets 10 μ l, der gesamte DNA-Gehalt lag bei 0.2 μ g, wobei das Verhältnis von Vektor zu Fremd-DNA bei 1:1 bis 1:3 lag. Bei Ligationen mit glatten Enden wurde dem Ansatz 15% Polyethylen-Glycol (PEG) zugesetzt, was zu einer Kondensierung der DNA-Moleküle in Aggregate führt (Sambrook J, 1989). Dadurch wurde die Wahrscheinlichkeit erhöht, dass sich die glatten Enden lange genug in einer ausreichenden Nähe zueinander aufhalten, so dass die Ligase sie verknüpfen kann.

Für alle Ligationen wurden die T4-DNA-Ligase und der mitgelieferte T4-DNA-Ligations-Puffer verwendet. Es sind stets 1-2 U T4-DNA-Ligase eingesetzt worden. Immer wurde auch eine negativ Kontrolle ohne Fremd-DNA mitpipettiert, um eine Religation auszuschließen. Die Ligation erfolgte bei 16°C über Nacht oder 1h bei Raumtemperatur (Sambrook J, 1989).

2.16.4 Herstellung chemokompetenter Bakterienzellen

Die Herstellung chemokompetenter Zellen erfolgte nach der Rubidium-Chlorid Methode (Promega, 1998), wobei anstelle des Rubidiumchlorids Cäsiumchlorid verwendet wurde. Hierfür wurden *E.coli* Zellen des Stammes DH5 α verwendet. 100 ml steriles LB-Medium (s. 2.5) wurden mit 20 mM MgCl₂ und 1 ml Starterkultur (DH5 α)

versetzt, bei 37°C in einem Schüttler bis zu einer optischen Dicht von $A_{600} = 0.4-0.6$ inkubiert und anschließend in eisgekühlten sterilen Falcon-Kulturröhrchen für 5 min bei 4°C und 4.500 x g zentrifugiert. Alle weiteren Arbeiten erfolgten auf Eis. Der Überstand wurde dekantiert, das Präzipitat in 0.4 x Volumen eisgekühlten TFB I (s.2.5) aufgenommen und für 5 min auf Eis belassen. Es erfolgte ein erneutes Zentrifugieren der Zellen mit 4.500 x g bei 4°C für 5 min. Nach Abnahme des Überstandes ist das Präzipitat in 1/25 Volumen eisgekühlten TFB II (2.5) resuspendiert und für 10 – 60 min auf Eis inkubiert worden. Anschließend wurden die Zellen á 400µl aliquotiert und bei – 70°C gelagert.

2.16.5 Transformation von Plasmid-DNA in prokaryotische Zellen

Als Transformation bezeichnet man das Einschleusen von Fremd-DNA in einen Organismus. Als bakterielle Zellen diente der *E.coli* Stamm DH5α. Die Transformation wurde nach (Sambrook J, 1989) durchgeführt.

Zu je 100µl chemokompetenten Zellen wurde 1µl eines Ligationsansatzes (s. 2.16.3) gegeben und 20 min auf Eis inkubiert. Im Anschluss erfolgte ein Hitzeschock bei 42°C für 90 s und eine weitere Inkubation auf Eis für 2 min, wodurch die Aufnahme der Plasmid-DNA in die Zellen bewirkt wurde. Nach Zugabe von 1 ml SOB-Medium und einer 1 stündigen Inkubation bei 37°C wurden die Zellen für 2 min bei 5000 rpm sedimentiert, der Überstand bis auf einen Rest von 100µl abgenommen und die Zellen im verbleibenden Medium resuspendiert. Schließlich wurden die transformierten Zellen auf Ampicillin-LB-Agarplatten (s. 2.5) ausplattiert und über Nacht bei 37°C bebrütet.

5 - 10 der über Nacht gewachsenen Kolonien wurden als Flüssigkultur im analytischen Maßstab (5ml LB Medium + 50µg Ampicillin/ml) angezchtet und die isolierte Plasmid-DNA (s. 2.16.6) durch Restriktionsverdau und anschließende Gelelektrophorese (s. 2.12.7) analysiert.

2.16.6 Plasmid-DNA-Präparation

Die Isolierung von Plasmid-DNA aus Bakterien Kulturen wurde stets mit dem Jetstar Plasmid Mini-, Midi- bzw. Maxi-Kit von Genomed nach Angaben des Herstellers durchgeführt.

2.16.7 Sequenzierung klonierter DNA

Sämtliche Sequenzierungen wurden in einer Serviceabteilung des Bernhard-Nocht-Institut für Tropenmedizin durchgeführt. Die Sequenzierungen erfolgten nach der Didesoxymethode (Sanger et al., 1992) mit einer Modifikation, bei der 4 mit unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoffen gekoppelte Didesoxynukleotid-Analoga in einem Reaktionsansatz verwendet werden (Smith et al., 1986).

Für die Sequenzier-PCR wurden 1µg Plasmid-DNA mit 1µl Primer (10pmol) versetzt, mit A.bidest auf 16µl aufgefüllt und durch Zugabe von 4µl ABI-PRISM-Big-Dye-Terminator-Cycle-Sequencing-Ready-Reaction-Kit (Perkin-Elmer) komplettiert. Die anschließende PCR erfolgte in einem Thermocycler (Robocycler Gradient 96) und umfasste 25 Zyklen zu je 10sec bei 95°C, 5sec bei 50°C und 4min bei 60°C. Anschließend wurde die PCR Reaktion in ein neues Tube überführt, mit 80µl HLPC-H₂O, 10µl 3M NaAc pH 4,6 und 250µl 100% Ethanol versetzt und durch eine 15min Zentrifugation bei 14000rpm gefällt. Der Überstand wurde vorsichtig abpipettiert, das Pellet mit 100µl 70% Ethanol gewaschen, erneut für 5min bei 1400rpm zentrifugiert, vom Überstand befreit und für 10min bei 37°C getrocknet. Anschließend wurde das Pellet bei -20°C eingefroren und ins Bernhard-Nocht-Institut für Tropenmedizin überführt. Die Sequenzierung erfolgte an einem ABI PRISM 377 DNA Sequenzierer.

Die so gewonnenen Sequenzen wurden im World-Wide-Web mit Hilfe externer Datenbanken weiter untersucht. Zu diesem Zweck wurde die WWW-Alignment-Software BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>) des National Center of Biotechnology Information (NCBI), sowie die WWW Alignment-Software Fly BLAST (<http://www.bdgp.org/blast/>) des Berkeley *Drosophila genom project* verwendet.

2.17 *In-situ* Hybridisierungen

Die Methode der *in-situ* Hybridisierung wurde für die Bestimmung des Expressionsmusters der durch die Datenbankrecherchen ermittelten Ligandengesteuerten Chlorid-Kanäle von *Drosophila melanogaster* auf zellulärer Ebene eingesetzt. Mit dieser Methode ist es möglich die mRNA in der Zelle nachzuweisen und hierdurch die Gewebe- oder Zellspezifische Expression eines Proteins zu verfolgen.

Zur Detektion der mRNA wurden *in vitro* synthetisierte RNA-Fragmente von ca. 300 bp Länge verwendet. Die *in-situ* Hybridisierung erfolgte modifiziert nach Vosshall et al. (Vosshall et al., 1999).

2.17.1 Synthese Digoxigenin-markierter RNA-Sonden

Für die Detektion der mRNA durch *in-situ* Hybridisierungen wurde die komplementäre RNA (cRNA) als Sonde eingesetzt. Als Matrize dieser RNA Sonden verwendet man die cDNA der zu detektierenden mRNA. Die cDNA-Sequenz liegt in der von RNA-Polymerase Promotoren (T7 und SP6) flankierten Klonierungsstelle des pSport I Plasmids.

Zur Synthese von cRNA wurde ein ca. 300 bp großes Fragment des jeweiligen Gens mit Hilfe einer PCR (Primer s. 2.9.5) aus der cDNA amplifiziert und in die multiple Klonierungsstelle (MCS) des Vektors ligiert.

Um die Transkription von Plasmid DNA zu unterbinden wurde das Plasmid stromaufwärts von der cDNA mit einem geeigneten Restriktionsenzym linearisiert (s.2.16.1). Es wurden hierbei nur Enzyme verwendet, die glatte Enden oder solche mit 5'-Überhang hinterlassen. Der linearisierte Ansatz wurde mit dem Jetquick PCR Purification Spin Kit nach Angaben des Herstellers gereinigt, mit 2,5 Volumen 100% Ethanol und 0,1 Volumen Natriumacetat (3 M, pH 5,2) gefällt und in 13,5µl Nuklease freien Wasser aufgenommen. Die Polymerase-Reaktion erfolgte mit dem DIG RNA Labeling Kit ausgehend von 1µg DNA. Die Reaktion wurde entsprechend den Angaben des Herstellers und mit der geeigneten RNA-Polymerase für 2h bei 37°C inkubiert. Im Anschluss wurde die Probe mit STE-Puffer (s.2.5) auf 50µl aufgefüllt, über eine G50 ProbeQuant Säule nach Angaben des Herstellers gereinigt, mit Hybridisierungslösung (ULTRAhyb) auf 100µl aufgefüllt, aliquotiert und bei -80°C bis zur weiteren Verwendung gelagert.

2.17.2 Kontrolle der *in-vitro* transkribierten RNA Sonden

Zur Kontrolle der Sonden wurden 2µl der gereinigten Sonden vor dem Auffüllen mit der Hybridisierungslösung abgenommen und mit A.bidest eine Verdünnungsreihe

angefertigt (1:10, 1:30, 1:90, 1:270 etc.). Jeweils 1µl der Verdünnungen wurden auf eine Biodyne Nylonmembran (Invitrogen) aufgetragen und an der Luft getrocknet. Die Fixierung der RNA auf der Membran erfolgte durch eine 1 min Bestrahlung mit 120mJ UV-Licht.

Die Membran wurde 1h in Blockierlösung (0,5% I-Block in Maleinsäurepuffer) inkubiert, um eine unspezifische Bindung der Antikörper an die Membran zu minimieren. Daran schloss sich eine 1 stündige Antikörperinkubation mit Anti-Digoxigenin-AP Fab Fragment (Roche) in einer 1:2000 Verdünnung in Blockierlösung an. Zur Entfernung nicht- oder unspezifisch gebundener Antikörper wurde die Membran 3 mal für 5min in Maleinsäurepuffer gewaschen. Die anschließende Farbreaktion erfolgte mit den Substraten der alkalischen Phosphatase NBT (45µl) und BCIP (35µl) in 10 ml Reaktionspuffer. Das Stoppen der Reaktion erfolgte durch mehrmaliges Waschen mit Wasser. Die Sonden wurden für eine anschließende *in-situ* Hybridisierung eingesetzt wenn sie bis zu einer Verdünnung von 1:810 nachweisbar waren.

2.17.3 Hybridisierung von Kopfschnitten und Signaldetektion

Die *in-situ* Hybridisierungen erfolgten an 10µm dicken Kopfschnitten von *Drosophila melanogaster*. Hierfür wurden stets nur wenige Tage alte adulte Tiere eingesetzt, die durch eine kurze Inkubation auf Eis betäubt und anschließend decapitiert wurden. Die abgetrennten Köpfe wurden sofort in OCT (Tissue-Tek) eingebettet und in 2-Methylbutan bei -56°C eingefroren. Bei nicht sofortiger Weiterverwendung konnten die eingebetteten Präparate bei -80°C über einige Wochen gelagert werden.

Die Schnitte wurden in einem Kryostaten bei -19°C Objekttemperatur und -23°C Boxtemperatur, mit der Einstellung 1,5 für die Schnittgeschwindigkeit am Gerät durchgeführt. Die Schnitte wurden auf Superfrost Plus Objektträger (Menzel-Gläser) aufgenommen und 20min bis maximal 3h bei RT luftgetrocknet. Bis zur weiteren Verwendung wurden die Schnitte bei -80°C gelagert.

Vor der Hybridisierung erfolgte eine 30min Fixierung der Präparate in 4% Paraformaldehyd (siehe 2.5) um den Verlust an zellulärer RNA während der Hybridisierung zu minimieren. Dieser Effekt beruht auf einer Verknüpfung der Aminogruppen (Basyuk et al., 2000). Im Anschluss wurden die Schnitte dreimal für jeweils 5min in PBS pH 7,4 gewaschen.

Die anschließende Acetylierung der Schnitte erfolgte für 10min in Acetylierungslösung (siehe 2.5) bei RT. In Abwandlung des Protokolls nach Vosshall et al. (Vosshall et al., 1999) wurden die Schnitte anschließend 3 mal mit PBS-Puffer pH 7,4 + 0,3% Triton X-100 gewaschen um die Permeabilität der Schnitte zu erhöhen.

Die Prähybridisierung erfolgte für 1h bei 60°C mit ULTRAhyb-Lösung, der 500µg/ml frisch denaturierte Lachsspermien-DNA zugesetzt wurden. Pro Objektträger wurden 100µl Prähybridisierungslösung aufgetragen und anschließend mit einem sterilen Deckgläschen abgedeckt um das Austrocknen zu verhindern. Für die anschließende Hybridisierung wurden die cRNA-Sonden (s. 2.17.1) 5min bei 80°C denaturiert um eventuelle Sekundärstrukturen, welche die Hybridisierung behindern würden, aufzulösen. Es wurden pro Objektträger 1-2µl der verdünnten Sonden (s.2.15.1) in 100µl Hybridisierungslösung (ULTRAhyb) gegeben und wie bei der Prähybridisierung überschichtet. Die Hybridisierung erfolgte über Nacht bei 60°C in einer feuchten Kammer in einem Hybridisierungssofen. Für die Stringenzwaschungen wurden die Objektträger zunächst für 20min in 5 x SSC bei 60°C inkubiert und die Deckgläschen entfernt. Anschließend folgten drei weitere Waschungen in 0,2 x SSC bei 60°C für 20min und eine letzte Waschung in 0,2 x SSC bei RT.

In Vorbereitung auf den immunologischen Nachweis wurden die Objektträger für 10min bei RT in Maleinsäurepuffer äquilibriert. Für den Nachweis der Sonden wurden anti-Digoxigenin-AP Fab Fragmente vom Schaf (Roche) eingesetzt. Um eine unspezifische Bindung der Antikörper zu minimieren wurden die Schnitte 1h in Blockierlösung bei RT und anschließend ebenfalls bei RT für 1h mit den Anti-Digoxigenin-Antikörpern in einer 1:1000 Verdünnung in Blockierlösung inkubiert. Um eine Verdunstung zu verhindern wurden die Objektträger während der Inkubation mit Deckgläschen bedeckt und in Saranfolie eingeschlagen.

Die Signaldetektion erfolgte durch eine enzymatische Färbung. Hierzu wurden die Objektträger mit 100µl einer Färbelösung aus 35µl BCIP, 45µl NBT und 100µl Levamisol (100mM) in 10ml Reaktionspuffer bedeckt. Da ein Kontakt der Färbelösung mit der Luft zu unspezifischen Präzipitationen durch Oxidation der Substrate führen kann (Schaeren-Wiemers und Gerfin-Moser, 1993), wurden die Objektträger mit Deckgläschen abgedeckt, in Saranfolie eingeschlagen und invertiert. Die Färbung erfolgte bei RT und unter Lichtausschluss, bis der gewünschte Färbegrad erreicht war. Die Färbereaktion wurde durch einmaliges waschen in 1 X PBS + 0,1% Triton gestoppt. Anschließend wurden die Schnitte in Aquatex (Merck) eingedeckelt und mit einem Leica DM IRBE Mikroskop photographiert.

2.18 Erzeugung transgener *D. melanogaster* durch Mikroinjektion

DNA-Sequenzen, die in Vektoren mit flankierenden "P-Element-Repeats" kloniert werden, können durch das Enzym Transposase stabil in das Genom von *Drosophila* integrieren (Spradling und Rubin, 1982). Tragen diese Vektoren Markergene, wie *white* oder *vermilion* kann der Einbau in das Genom durch phänotypische Änderungen die in der Nachkommenschaft auftreten verfolgt werden. Die Vektoren werden als Plasmide präpariert und zusammen mit einem Helferplasmid (Transposasequelle) in Embryonen eines Stammes injiziert, der für das Markergen defizient ist.

Um einen Teil der untersuchten Rezeptoren umfassender zu charakterisieren und Aussagen über Ihre Funktion im Organismus machen zu können, wurde sich der Methode der RNA-Interferenz (RNAi) bedient. Diese Methode wurde bei den Untereinheiten CT21430, CT22815, CT34515, Lcch3 und GluCl angewendet. Zu diesem Zweck wurde das GAL4/UAS Systems (Brand und Perrimon, 1993) benutzt. GAL4 ist ein Transkriptionsfaktor aus der Hefe, der die gezielte Transkription von Genen die unter der Kontrolle einer UAS Sequenz (=Upstream Activating Sequence) stehen, in *Drosophila* aktivieren kann (Fischer et al., 1988).

Hierfür wurden transgene *Drosophila* Linien hergestellt, die unter der Kontrolle einer UAS-Einheit einen Teil der genomischen Sequenz der oben genannten Untereinheiten sowie ein natürliches Intron aus dem 14-3-3zeta Gen und einen Teil der korrespondierenden cDNA Sequenz enthalten.

2.18.1 Konstruktion der Vektoren für RNA-Interferenz Versuche

Die Konstruktion der RNAi Vektoren erfolgte zunächst in dem pTR-RNAi Vektor, der über zwei multiple Klonierungsstellen verfügt, wobei die Schnittstellen der zweiten multiplen Klonierungsstelle aus den Isoschizomeren der ersten Klonierungsstelle bestehen. Zwischen den beiden Klonierungsstellen befindet sich ein natürliches Intron von *D. melanogaster* aus dem 14-3-3zeta Gen, dass ca. 350bp lang ist und zur Bildung einer Haarnadelschleife am Ende der doppelsträngigen RNA dient, wodurch die Basenfehlpaarungen der dsRNA verringert und somit die Effektivität des RNAi Effektes erhöht wird (Reichhart et al., 2002). Um eine weitere Erhöhung des RNAi Effektes zu erreichen wurde in die erste multiple Klonierungsstelle ein Teil der

genomischen Sequenz der zu untersuchenden Untereinheiten kloniert. Diese Sequenz enthält ein Teil eines Exons, ein Intron und den Anfang des darauf folgenden Exons. Durch das Spleißen dieser genomischen DNA wird der RNAi *knockout* Effekt zusätzlich aktiviert (Kalidas und Smith, 2002). In die zweite multiple Klonierungsstelle wurde die gleiche Sequenz ohne Intron kloniert, welche mit den gleichen Oligonukleotiden (s.2.9.8) mittels einer Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) amplifiziert wurden nur das in diesem Fall als Matrize cDNA anstelle von genomischer DNA von *Drosophila* diente.

Zu diesem Zweck wurden die Oligonukleotide (s. 2.9.8) bereits mit terminalen Restriktionsschnittstellen versehen, die zu den Schnittstellen in dem pTR-RNAi Vektor passten.

Reaktionsansatz (50µl):

5µl 10x PCR-Puffer
1µl dNTPs
1µl Sinn-Primer
1µl Gegensinn-Primer
1µl Matrizen DNA (10ng/µl)
0,3µl Taq/Pwo Polymerase Mix (1:20)
40,7µl A.bidest

Reaktionsprofil:

1Zyklus 1min 95°C, 30sec 54°C, 1min 68°C
15Zyklen 30sec 95°C, 30sec 54°C, 1 min 68°C
15Zyklen 30sec 95°C, 30sec 52°C, 1min 68°C

Nach der PCR wurden die Amplifikate mit dem Jetquick PCR Purification Spin Kit nach Angaben des Herstellers gereinigt, im Agarosegel auf ihre richtige Länge überprüft und durch einen Restriktionsverdau mit den dafür geeigneten Enzymen auf die anschließende Ligation in den Vektor vorbereitet.

Die Klonierung der genomischen DNA und der cDNA Amplifikate in den Vektor musste in zwei Schritten durchgeführt werden, da ein gleichzeitiges Öffnen beider Klonierungsstellen zu einem Verlust der 14-3-3zeta Sequenz geführt hätte.

Für die Klonierung der genomischen Rezeptor Sequenzen wurden sowohl der Vektor als auch die PCR Amplifikate mit den Restriktionsenzymen Spe I und Xho I verdaut, der Vektor dephosphoryliert, ligiert und in kompetente *E.coli* DH5α Zellen transformiert (s.2.16.5). Nach einer anschließenden Plasmid Präparation wurde die Ligation durch einen Restriktionsverdau mit den Enzymen Xho I und Hind III überprüft.

Im Falle einer erfolgreichen Ligation sind in einem an den Verdau anschließenden Agarosegel zwei Banden zu erkennen. Eine obere Bande die in ihrer Größe dem

geschnittenen pTR-RNAi Vektor von 4800bp entspricht und eine untere Bande die in der Größe dem jeweiligen verdauten Rezeptor Amplifikat entspricht. Von den positiven Klonen wurden Plasmid-DNA-Präparationen gemacht und selbige wurden für den zweiten Klonierungsschritt eingesetzt.

In dem zweiten Schritt wurden die cDNA Amplifikate der Rezeptor Untereinheiten mit den Enzymen SpeI und Xho I verdaut, wohingegen die Vektoren mit den jeweiligen genomischen DNAs im Bereich der zweiten Klonierungsstelle mit den Enzymen Sal I und Nhe I verdaut und dephosphoryliert wurden. Da es sich hierbei um die Isoschizomere von Spe I und Xho I handelt war eine Ligation der verdauten Rezeptor Amplifikate möglich. Es folgte eine Transformation in kompetente *E.coli* DH5 α Zellen, sowie eine Plasmid Präparation mit einem anschließenden Verdau zur Überprüfung der Ligation mit den Enzymen Hind III und Pst I.

Aufgrund der Lage dieser beiden Schnittstellen an dem den 14-3-3zeta Introns abgewandten Ende der Klonierungsstellen wurde durch diesen Verdau sowohl die genomische Rezeptor DNA als auch das 14-3-3zeta Gen und die cDNA rausgeschnitten. Durch einen zeitgleichen Verdau der Vektoren, welche nur die genomischen Sequenzen enthielten, mit den selben Enzymen und eine anschließende Analyse im Agarosegel konnten aufgrund der entsprechenden Größendifferenz die positiven Klone identifiziert werden.

Diejenigen Klone, die sowohl die genomische DNA als auch die cDNA enthielten, wurden im folgenden für einen dritten Klonierungsschritt eingesetzt, in dem die gesamte Kasette mit genomischer DNA, 14-3-3zeta Gen und cDNA, in den pUAST Vektor inkloniert wurde.

Bei dem pUAST Vektor handelt es sich um ein 9050bp großes P-Element Plasmid das über eine GAL4 UAS Sequenz, eine multiple Klonierungsstelle, eine terminale Transkriptionsequenz und das *white* Gen verfügt (Sullivan et al., 2000). Hierdurch wird die Expression von Genen unter der Kontrolle einer UAS Einheit ermöglicht. Dieses System verfügt über 5 tandemartig angeordnete und optimierte GAL4 Bindestellen (Duffy, 2002).

Zur Erzeugung der pUAST-RNAi Vektoren wurde die gesamte Kasette durch einen Restriktionsverdau mit den Enzymen NotI und KpnI aus dem pTR-RNAi Vektor geschnitten, in einem präparativen Agarosegel getrennt und aus dem Gel eluiert (s. 2.12.8). Der pUAST Vektor wurde zur Vorbereitung auf die folgende Ligation einem Kreuzverdau mit den Enzymen KpnI und NotI unterzogen und anschließend dephosphoryliert. Beide Ansätze wurden vor der Ligation mithilfe des Jetquick PCR

Purification Spin Kit nach Angaben des Herstellers gereinigt. Die Ligation und anschließende Transformation erfolgte unter Standardbedingungen (s.2.16). Der Erfolg der Klonierung wurde durch einen Verdau mit den Enzymen Xba I und EcoR I und eine Analyse im Agarosegel überprüft.

Von den positiven Klonen wurden Plasmid Präparationen gemacht, die sequenziert (s. 2.16.7) und anschließend für die Injektion in die *Drosophila* Embryonen des Stammes w1118 eingesetzt wurden.

2.18.2 Mikroinjektion in die Embryonen von *D. melanogaster*

Die Injektion der pUAST-RNAi Vektoren in die Embryonen erfolgte in Kombination mit dem Helferplasmid (pUCHs Δ 2-3) das ein Transposase Gen enthält und somit die Insertion der von den *Inverted Repeats* flankierten UAS-RNAi-Sequenzen vermittelt.

Für die Injektion wurden Embryonen von *D. melanogaster* des Stammes w1118 verwendet, bei welchen es sich um einen *white* defizienten Fliegenstamm handelt, der dem Wildtyp entspricht aber aufgrund des fehlenden *white* Gens auf dem Genlocus 1118 eine weiße Augenfarbe besitzt.

Die adulten Tiere aus vier Zuchtgläsern im Alter von 1-2 Wochen wurden in Zuchtgläser ohne Nährmedium transferiert und für eine halbe Stunde zum Eierlegen auf Apfelsaft-Agar Platten gesetzt (s.2.5). Anschließend wurden die Eier durch vorsichtiges Ablösen mit Hilfe eines feinen Pinsels und H₂O von der Platte auf eine dünne Gaze transferiert, die sich auf einer Glasfritte mit Membranfilter befand die an ein Vakuum-Filtrationsgerät angeschlossen war. Die Eier wurden 1 x mit H₂O gespült, für 40-70s mit 7% Natriumhypochlorid dechorioniert, weitere 2 x mit Leitungswasser gewaschen und vorsichtig auf eine MEMFIL CME Membran (Porenweite 0,8 μ m) transferiert. Mit Hilfe eines Pinsels wurden die dechorionierten Eier am Gitternetz der MEMFIL CME Membran ausgerichtet, so das die Embryonen in einer Reihe lagen und die Mikropyle aller Embryonen die gleiche Orientierung aufwies.

Durch vorsichtiges Überstempeln der Embryonen an den Rand eines Objektträgers (mit der Mikropyle zur Mitte des Objektträgers), der einseitig mit einem Heptan-Kleber (s. 2.5) beschichtet war, wurden die Embryonen aufgebracht und zum Trocknen für 30 min bei 18°C in einer Schale mit Blaugel gelagert um den Innendruck der Embryonen zu

verringern. Nach Ablauf der 30 min wurden die Eier mit Voltalef H10S Öl überschichtet und sofort für die Injektion eingesetzt.

Die Injektion erfolgte mit Borosilikat Glaskapillaren GB150T8 P (Science Products GmbH), die mit einem Elektrodenpuller auf eine "bubble-number" von 6,6 - 6,8 gezogen wurden. Die "bubble-number" steht mit dem Öffnungsdurchmesser der Kapillarenspitze in direktem Zusammenhang und wurde vor jeder Verwendung bestimmt. Hierfür wurde die Kapillare auf eine 10ml Spritze aufgesteckt und in Methanol (96%) eingetaucht, wobei so lange Druck auf den Kolben der Spritze ausgeübt wurde bis die ersten Luftblasen aus der Spitze der Kapillare austraten.

Für die Herstellung der Injektionslösung wurden 12µg des jeweiligen pUAST-RNAi Vektors und 4µg des pUChsΔ2-3 Plasmids mit 1/10 Vol 3M NaAc und 2 Vol Ethanol abs. versetzt, für 10 min auf Eis inkubiert und 20 min bei 13000 x g zentrifugiert. Danach wurde der Überstand abpipettiert, das DNA-Sediment 2 x mit 100µl 70% Ethanol gewaschen und daraufhin in 20µl Injektionspuffer (5mM KCl, 0,1mM NaPO₄, pH 7,4) resuspendiert. Bis zur weiteren Verwendung wurde die Injektionslösung stets auf Eis gelagert.

Die Injektionskapillare wurde von hinten über eine inerte Glaskapillare befüllt, durch leichte Erschütterungen von Luftblasen befreit, mit dem Drucksystem der Mikroinjektionsapparatur verbunden und am Mikromanipulator befestigt. Die Injektionen erfolgten unter optischer Kontrolle an einem Mikroskop mit 100 x Vergrößerung mit Hilfe des Mikromanipulators (Olympus).

Embryonen, bei denen bereits die Bildung der Polzellen stattgefunden hatten und die somit einer Transformation der Keimbahnzellen unzugänglich waren, wurden mit Hilfe der Injektionsnadel seitlich aufgerissen und somit abgetötet. Die Injektion fand am posterioren Ende der Embryonen statt. Zu diesem Zweck wurde die Kapillare nach erfolgter Punction der Membran zu ~1/8 in den Embryo vorgeschoben und mit Hilfe eines kurzen Druckpulses eine adäquate Menge DNA injiziert. Die genaue Menge der injizierten DNA richtete sich nach dem jeweiligen Trocknungszustand der Embryonen. Nach erfolgter Injektion aller Embryonen eines Objektträgers wurde selbiger bei 18°C für ca. 48 Std. in einer feuchten Kammer gelagert. Nach 48 Std. war das Embryonal-Stadium abgeschlossen, die L1 Larven wurden in ein Zuchtglas mit Standardnährmedium transferiert und bei 25°C und einer relativen Luftfeuchtigkeit von 50-60% gehalten.

2.18.3 Selektion transformierter Fliegen

Das nachfolgend beschriebene Kreuzungsschema zur Erzeugung transgener *Drosophila* RNAi Tiere ist am Beispiel der [w1118]; P{UAS – Glu – 14-3-3zeta dsRNA} Linie für die Untereinheit GluCl beschrieben worden, ist jedoch für die ebenfalls hergestellten Linien der Untereinheiten CT21430, CT22815, CT34515 und Lch3 nach dem gleichen Schema durchgeführt worden.

Nach ca. 8-10 Tagen bei 25°C und 50-60% Luftfeuchtigkeit schlüpften die adulten Fliegen der F0 Generation. Die Tiere wurden möglichst sofort nach dem Schlüpfen, spätestens jedoch innerhalb von 8 Stunden, nach Geschlecht getrennt, um die Jungfräulichkeit der Weibchen zu sichern und um diese mit adulten Fliegen des Stammes w1118 (♀ ebenfalls jungfräulich) zu kreuzen.

Die Selektion transformierter Fliegen wurde durch die Verwendung des *white*-Gens (rote Augenfarbe) als dominantem Selektionsmerkmal ermöglicht. Da die Insertion der P-Element-Konstrukte in der Keimbahn der injizierten Embryonen erfolgte, konnte das Insertionsereignis erst in der F1-Generation beobachtet werden.

Der Wechsel der Augenfarbe von Weiß nach Orange bei den heterozygoten Tieren in dieser Generation ermöglichte die Selektion. Jede transgene Fliege dieser Generation wurde hierbei als eigene Linie behandelt und erneut mit jungfräulichen Fliegen des Stammes w1118 gekreuzt. Die heterozygoten Fliegen der F2 Generation einer Linie wurden erneut mit Hilfe ihrer Augenfarbe identifiziert und miteinander verpaart. Die hieraus resultierende F3 Generation bestand zu 25% aus homozygoten [w1118]; P{UAS-Glu-14-3-3zeta dsRNA}, 50% aus heterozygoten und weiteren 25% aus nicht transgenen Tieren (= w1118). Ausschließlich die homozygoten Tiere wurden für die weitere Zucht und anschließenden Kreuzungen verwendet. Alle anderen Tiere wurden sofort nach dem Schlüpfen aus den Gläsern entfernt und getötet.

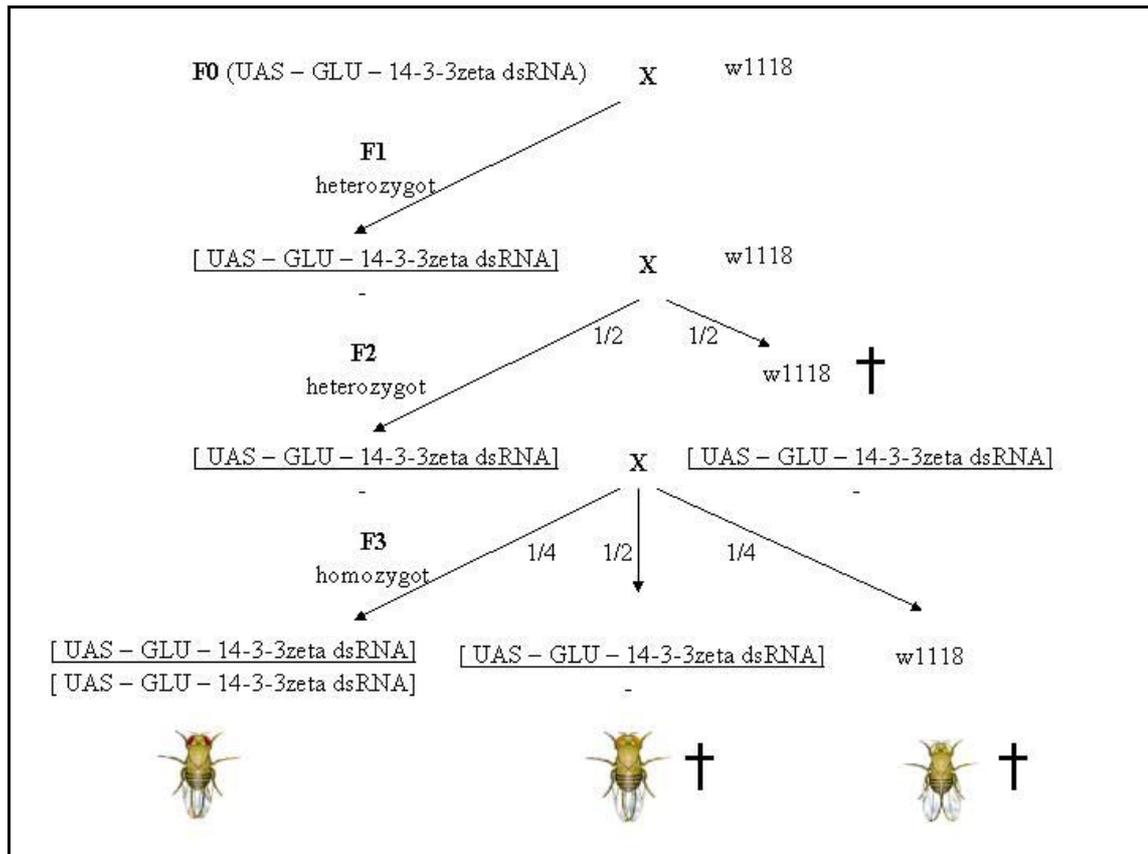


Abbildung 2.18.3-1: Schematische Darstellung des Kreuzungsschemas zur Erzeugung homozygoter transgener Tiere am Beispiel der $[w1118]; P\{UAS-Glu-14-3-3zeta\ dsRNA\}$ Linie für die Untereinheit GluCl. X = Kreuzung, † = Tiere wurden getötet, F = Generation

2.19 Phänotypische Analysen transgener Tiere

Für die Aktivierung der RNA-Interferenz Effekte in den unter 2.18 erzeugten transgenen Tiere (=Effektorlinien) ist eine weitere Kreuzung mit einer sogenannten Treiberlinie nötig gewesen.

Als Treiberlinien, so werden diejenigen Linien bezeichnet die Gal4 exprimieren, wurden zwei *Drosophila* Linien aus dem Bloomington Stock Center verwendet, die GAL4 zum einen in neuronalen Gewebe exprimieren ($w[*]; P\{w[+mC]=Nrv2-GAL4.S\}3; P\{w[+mC]=Nrv2-GAL4.S\}8$) und zum anderen nur nach Induktion durch einen Hitzeschock ($w[*]; P\{w[+mC]=GAL4-Hsp70.PB\}89-2-1$). Eine weitere Linie ($yw; P\{tub-GAL4; TM3, Sb\}$), die freundlicherweise von Herrn Prof. Heisenberg (Universität Würzburg) zur Verfügung gestellt wurde und GAL4 in allen Zellen exprimiert, ist zusätzlich eingesetzt worden.

Für die Kreuzungen wurden jeweils 5 jungfräuliche Weibchen der jeweiligen Treiberlinie mit 5 homozygoten Männchen der jeweiligen Effektorlinie in einem Zuchtglas mit Standardnährmedium zusammengesetzt. Als Effektorlinien wurden die Linien [w1118]; P{UAS - Glu - 14-3-3zeta dsRNA} für die Untereinheit GluCl, [w1118]; P{UAS - 21430 - 14-3-3zeta dsRNA} für die Untereinheit CT21430 und [w1118]; P{UAS - 34515 - 14-3-3zeta dsRNA} für die Untereinheit CT34515 eingesetzt. Zusätzlich wurde die Linie w[1118]; P{w[+mC]= UAS-Cameleon.2.1}82 aus dem Bloomington Stock Center als Effektorlinie eingesetzt, die das Gen Cameleon 2.1 unter der Kontrolle einer UAS Einheit exprimiert und somit sowohl zur Visualisierung des Transkriptionsortes als auch zum Nachweis der Funktionalität der Treiberlinien verwendet werden konnte.

Des weiteren dienten die aus diesen Kreuzungen resultierenden Tiere als Negativkontrolle, da es nicht zur Transkription von dsRNA und somit zu keiner RNA-Interferenz kommen konnte.

2.19.1 Untersuchungen zur Vitalität

Zur Untersuchung der Vitalität der transgenen Tiere wurden die Parameter Laufen, Putzen und Ruhen herangezogen. Die aus den Kreuzungen mit der Treiberlinie GAL4-Hsp70 (w[*];P{w[+mC]=GAL4-Hsp70.PB}89-2-1) stammenden Tiere wurden zuvor zur Aktivierung des *heat-shock* Promotors im L2 Stadium für 60min bei 37°C inkubiert. Die aus den Kreuzungen resultierenden adulten Tiere wurden durch ein 5s Einleiten von Stickstoff in die Zuchtgläser betäubt und jeweils 4 Tiere aus einer Kreuzung wurden in eine Glasküvette (H: 5 cm, B: 5 cm, T: 1 cm) transferiert. Nach einer Regenerationsdauer von 15 min wurden die Tiere mit einer CCD-IRIS Kamera (Sony), die über einen DV Analog A/V Konverter (DAC-1 Pro, Sony) an einen PC angeschlossen war, mit Hilfe des Programms Adobe Premiere 6.0 für 60s gefilmt. Anschließend wurden die Tiere erneut mit Stickstoff betäubt und wieder in die Zuchtgläser überführt.

Dieses wurde an 24 - 31 aufeinander folgenden Tagen wiederholt. Zur Analyse der einzelnen Parameter wurde die Dauer der einzelnen Aktivitäten pro 60 sec gestoppt und protokolliert.

2.19.2 Untersuchungen zum Entwicklungszyklus

Für die Untersuchungen zum Entwicklungszyklus der transgenen Tiere wurden sämtliche Kreuzungen der zu untersuchenden Effektorlinien mit der jeweiligen Treiberlinie zeitgleich angesetzt. Die Aktivierung des *heat-shock* Promotors der aus der Kreuzung mit der Treiberlinie GAL4-Hsp70 ($w[*];P\{w[+mC]=GAL4-Hsp70.PB\}$ 89-2-1) stammenden Tiere erfolgte wie unter 2.18.1 beschrieben.

Vom Zeitpunkt der Kreuzung an wurden die Anzahl der aus den Kreuzungen resultierenden Tiere sowie die Dauer der jeweiligen Entwicklungsstadien ab dem 3. Larvalstadium protokolliert.

3 Ergebnisse

3.1 Bioinformatische Analysen zu Homologie und Phylogenie der Liganden-gesteuerten Chlorid-Kanäle

Die Analyse des *Drosophila* Genoms (Adams et al., 2000) bezüglich der kompletten Familie der Liganden-gesteuerten Chlorid-Kanäle (s. 2.13) ergab, dass insgesamt 12 Gene dieser Familie angehören (s. Abbildung 3.1.-1). Alle Gene zeigen Ähnlichkeiten zu diversen bereits charakterisierten Liganden-gesteuerten Chlorid-Kanal Genen von Vertebraten und Invertebraten. Die drei *Drosophila* Gene CT22917 (=Grd), CT23049 (=GluCl) und CT29555 (=Rdl) wurden bereits intensiv untersucht und als GABA (γ -Aminobuttersäure) und Glutamat Rezeptoren identifiziert (Ffrench-Constant et al., 1993; Cully et al., 1996).

Datenbank Nummer	Homologie zu	Trivialname
CT19189/AAF49571.1	Glutamat-gesteuerter Cl-Kanal	-
CT21430/AAF45992.1	Glycin-gesteuerter Cl-Kanal	-
CT22815/AAF55691.1	Glycin Rezeptor $\alpha 2$	<i>Dm</i> HA-Cl I
CT22917/AAF49298.1	GABA/Glycin-gesteuerter Cl-Kanal	Grd Genprodukt
CT23187/AAF49337.1	Liganden-gesteuerter Cl-Kanal	-
CT23391/AAF58743.1	Glycin Rezeptor $\alpha 2$	-
CT23049/AAF55695.1	Glutamat-gesteuerter Cl-Kanal	GluCl & agr
CT25610/AAF48539.1	GABA A Rezeptor $\beta 3$	-
CT29555/AAF50311.1	GABA A β -Untereinheit	Rdl
CT34515/AAF54699.2	Glycin Rezeptor $\alpha 3$ Untereinheit	<i>Dm</i> HA-Cl II
CT38330/AAF48540.1	Liganden-gesteuerter Cl-Kanal	Lcch3
CT5896/AAF57144.1	Glycin-gesteuerter Cl-Kanal	-

Abbildung 3.1.-1: Die Familie der Liganden-gesteuerten Chlorid-Kanal Untereinheiten von *Drosophila melanogaster*. In der Tabelle sind die 12 potentiellen Liganden-gesteuerten Chlorid-Kanäle aus dem *Drosophila* Genom (links), sowie ihre Homologie zu bereits bekannten Liganden-gesteuerten Chlorid-Kanälen von Vertebraten und Invertebraten (Mitte) und ihre Trivialnamen (rechts) dargestellt. *Dm* = *Drosophila melanogaster*, GABA = γ -Aminobuttersäure, Grd = Glycin Rezeptor, HA-Cl I = *histamine-gated chloride channel subunit 1*, HA-Cl II = *histamine-gated chloride channel subunit 2*, Lcch3 = *Ligand-gated chloride channel homolog 3*, Rdl = *Resistant to dieldrin*

Aufgrund der phylogenetischen Analyse der Familie der Liganden-gesteuerten Chlorid-Kanal Untereinheiten von *Drosophila* mit anderen Mitgliedern dieser Familie von Vertebraten und Invertebraten, konnte ein Stammbaum erstellt werden (s. Abbildung 3.1.-2), der auf einem Vergleich der Aminosäuresequenzen basiert (s. 2.13).

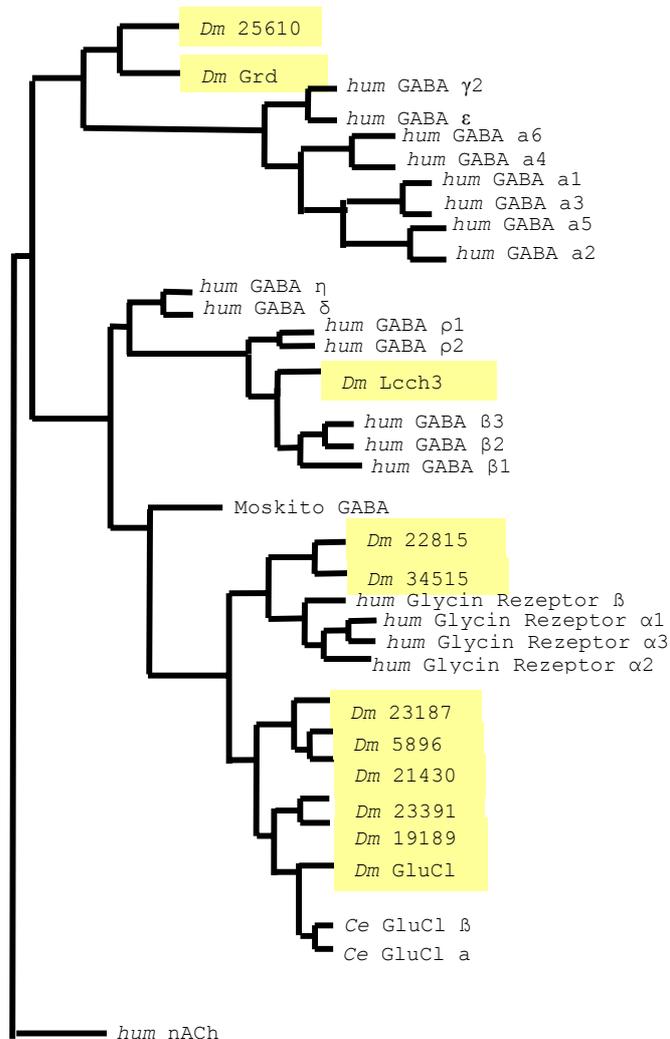


Abbildung 3.1.-2: Verwandtschaftsverhältnisse zwischen der Familie der Liganden-gesteuerten Chlorid-Kanäle von *Drosophila* zu weiteren Mitgliedern dieser Familie von Vertebraten und Invertebraten. Bei den gelb unterlegten Genen handelt es sich um die potentiellen Liganden-gesteuerten Chlorid-Kanäle von *Drosophila*. Das Rdl Gen ist hier nicht aufgeführt, ist aber mit dem *Dm* GluCl Gen in eine Gruppe einzuordnen (Zheng et al., 2002). *Dm* = *Drosophila melanogaster*, *hum* = *human*, *Ce* = *Caenorhabditis elegans*, GABA = γ -Aminobuttersäure, GluCl = Glutamat-gesteuerter Cl-Kanal, Grd = Glycin Rezeptor, nACh = nicotinischer Acetylcholin-Rezeptor, Lcch3 = *Ligand-gated chloride channel homolog 3*

Hierbei zeigt sich, dass die beiden *Drosophila* Gene CT25610 und CT22917 (=Grd) bei einer Gruppe humaner GABA Rezeptoren einzuordnen waren, das CT38330 (=Lcch3) Gen bei einer weiteren Gruppe humaner GABA Rezeptoren und die beiden Gene CT228145 und CT34515 bei den humanen Glycin Rezeptoren. Die letzte Gruppe, welche die Gene CT23187, CT5896, CT21430, CT23391, CT19189 und CT23049 (=GluCl) enthält, konnte in eine Gruppe mit den Glutamat-gesteuerten Chlorid-Kanälen von *C. elegans* eingeordnet werden.

3.2 Identifizierung und Charakterisierung des Histamin-gesteuerten Chlorid-Kanals von *D. melanogaster*

Ein Schwerpunkt dieser Arbeit lag in der Identifizierung und Charakterisierung des Histamin-gesteuerten Chlorid-Kanals von *Drosophila melanogaster*. Der Histamin-gesteuerte Chlorid-Kanal vermittelt die Effekte des Histamins im visuellen System von Arthropoden und gehört zu der Familie der Liganden-gesteuerten Chlorid-Kanäle (Hardie, 1989; McClintock und Ache, 1989). Als erster Ansatz zur Identifizierung wurden bioinformatische Analysen des *Drosophila* Genoms (Adams et al., 2000) gewählt, mit denen sämtliche potentielle Liganden-gesteuerten Chlorid-Kanäle von *D. melanogaster* erfasst wurden (s. 3.1). Die weitergehende Identifizierung basierte primär auf der Analyse des Expressionsmusters dieser Kanäle. Nur jene Transkripte, die vorwiegend im visuellen System und im mechanosensorischen System des Thorax exprimiert werden, kamen als Kandidaten in Frage. Dies beruht auf Kenntnissen über die Rolle des Neurotransmitters Histamin, welcher die Expression in diesen Systemen bei der Fliege vermuten lässt (Buchner et al., 1993; Burg et al., 1993; Melzig et al., 1996).

Die Analysen des Expressionsmusters wurden mit der Methode der RT-PCR auf gewebespezifischer Ebene durchgeführt und anschließend auf zellspezifischer Ebene mit Hilfe der *in-situ* Hybridisierung eingegrenzt. Abschließend konnte die komplette Nukleotid-Sequenz der aus den vorangehenden Analysen resultierenden potentiellen Histamin-gesteuerten Chlorid-Kanal Untereinheiten ermittelt werden.

3.2.1 Expressionsanalysen mittels RT-PCR

Zur Identifizierung der für den Histamin-gesteuerten Chlorid-Kanal Untereinheiten kodierenden Transkripte wurden RT-PCR Experimente mit spezifischen Oligonukleotiden (s. 2.9.6) und gewebespezifischer cDNA durchgeführt (s. 2.14). Zu diesem Zweck wurde Gewebe aus den Antennen, Retinae, optischen Loben, zentralem Gehirn, Thorakalganglion, Darm und Muskeln von ~10 adulten *Drosophila melanogaster* des Wildtyps (Canton S) präpariert, die RNA isoliert und schließlich cDNA synthetisiert (s. 2.11 und 2.12).

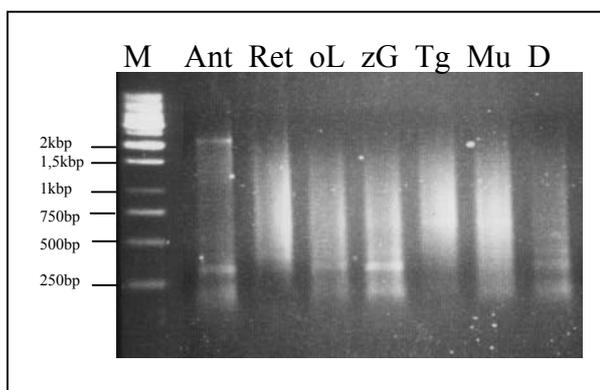


Abbildung 3.2.1-1: Ergebnis der cDNA Synthese unterschiedlicher Gewebe. Das Ergebnis ist in einem 1%igen Agarosegel dargestellt, die Fragmentgrößen des DNA Molekulargewichts-Markers (M) sind links im Bild angegeben. Ant = Antennen, Ret = Retinae, oL = optische Loben, zG = Zentralgehirn, Tg = Thorakalganglion, Mu = Muskel, D = Darm

Die für die RT-PCR verwendeten Oligonukleotide (s. 2.9.6) waren so gewählt, dass sämtliche Amplifikate 300-500bp umfassten. Die gewebespezifische RT-PCR wurde mit allen unter 3.1 ermittelten potentiellen Untereinheiten der Liganden-gesteuerten Chlorid-Kanäle durchgeführt (s. 2.14), mit der Ausnahme der Untereinheiten GluCl (CT23049) und Grd (CT22917), da diese beiden von anderen Gruppen (Ffrench-Constant et al., 1993; Cully et al., 1996) bereits intensiv untersucht wurden und definitiv nicht Teil des Histaminrezeptors sind. Zusätzlich wurden Oligonukleotide für ein 367bp großes Amplifikat aus dem Aktigen Act5C (CG4027) verwendet, dass als Kontrolle für die Überprüfung der Qualität der gewebespezifischen cDNA und gleichzeitig als interne Ladekontrolle diente.

Die aus der RT-PCR resultierenden Amplifikate wurde nach Abschluss der Reaktion in einem 1%igen Agarosegel mit Hilfe einer Ethidiumbromid Färbung (s. 2.11.8) dargestellt (Abb. 3.2.1-2).

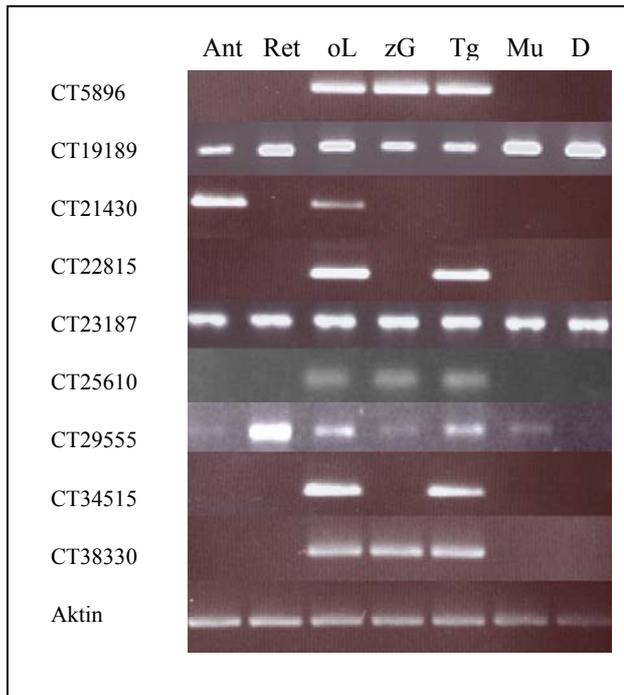


Abb.3.2.1-2: Expressionsanalyse der Liganden-gesteuerten Chlorid-Kanäle von *D. melanogaster* mittels RT-PCR.

Als Matrize für die RT-PCR wurde cDNA der Gewebe Antennen (Ant), Retinae (Ret), optische Loben (oL), Zentralgehirn (zG), Thorakalganglion (Tg), Muskeln (Mu) und Darm (D) eingesetzt. Die PCR wurde, von den Genen GluCl und Grd ausgenommen, für alle 12 aus dem *Drosophila* Genom identifizierten Kandidaten durchgeführt. Das CT23391 Transkript ergab hierbei kein Amplifikat (nicht gezeigt).

Das Transkript aus dem Aktin ergab bei jeder der verwendeten gewebespezifischen cDNAs ein annähernd gleich starkes Signal, so dass Unterschiede in der Qualität der cDNAs ausgeschlossen werden konnten. Die in Abbildung 3.2.1-2 zu erkennende Intensitätsabnahme von links nach rechts liegt an einer Abnahme der Ethidiumbromid Färbung und nicht an einem schwächeren Signal.

Die 10 verschiedenen Transkripte der Liganden-gesteuerten Chlorid-Kanal Untereinheiten ergaben unterschiedliche Expressionsmuster, die sich in 4 Gruppen einteilen lassen, wobei das Transkript der Untereinheit CT23391 aus dieser Einteilung rausfällt, da es in keinem der untersuchten Gewebe nachzuweisen war. Die erste Gruppe (CT19189 und CT23187) zeigte eine ubiquitäre Verteilung sowohl im Nervensystem als auch in peripheren Geweben. Die zweite Gruppe (CT5896, CT25610 und CT38330) zeichnet sich dadurch aus, dass sie in sämtlichen Geweben des Nervensystems exprimiert wird, nicht jedoch in den peripheren Geweben. Die dritte Gruppe (CT21430 und CT29555) zeigt eine sehr gemischte Verteilung sowohl in Geweben des Nervensystems als auch in den peripheren Geweben, wohingegen die vierte Gruppe (CT22815 und CT34515) ausschließlich in den optischen Loben und dem Thorakalganglion, nicht jedoch in anderen Geweben des Nervensystems oder in peripheren Geweben exprimiert wird.

Da Histamin bei Insekten bereits als Transmitter der Photorezeptoren im visuellen System (Hardie, 1987; Nassel et al., 1988) ebenso wie für die Mechanorezeption (Buchner et al., 1993) bekannt ist, konnte die Expression der vierten Gruppe (CT22815

und CT34515) in den optischen Loben und dem Thorakalganglion als erster Hinweis auf die Zugehörigkeit zur Gruppe der Histamin-gesteuerten Chlorid-Kanal Untereinheiten gewertet werden.

3.2.2 Nachweis der Zellspezifität durch *in-situ* Hybridisierung

Für eine weitergehende Analyse der unter 3.2.1 eingegrenzten Gruppe der potentiellen Histamin-gesteuerten Chlorid-Kanäle (CT22815 und CT34515) wurde die Expression auf zellulärer Ebene, mit Hilfe von *in-situ* Hybridisierungen, untersucht. Die Hybridisierungen wurden mit Digoxigenin-markierten Sinn und Gegensinn cRNA-Sonden durchgeführt (s. 2.17.1).

Für die Herstellung der Sonden wurden mit spezifischen Oligonukleotiden (s. 2.9.5) ca. 300bp lange Fragmente der Untereinheiten CT22815 und CT34515 aus einer *Drosophila* cDNA mittels einer PCR (s. 2.12.4) amplifiziert. Die Amplifikate wurden mit Hilfe der Restriktionsenzyme Hind III/Eco RI (CT22815) bzw. Hind III/Bam HI (CT34515) in den pSport I Vektor kloniert (s. 2.16). Die resultierenden Vektoren wurden für die Herstellung der cRNA Sonden verwendet. Für die Erzeugung einer cRNA Sonde mit der T7-RNA-Polymerase wurden die Vektoren zuvor mit dem Enzym Mlu I linearisiert, für die Synthese einer cRNA Sonde mit der SP6-RNA-Polymerase mit dem Restriktionsenzym Pst I. Die Synthese der cRNA erfolgte wie unter 2.17.1 beschrieben. Die Qualität der Sonden wurde mit Hilfe eines Dot-Blots getestet (s.2.17.2). Es wurden nur Sonden für eine Hybridisierung eingesetzt die bis zu einer Verdünnung von 1:810 nachzuweisen waren. In Abbildung 3.2.2-1 ist beispielhaft der Nachweis der CT22815 cRNA Sonden dargestellt, die für spätere Hybridisierungen verwendet wurden. Bei der Sonde, die mit der SP6-RNA Polymerase erzeugt wurde, handelt es sich um den Sinn-Strang. Im Fall der mit der T7-RNA Polymerase erzeugten Sonde um den Gegensinn-Strang. Die anschließende Hybridisierung erfolgte wie unter 2.17.3 beschrieben.

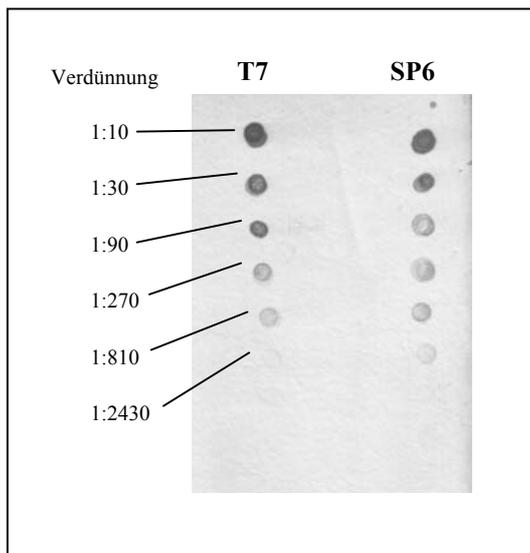


Abbildung 3.2.2-1: Dot-Blot der Digoxigenin-markierten cRNA Sonde der CT22815 Untereinheit. Getestet wurden die Sonden T7 (Synthese durch die T7-RNA-Polymerase) und SP6 (Synthese durch die SP6-RNA-Polymerase). Es wurde je 1 μ l der entsprechenden Verdünnung auf die Membran aufgebracht. Die Verdünnungen sind links in der Abbildung angegeben. Der Nachweis erfolgte mittels einer Farbreaktion mit den Substraten der alkalischen Phosphatase NBT und BCIP. Beide Sonden sind bis zu einer Verdünnung von 1:810 detektierbar.

Die Hybridisierungen der *Drosophila* Kopfschnitte mit der CT22815 Gegensinn-cRNA Sonde zeigte ein sehr spezifisches Expressionsmuster, wohingegen kein spezifisches Signal bei den Hybridisierungen mit der Sinn-cRNA Sonde festzustellen war. Dies ist ein Beleg dafür, dass es sich bei den durch die Gegensinn-cRNA Sonde erzeugten Signalen um eine spezifische Reaktion handelt, welche auf die Hybridisierung der Sonden mit der korrespondierenden mRNA in den Zellen zurückzuführen ist. Die Sinn-cRNA Sonde ist nicht in der Lage mit der mRNA zu hybridisieren, da sie zu dieser nicht komplementär ist und dient demzufolge als Negativkontrolle.

Es konnten Signale in drei unterschiedlichen Bereichen des Gehirns festgestellt werden, die offensichtlich die mRNA des CT22815 Gens transkribieren. Bei diesen Regionen handelte es sich um die Lamina, die Medulla (beides Bereiche des optischen Lobus) und um eine geringe Anzahl an Zellen im zentralen Gehirn.

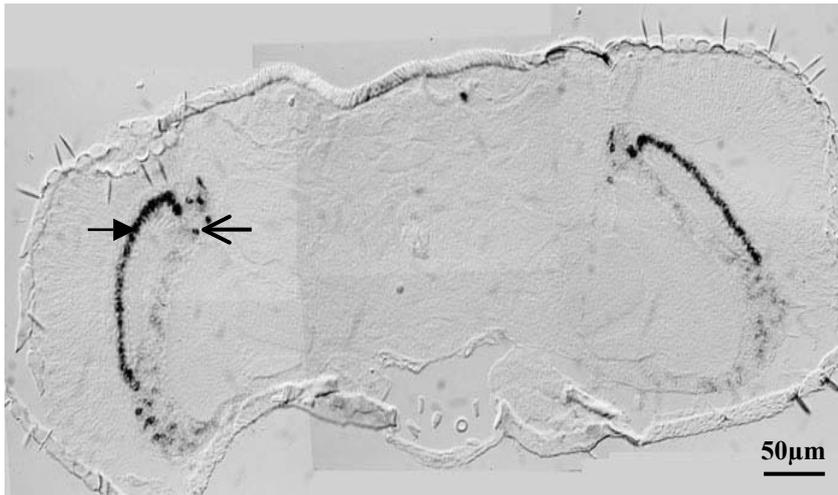


Abbildung 3.2.2-2: In-situ Hybridisierung an einem 10µm dicken frontalen Kopfschnitt von *D. melanogaster*. Die Hybridisierung erfolgte mit einer Gegensinn Digoxigenin-markierten cRNA Sonde für das Transkript CT22815. Der Nachweis

erfolgte mittels einer Farbreaktion mit den Substraten der alkalischen Phosphatase NBT und BCIP. Nur in den Geweben der optischen Loben, Lamina (geschlossener Pfeil) und Medulla (offener Pfeil), ist eine Hybridisierung erkennbar.

Eine genauere Analyse (s. Abbildung 3.2.2-3) zeigte, dass es sich bei den gefärbten Zellen in der Lamina ausschließlich um Zellen der sogenannten Lamina Monopolarzellen (LMC) handelte. Bei den Lamina Monopolarzellen handelt es sich um die postsynaptischen Zellen der Photorezeptoren R1-R6. Nur die Somata der L1-L3 Neurone waren gefärbt, alle anderen Somata in diesem Gewebe zeigten keine Färbung (s. Abbildung 3.2.2-3 A). Hierdurch konnte erstmalig gezeigt werden, dass die Photorezeptoren R1-R6 offensichtlich nur mit den Lamina Monopolarzellen L1-L3 postsynaptisch verbunden sind.

Eine begrenzte Anzahl stark verteilter Zellen in der Medulla zeigte auch eine Färbung (s. Abbildung 3.2.2-3 B). Die Photorezeptoren R7 und R8 bilden in dieser Region Synapsen mit bisher noch nicht identifizierten Neuronen der Medulla. Genau wie bei den gefärbten Zellen in der Lamina handelte es sich auch hier um die Somata der Zellen, die eine Färbung aufwiesen, wohingegen die Neuropile beider Regionen keine Färbung zeigten. Eine Analyse der Anzahl der gefärbten Somata der Medulla ergab ~800 Zellen pro Komplexauge, welche die mRNA der CT22815 Untereinheit transkribieren.

Bei den gefärbten Zellen im zentralen Gehirn (s. Abbildung 3.2.2-3 C) handelt es sich insgesamt um ~20 Somata, bei denen es sich vermutlich um die ersten Interneurone (L-Typ Neurone) der Ocellarzellen handelt, die ebenfalls Histamin als Neurotransmitter besitzen.

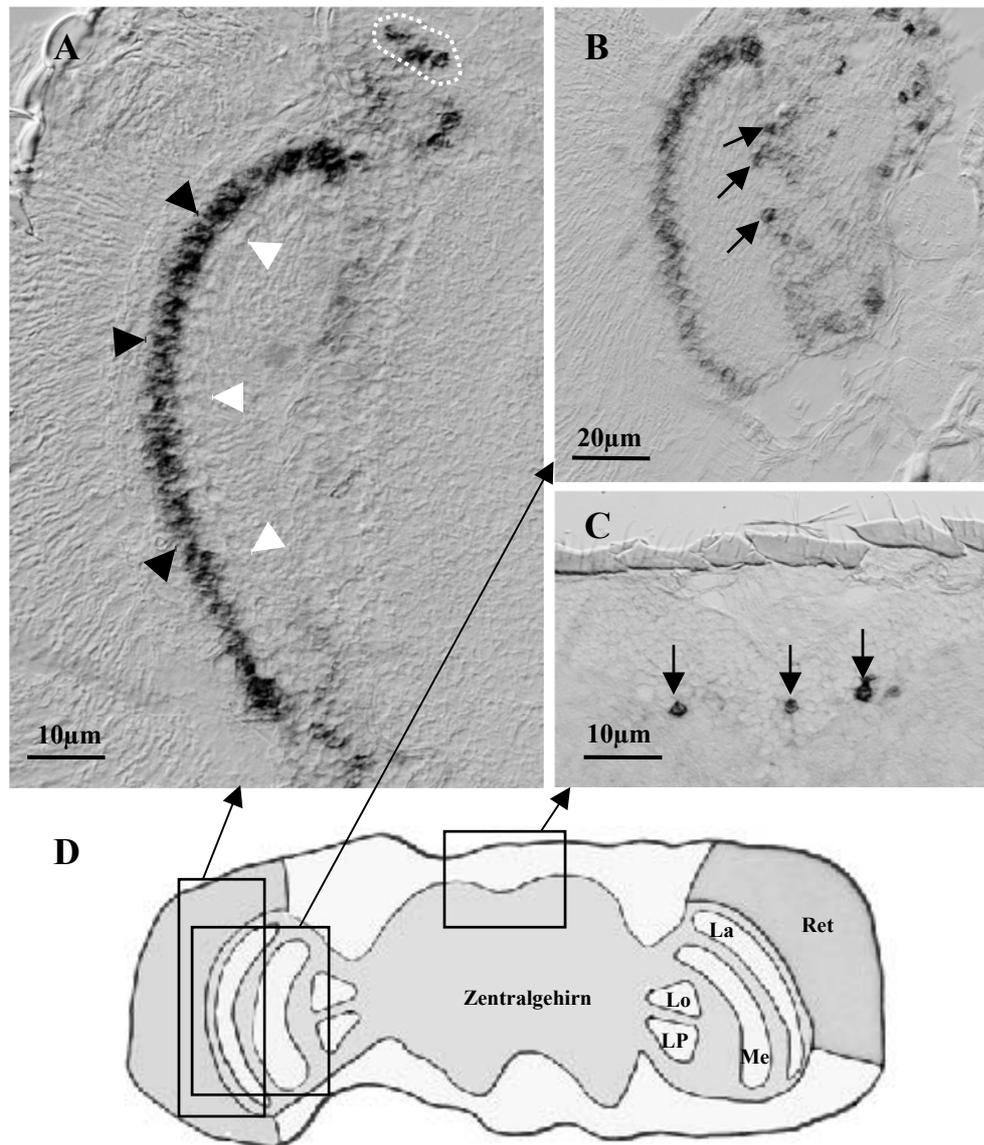


Abbildung 3.2.2-3: Detailansicht der Lokalisation der potentiellen Histamin-gesteuerten Chlorid-Kanal Untereinheit CT22815 in der *in-situ* Hybridisierung. Die Hybridisierung erfolgte mit einer Gegensinn Digoxigenin-markierten cRNA Sonde. Der Nachweis der hybridisierten Sonde erfolgte mittels einer Farbreaktion mit den Substraten NBT und BCIP. Abbildung A zeigt einen Ausschnitt aus dem optischen Lobus von *Drosophila*. Die schwarzen Pfeile markieren die L1-L3 Neurone der LMC (=Lamina Monopolarzellen), die ein starkes Signal aufweisen. Die mit weißen Pfeilen markierten L4-L5 Neurone der LMC lassen keine Hybridisierung mit der Gegensinn cRNA Sonde erkennen. In Abbildung B sind zusätzlich zu den gefärbten Zellen der Lamina die gefärbten Zellen der Medulla zu sehen und mit schwarzen Pfeilen markiert. Abbildung C zeigt einen Ausschnitt aus dem dorsalen Bereich des Zentralgehirns, mit drei der insgesamt ~20 postsynaptischen Ocellarzellen, die ebenfalls Hybridisierungen mit der Gegensinn cRNA Sonde aufwiesen. D Schematische Darstellung eines Horizontalschnittes durch den Kopf von *D. melanogaster*. Die Positionen der Ausschnitte A-C wurden durch Kästen kenntlich gemacht. Ret = Retina, La = Lamina, Me = Medulla, Lo = Lobula, LP = Lobula Platte

Bei allen Zellen, die eine Hybridisierung mit den CT22815 cRNA Gegensinn-Sonden aufwiesen, handelt es sich um Zellen, die postsynaptisch zu den Photorezeptoren liegen. Dies ist ein weiterer Hinweis dafür, dass es sich bei dieser Untereinheit offensichtlich um eine Untereinheit des Histamin-gesteuerten Chlorid-Kanals von *D. melanogaster* handelt.

Hybridisierungen mit der Gegensinn-cRNA Sonde der CT34515 Untereinheit wiesen ein identisches Expressionsmuster auf, dass jedoch kaum zu detektieren war und hier nicht abgebildet wurde.

3.2.3 Nukleotid- und Aminosäuresequenz

Für eine umfassende Charakterisierung der potentiellen Untereinheiten CT22815 und CT34515 des Histamin-gesteuerten Chlorid-Kanals von *Drosophila melanogaster* war eine Ermittlung der vollständigen Nukleotid-Sequenz unerlässlich.

Zu diesem Zweck wurden mit Hilfe der sequenzspezifischen Oligonukleotide DH-Cl 1 F-I für das CT22815 Gen und DH-Cl 2 F-I für das CT34515 Gen (s. 2.9.4) die Rezeptor-cDNA mittels einer PCR aus der cDNA amplifiziert (s. 2.12.4) und anschließend in den pcDNA 3.1 Vektor kloniert. Die Klonierung des CT22815 Amplifikats erfolgte mit den Restriktionsenzymen Hind III/Not I, die Klonierung des CT34515 Amplifikats mit den Enzymen Bam HI/Not I (s.2.16). Zur Ermittlung der Nukleotid-Sequenz wurden beide Rezeptorklone aus dem Plasmid heraus mit den Oligonukleotiden M13 sequenziert (s. 2.9.9 und 2.16.7). Die Sequenzierung erfolgte sowohl in Sinn als auch in Gegensinn Richtung. Auf diese Weise konnte der komplette Leserahmen der CT22815 und CT34515 Gene identifiziert werden.

Zur genauen Bestimmung des Transkriptionsstarts wurde zusätzlich eine 5'-RACE durchgeführt (s. 2.12.5). Dies war notwendig, da die Amplifikation der Rezeptor cDNA mit sequenzspezifischen Oligonukleotiden durchgeführt wurde, die auf der Vorhersage der Genstruktur des *Drosophila* Genom Projekt FlyBase beruhten. Die DH-Cl F-I I und II Sinn Oligonukleotide sind so gewählt, dass sie im Bereich des Start-Codons hybridisieren. Dadurch ist es möglich, dass der eigentliche Transkriptionsstart nicht erfasst ist.

Die durch die 5'-RACE amplifizierten Fragmente wurden in den pSport I Vektor kloniert und aus diesem heraus mit entsprechenden Oligonukleotiden sequenziert (s. 2.9.9 und 2.16.7). Des Weiteren wurde für die genaue Bestimmung der 3'-Enden der für

die Rezeptor Untereinheiten codierenden cDNA eine 3'-RACE durchgeführt (s. 2.12.5). Die hierbei amplifizierten Fragmente wurden ebenfalls in den pSport I Vektor kloniert und mit Hilfe der pSport Oligonukleotide (s: 2.9.9) sequenziert.

Durch das Zusammensetzen der Sequenz des CT22815 (*Dm* HA-CI I) Rezeptorklons mit den dazugehörigen Sequenzen aus der 5'- und 3'-RACE konnte die gesamte 2186 nt lange mRNA Sequenz ermittelt werden.

A

CT22815 (*Dm* HA-CI I)

```

agttgtcagcgaagtttgaactgccaaagcgtttagaacgaaaaactgaattttcaaaaatatttcgagtaaac
tgttaaatgctgaagtgttctgaaatattccttaaaacatagaaacotttcttgacatctttataaaagcaataaaa
ttcattcgggaagtttatgaatagtggtgttattaatcatgccatttggcgctcaagctgatggttatgtaatct
ctgtgaagattctagaaatccaacagaaatataattgcttcgaaaaccaagcaagattacttgactggagaggaaa
gctatttcgaattcatctaaaaactgtaaagagctcacattaaaatggtgttccaaataataatcctgggtgactcg
caccatctgcatgaagcactacgccaaggggagtttcaacaagctcggccataaccgacatcctgcccgaggac
atcaagcgttacgacaagatgagaccgccaagaaaggggtcagccgacgatagtctacttccatgtgacgggtga
tggtctgactccattgatgagaactcgtacttatgtggcggtgtgttctttgcacagacgtggaaggatca
tcgctcgcattgccggagaatatgacacaggaataccgctgctcaggtggactggctaaaaaatagtggcgg
ccggattcgtttttcaaaaacgcaaatcgggtgacctttcagaccatgacaatacccaatcactataatgtggcgtg
acaaggataagaccattctgtacatgggtcaaacactgaagctgtcctgcatcagaacttcgccatttatacc
tcatgatatacaggagtgcaagctgcaaatggaaagcctgtcccacaccacggatgacttgataatccagtgggat
ccaacaacgcccttgggtgatgaaaacatcgaactgccgcaggtggccctcatccgaaatgaaacggcggact
gtaccaagtttattcactggaacttcacatgcctggagggtggtgttcaccttaagcgtcgtttggtttaacta
cgttttcaaacactacattcccactgcatgatgtgcatgcatgggtaacctctggatcaaacccggaggcg
gcaccagcccgtgactctgggtgtcacctccttgcacgctttccacgcaaacgccaatacgcagtcgtctt
tgccacctgtttcctatctcaaggcagtggaagcctttatgtcgtttgcacgggtgttcgtgtttatggccctcat
ggagtatgtctaaataaacaatcgtcctgagcgcacgcccattcccagccgatggcctatccacccaaacctgtg
gcgggagatgggccaagaaagaggggcaggggtgctcctcctggggcagcaactcgacggccagcaagcaacaag
ccaccaatgttgccactggccgatgaaaagatcgagaaaattgagaagatctttgacgagatgaccaagaatagaag
gattgtaaccaccacacgcccgtggtgctcgcctatggacgcgcatggtcgtgattccgcgacaggagtcg
cggataaactgacccgactatcgtctccgcccacgccccctcagccagcggcaccggaaaccggaactgccca
agccgaaactcacaccgcccaggagcggctcaagcgggctataataatagatcggctcctcgcgcgtccttttccc
cgccctcttcgccagtcctgaatggcatctactgggtgtgtgtctacagatctctaaaggactacgacgactgtgc
cctgtaaaactttcgtagctctctggcactccatccgagtggttaaactgtgattgttcgatataatcgaaacgt
gtatcgcaaatttaatcttaagctttcacgcacaagctttaagtcaatgaattttaaacatagattatgtttaaac
cagaaggatggaaaaatgggacagatggagatctgattacaggataaattcaaaattatcaattcaattcctaaaa
tgcttaaagttaatcaagtacgttagctgatgtagcctaagtgaattgtaatttaattgtctcaacaaaatgct
tttaattgtaataaataagagaatccatttaacaataaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa

```

B

```

MVFQIIILVICTICMKHYAKGEFQQSLAITDILPEDIKRYDKMRPPKKEGQPTIVYFHVTVMGLDSIDENSMTYVA
DVFFAQTWKDHRLRLEPENMTQEYRLLEVDWLKNMWRPDSFFKNAKSVTFQMTIPNHMMLYKDKTILYMKVLTLLK
LSCIMNFAYPHDTQECKLQMESLSHTDDLIHQWDPPTPLVVDENIELPQVALIRNETADCTQVYSTGNFTCLEV
VFTLKRRLVYVFNFYIPTCMIVIMSWVFWIKPEAAPARVTLGVTSLLTLSTQHAKSQSSLPPVSYLKAVDAFMS
VCTVFVFMALMEYCLINIVLSDTPIPKPMAYPPKPVAGDGPKEGEGAPPGSNSTASKQQATMLPLADEKIEKIE
KIFDEMTKNRRIVTTRRVVRPPLDADGPWIPRQESRIILTPTIAPPPPPQPAPEPELPPKPLTPAQLERLKRAI
YIDRSSRVLFPALFASLNGIYWCVFYEYL

```

Abbildung 3.2.3-1: Nuklein- und Aminosäuresequenz des CT22815 (*Dm* HA-CI I) Gens. In Abbildung **A** ist die gesamte transkribierte Nukleinsäuresequenz des CT22815 Gens dargestellt. Der Translationsstart wurde durch das Start-Triplett (atg) rot markiert und liegt bei 348 nt. Stromaufwärts davon liegt die 347 nt umfassende 5'-UTR (= untranslatierte Region) die durch eine kursive Schreibweise markiert wurde. Das Stop-Triplett (taa) befindet sich bei 1806 nt und wurde blau markiert. Bei der Stromabwärts liegenden Sequenz handelt es sich um die 3'-UTR, die ebenfalls durch eine kursive Schreibweise gekennzeichnet wurde. In Abbildung **B** ist die 485 Aminosäuren umfassende Aminosäuresequenz des CT22815 Gens abgebildet, die aus der Nukleinsäuresequenz abgeleitet wurde.

Die von dem *Drosophila* Genom Projekt FlyBase (<http://flybase.bio.indiana.edu/>) vorhergesagte Länge der mRNA dieses Gens betrug jedoch nur 1458 nt. Eine genaue Analyse der ermittelten Sequenz ergab, dass es sich bei den Nukleotiden 1-348 um die 5'- untranslatierte Region (UTR) handelt und bei den Nukleotiden 1807-2186 um die 3'- untranslatierte Region. Durch Sequenzvergleiche mit Hilfe der Alignment-Software BLAST des *National Center for Biotechnology Information* (s. 2.16.7) konnte die ermittelte Sequenz mit der korrespondierenden genomischen Sequenz des Gens verglichen werden. Hieraus ergab sich, dass das Gen aus 5 Exons aufgebaut ist (s. Abbildung 3.2.3-3 B), wobei das erste Exon 330 nt umfasst und 1513 nt stromaufwärts vor dem Start-Codon liegt.

Das Zusammensetzen der Sequenz des CT34515 (*Dm* HA-CI II) Rezeptorklons mit den entsprechenden Sequenzen aus der 5'- und 3'-RACE ergab eine mRNA Länge von 1760 nt. Die ebenfalls vom *Drosophila* Genom Projekt FlyBase vorhergesagte Länge der mRNA für dieses Gen betrug nur 1164 nt. Eine genaue Analyse der ermittelten Sequenz ergab, dass es sich bei den Nukleotiden 1-316 um die 5'- untranslatierte Region (UTR) handelt und bei den Nukleotiden 1598-1760 um die 3'- UTR (s. Abb. 3.2.3-2). Auch hier wurde ein Sequenzvergleich mit der korrespondierenden genomischen Sequenz durchgeführt. Die hieraus resultierende genomische Organisation ergab, dass es aus 7 Exons aufgebaut ist (s. Abbildung 3.2.3-3 B). Das erste Exon umfasst dabei 110nt und liegt 295nt stromaufwärts von dem Start-Codon.



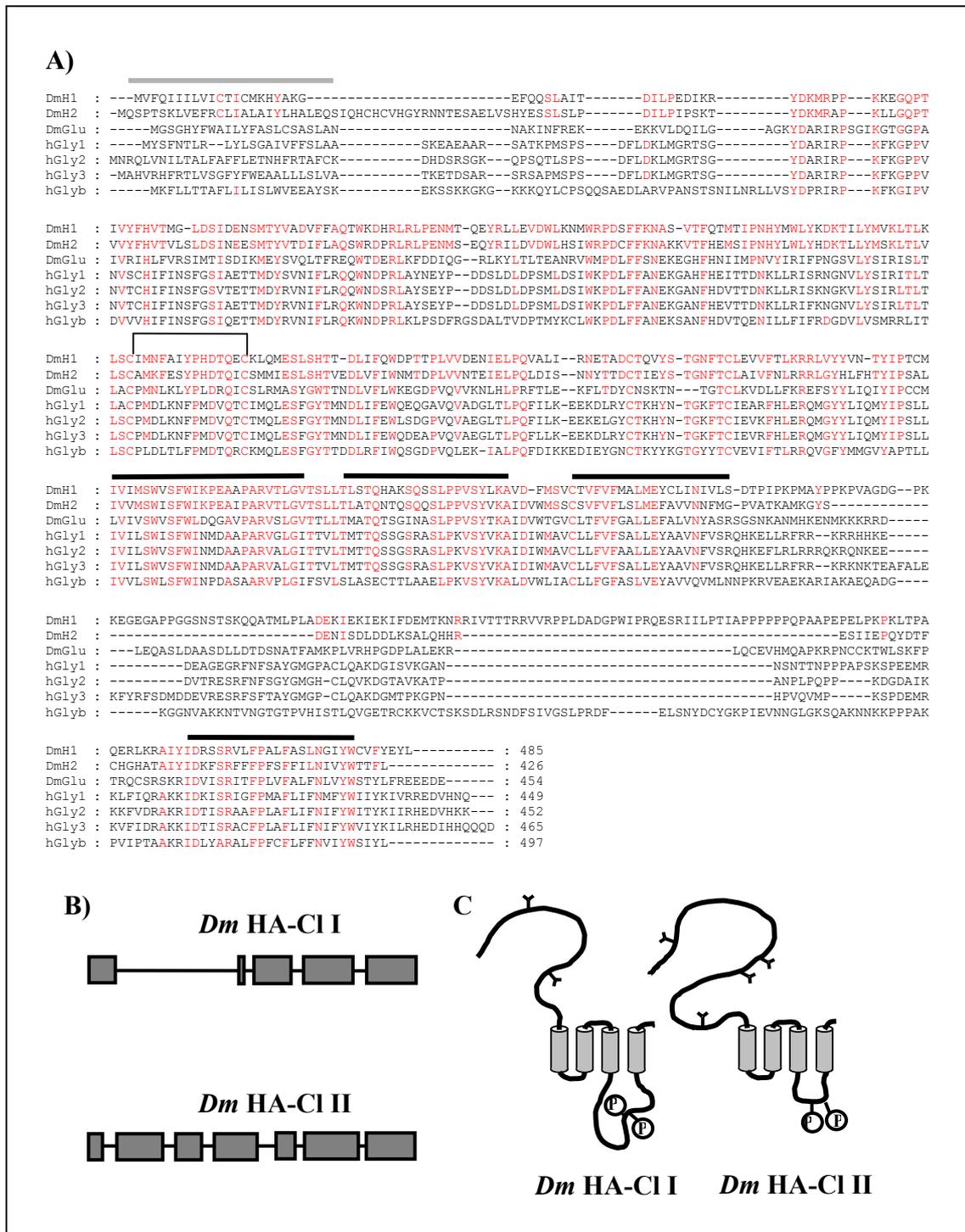
Abbildung 3.2.3-2: Nuklein- und Aminosäuresequenz des CT34515 (*Dm* HA-CI II) Gens. In Abbildung **A** ist die gesamte transkribierte Nukleinsäuresequenz des CT34515 Gens dargestellt. Der Translationsstart wurde durch das Start-Triplett (atg) rot markiert und liegt bei 317 nt. Stromaufwärts davon liegt die 316 nt umfassende 5'-UTR die durch eine kursive Schreibweise markiert wurde. Das Stop-Triplett (tga) befindet sich bei 1597 nt und wurde blau markiert. Bei der stromabwärts liegenden Sequenz handelt es sich um die 3'-UTR, die ebenfalls durch eine kursive Schreibweise gekennzeichnet wurde. In Abbildung **B** ist die aus der Nukleinsäuresequenz abgeleitete Aminosäuresequenz des CT34515 Gens abgebildet, die 426 Aminosäuren umfasst.

Das CT22815 Gen verfügt über ein offenes Leseraster, das für 485 Aminosäuren kodiert, wohingegen das offene Leseraster des CT34515 Gens für 426 Aminosäuren kodiert. Die auf der ermittelten Nukleotid-Sequenz basierenden Vorhersagen über die Topologie der beiden potentiellen Histamin-gesteuerten Chlorid-Kanal Untereinheiten zeigen alle typischen Merkmale der Familie der Liganden-gesteuerten Chlorid-Kanäle (s. Abbildung 3.2.3-3 C).

Die abgeleiteten Aminosäuresequenzen beider Untereinheiten wurden mit den Aminosäuresequenzen der humanen Glycin-Rezeptoren sowie der Aminosäuresequenz des Glutamat-gesteuerten Chlorid-Kanals von *Drosophila* (GluCl) mit Hilfe des BioEdit Programmpakets (<http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit.html>) verglichen. Hierbei bestand mit 42% die größte Sequenzhomologie zwischen den beiden potentiellen Untereinheiten des Histamin-gesteuerten Chlorid-Kanals *Dm* HA-Cl I (CT22815) und *Dm* HA-Cl II (CT34515).

Die beiden vollständigen Sequenzen der potentiellen Histamin-gesteuerten Chlorid-Kanal Untereinheiten wurden in der Genbank des *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) unter der Bezeichnung *Dm* HA-Cl I für das CT22815 Gen und *Dm* HA-Cl II für das CT34515 Gen unter den Nummern AF411340 (= *Dm* HA-Cl I) und AF467953 (= *Dm* HA-Cl II) veröffentlicht.

Abbildung 3.2.3-3 (nächste Seite): Abgeleitete Aminosäuresequenz, genomische Organisation und vorhergesagte Topologie der beiden potentiellen Untereinheiten des Histamin-gesteuerten Chlorid-Kanals von *Drosophila*. In Abbildung A) ist in Vergleich der Aminosäuresequenzen der *Dm* HA-Cl I und II (=DmH1 und DmH2) Untereinheiten von *Drosophila* mit den Untereinheiten humaner Glycin Rezeptoren (hGly), sowie dem Glutamat-gesteuerten Chlorid-Kanal von *Drosophila melanogaster* (DmGlu) dargestellt. Die homologen Aminosäuresequenzen der Untereinheiten des Histamin-gesteuerten Chlorid-Kanals zu den anderen Proteinen sind durch rote Buchstaben kenntlich gemacht. Die potentiellen Transmembrandomänen sind durch einen schwarzen Balken oberhalb der Sequenz gekennzeichnet, die Signalsequenz durch einen grauen Balken und die N-terminale Cys-Cys loop Domäne durch eine Klammer. In Abbildung B) ist die genomische Organisation beider Gene dargestellt. Das Gen CT22815 (*Dm* HA-Cl I) ist aus 5 Exons, das Gen CT34515 (*Dm* HA-Cl II) aus 7 Exons aufgebaut. Die grauen Kästen in der Abb. stellen die Exons dar, die Linien die Introns. In Abbildung C) ist die sich aus der Sequenz ergebende mutmaßliche Topologie der beiden Kanal Untereinheiten graphisch dargestellt. Die grauen Zylinder kennzeichnen die potentiellen Transmembrandomänen, ein eingekreistes P die Konsensussequenzen für eine Phosphorylierung durch die Proteinkinase C, ein Y steht für potentielle N-Glykosylierungsstellen.



3.2.4 Herstellung und Analyse transgener Promotor-GAL4 *Drosophila*-Linien

Für eine exakte Ermittlung des räumlichen und zeitlichen Expressionsmusters der beiden untersuchten potentiellen Histamin-gesteuerten Chlorid-Kanal Untereinheiten

Dm HA-CI I und *Dm* HA-CI II war die Erstellung von Promotor-GAL4-Fusionsvektoren unumgänglich. Bei dem für die Herstellung der Fusionsvektoren verwendeten Plasmid handelt es sich um den pPTGAL4 Vektor (Sharma et al., 2002), der zu den P-Element Vektoren gehört (vergleiche 2.18) und für die Herstellung transgener Tiere durch Mikroinjektion in die Embryonen von *D. melanogaster* genutzt werden kann (s. 2.18.2). Die hieraus resultierenden transgenen Promotor-GAL4 Tiere exprimieren an den Stellen, wo der Rezeptor natürlicherweise exprimiert wird, zusätzlich den Transkriptionsfaktor GAL4. Durch eine Kreuzung dieser Fliegen mit einem transgenen UAS GFP Fliegenstamm kann sowohl das räumliche als auch das zeitliche Expressionsmuster dieser Rezeptoren visualisiert werden (vergleiche 3.5.2).

Zu diesem Zweck wurde das vektorständige GAL4 Gen des Plasmids pPTGAL4 unter die Kontrolle des *Dm* HA-CI I bzw. II Promotors gestellt. Hierfür wurden die Promotorsequenzen beider Gene mit den Oligonukleotiden CT22815 Prom. Gal und CT34515 Prom. Gal mittels einer PCR aus der genomischen DNA von *Drosophila* amplifiziert (s. 2.9.1 und 2.12, sowie Abbildung 3.2.4-1).

Da das *Dm* HA-CI I Gen über ein 330nt großes Exon unbekannter Funktion in der 5'-UTR verfügt (s.3.2.3), wurden für die Amplifizierung der Promotorregion zwei verschiedene Gegensinn-Oligonukleotide verwendet (s. 2.9.1). Das Gegensinn I Oligonukleotid setzte direkt vor dem Start-Codon auf und erzeugte zusammen mit dem Sinn-Oligonukleotid ein 5kbp großes Amplifikat in der PCR. Das Gegensinn II Oligonukleotid setzte erst 1867nt stromaufwärts von dem Start-Codon auf und erzeugte in der PCR mit dem Sinn-Oligonukleotid ein 3157bp großes Amplifikat, das das erste Exon nicht mit einschließt. Die Gegensinn-Oligonukleotide für die CT34515 (*Dm* HA-CI II) Promotor Region (s. 2.9.1) sind so gewählt worden, dass das Gegensinn I Oligonukleotid ebenfalls direkt vor dem Start-Codon aufsetzte und zusammen mit dem Sinn- Oligonukleotid ein 5kbp großes Amplifikat erzeugte. Da das Start-Codon dieses Gens jedoch nicht am Anfang dieses Exons liegt, sondern 209nt stromabwärts (s. 3.2.3) ist das Gegensinn II Oligonukleotid so gewählt worden das es 239nt stromaufwärts aufsetzte und mit dem Sinn-Oligonukleotid in der PCR ein 4761bp großes Amplifikat erzeugte.

Die Amplifikate wurden zur Überprüfung der Reaktion auf ein 1%iges Agarosegel aufgetragen und elektrophoretisch getrennt. Alle Amplifikate wiesen dabei die erwartete Länge auf und wurden zur Vorbereitung auf die Ligation in den pPTGAL4 Vektor einem Restriktionsverdau mit den Enzymen Kpn I/Not I unterzogen. Das Plasmid pPTGAL4 wurde ebenfalls in Vorbereitung auf die Ligation einem Kreuzverdau mit

den Restriktionsenzymen Kpn I/Not I, sowie einer anschließenden Dephosphorylierung unterzogen (s. 2.16). Alle Ansätze wurden anschließend mit dem Jetquick PCR Purification Spin Kit gereinigt, erneut mit Hilfe eines 1%igen Agarosegels kontrolliert und für die Ligation eingesetzt. Nach Beendigung der Reaktion folgte eine Transformation in DH5 α Zellen, sowie eine Plasmid-DNA-Präparation (s. 2.16).

Die isolierten Plasmide wurden mittels eines Verdau mit den Enzymen Kpn I/Not I und einer anschließenden Trennung in einem 1%igen Agarosegel dahingehend überprüft, ob die Insertion der jeweiligen Promotorregion in den Vektor, erfolgreich war (s. 2.16). Nur bei den in den pPTGAL4 Vektor klonierten Amplifikaten der mit den Gegensinn II Oligonukleotiden erzeugten Sequenzen beider Gene konnten positive Klone detektiert werden.

Von den Bakterienkulturen, welche die positiven Klone enthielten, wurde Plasmid-DNA-Präparationen gemacht und die Plasmide für die anschließende Mikroinjektion in das Theodor-Boveri Institut für Biowissenschaften an der Universität Würzburg zu Händen von Herrn Prof. Heisenberg geschickt.

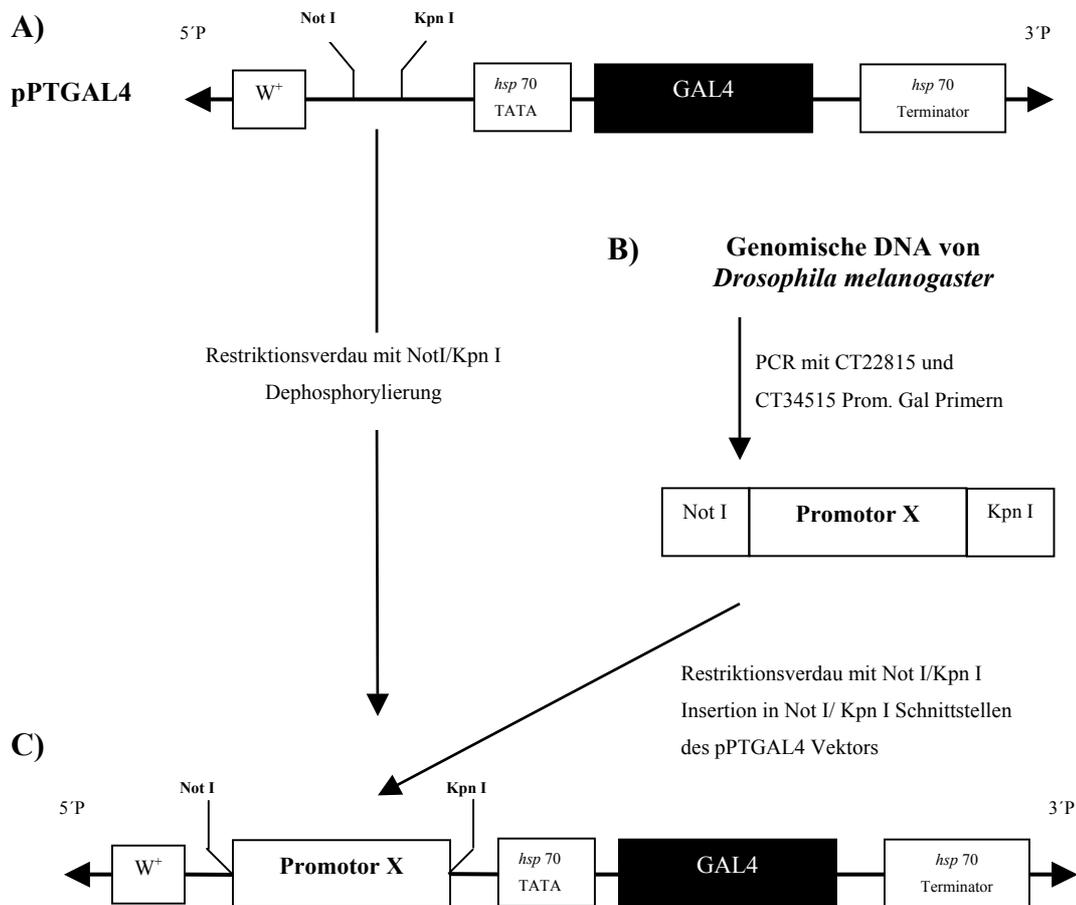


Abbildung 3.2.4-1: Schematische Darstellung der Erzeugung von Promotor-GAL4-Fusionsvektoren. **A)** Teildarstellung des pPTGAL4 Vektors mit der GAL4 kodierenden Sequenz (=GAL4) zwischen einem minimalen Promotor (=hsp 70 TATA) und einer terminalen Transkriptionssequenz (=hsp 70 Terminator) stromabwärts von den Erkennungssequenzen der Restriktionsenzyme Not I und Kpn I. Zusätzlich trägt der Vektor das Markergen *white* (W^+). Der Vektor wurde in Vorbereitung auf die anschließende Ligation einem Kreuzverdau mit den Enzymen Not I/Kpn I und einer anschließenden Dephosphorylierung unterzogen. **B)** Amplifikation der Promotorsequenzen (=Promotor X) mit den CT22815 und CT34515 Prom. Gal Sinn- und Gegensinn- I + II Oligonukleotiden aus der genomischen DNA. Die in Kästen dargestellten Not I und Kpn I Symbole kennzeichnen die mit Hilfe der Oligonukleotide angefügten Erkennungssequenzen der entsprechenden Restriktionsenzyme. Die Amplifikate wurden mit den Enzymen Not I/Kpn I verdaut und für die Ligation in den pPTGAL4 Vektor eingesetzt. **C)** Schematische Darstellung des Promotor-GAL4-Fusionsvektors. Die Not I/Kpn I verdaute Promotorsequenz (=Promotor X) befindet sich zwischen den NotI/Kpn I Schnittstellen des pPTGAL4 Vektors.

Die Erzeugung einer transgenen Linie durch A. Thum aus der Arbeitsgruppe von Prof. Heisenberg war bis zum Abschluss der Arbeit für die *Dm* HA-CI II Untereinheit gelungen. Zum Zweck einer Visualisierung der *Dm* HA-CI II exprimierenden Zellen von *D. melanogaster* wurden die Fliegen der transgenen Promotor-GAL4 Linie mit Fliegen einer UAS-GFP Linie gekreuzt (vergleiche GAL4/UAS System 3.5.2). Hierdurch wird in Zellen, die natürlicherweise unter der Kontrolle des *Dm* HA-CI II Promotors das Protein der *Dm* HA-CI II Untereinheit exprimieren zusätzlich das grün fluoreszierende Protein GFP exprimiert. Bei einer ersten Analyse an Agarose-Präparaten der Köpfe der aus diesen Kreuzungen resultierenden Tiere an einem konfokalen Laserscannermikroskop waren sowohl in der Lamina als auch in der Medulla Signale zu detektieren (s. Abbildung 3.2.4-2).

Es zeigte sich, dass die durch den *Dm* HA-CI II Promotor aktivierte Expression des GFP mittels des GAL4/UAS Systems vorwiegend in den Lamina Monopolarzellen (LMC) stattfand, dessen Axone in unterschiedlichen Schichten des Medulla Neuropils enden (s. Abb. 3.2.4-2 A+B). Aber auch in vereinzelt Somata der Medulla konnte eine Expression nachgewiesen werden.

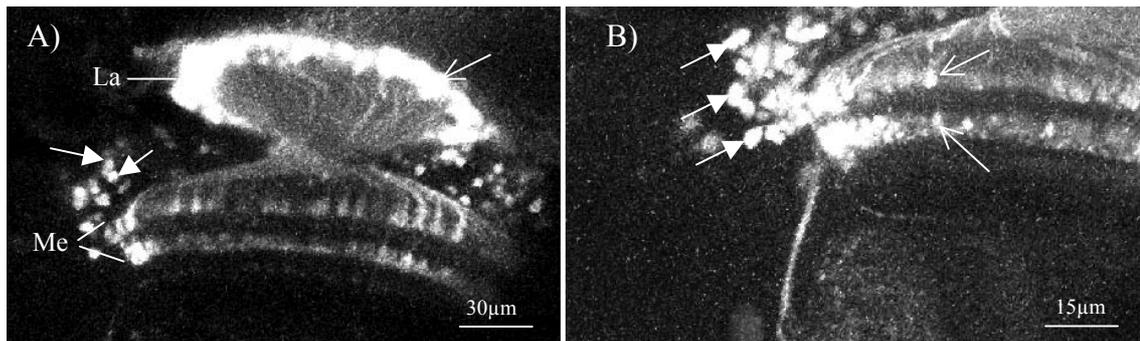


Abbildung 3.2.4-2: Nachweis der Expression der *Dm* HA-Cl II Untereinheit in den optischen Loben von *D. melanogaster*. Der Nachweis erfolgte durch die Visualisierung der *Dm* HA-Cl II exprimierenden Zellen mittels des GAL4/UAS Systems (s.o.) durch ein konfokales Laserscannermikroskop an Agaroseschnitten des Kopfes von Fliegen der transgenen Promotor-GAL4 *Dm* HA-Cl II / UAS-GFP Linie. Die Aufnahmen wurden von A. Thum (AG Heisenberg, Universität Würzburg) gemacht. Abb. **A**) zeigt einen Ausschnitt aus den optischen Loben, zu sehen sind die Bereiche Lamina (La) und Medulla (Me). In den Somata der Lamina Monopolarzellen ist eine starke Färbung zu erkennen (offener Pfeil), von denen die Axone (schwach gefärbt) bis in das Medulla-Neuropil ziehen, wo sie in zwei verschiedenen Bereichen terminieren. Auch im Medulla-Cortex sind vereinzelte Somata gefärbt (geschlossenen Pfeile). Abb. **B**) zeigt eine Ausschnittsvergrößerung aus einem Bereich der Medulla. Zu erkennen sind die gefärbten Somata des Medulla-Cortex (geschlossenen Pfeile), sowie die Endigungen der Lamina Monopolarzellen innerhalb zweier Bereiche im Medulla-Neuropil (offene Pfeile).

Dies stimmt mit den Ergebnissen aus den Untersuchungen zur Zellspezifität mittels *in-situ* Hybridisierungen überein, nach denen dieses Gen im visuellen System in den postsynaptischen Zellen der Photorezeptoren exprimiert wird (s. 3.2.2). Eine genauere Analyse der zu detektierenden Zellen in den unterschiedlichen Schichten des Medulla-Neuropils lässt vermuten, dass es sich hierbei um die Endigungen der Axone der Lamina Monopolarzellen L1-2 handelt. Dies erhärtet weiter die These, dass die beiden Untereinheiten des Histamin-gesteuerten Chlorid-Kanals *Dm* HA-Cl I und II von *D. melanogaster* ein weitgehend identisches Expressionsmuster aufweisen.

Anhand dieser ersten Analyse konnte gezeigt werden, dass es gelungen ist eine funktionelle transgene Promotor-GAL4 Linie für das *Dm* HA-Cl II Gen zu erzeugen. Diese Linie exprimiert den Transkriptionsfaktor GAL4 nur in jenen Zellen, die natürlicherweise das *Dm* HA-Cl II Gen exprimieren und eröffnet zukünftig eine Vielzahl weiterer Möglichkeiten für die Analyse der entwicklungs- und zellspezifischen Expression.

3.3 Entwicklungsspezifische Expression der Liganden-gesteuerten Chlorid-Kanäle von *D. melanogaster*

Die Analyse der entwicklungspezifischen Expressionsmuster der Liganden-gesteuerten Chlorid-Kanäle ermöglicht eine Vielzahl von Rückschlüssen auf ihre Funktionen und Interaktionspartner. Einzelne Untereinheiten, die *in vivo* gemeinsam einen funktionellen Chlorid-Kanal bilden, erfordern auch eine zeitgleiche Expression.

Für die Untersuchung der Expression der Liganden-gesteuerten Chlorid-Kanal Untereinheiten in den einzelnen Entwicklungsstadien wurden die Gene CT21430, Lcch3, Grd, GluCl, Rdl sowie die beiden Untereinheiten des Histamin-gesteuerten Chlorid-Kanals *Dm* HA-Cl I und II herangezogen. Die Untersuchungen erfolgten mittels Northern Blot Analysen an 0, 4, 8, 12, 16, 20 und 24 Stunden alten Embryonen sowie an den Larvalstadien 1-3, Puppen und adulten Tieren (s. 2.15). Zu diesem Zweck wurden 10µg gesamt-RNA der einzelnen Entwicklungsstadien in einem RNA Agarosegel elektrophoretisch getrennt. Die anschließende Kontrolle des Ethidiumbromid Gels mittels eines Transilluminators ergab eine gut sichtbare Doppelbande von ~2kb, bei der es sich um die 18S ribosomale RNA von *Drosophila melanogaster* handelt. Obwohl die RNA Menge der 24 Stunden Embryonen im Gel geringer war, lag diese jedoch nicht unter der Nachweisgrenze (s. Abbildung 3.3-1, EtBr. Färbung). Die RNA wurde auf eine Nylon Membran transferiert und die mRNA der zu untersuchenden Gene mit sequenzspezifischen radioaktiv markierten Sonden detektiert (s. 2.15). Die geringere RNA Menge der 24 Stunden Embryonen wurde bei der Analyse der Signalstärke berücksichtigt.

Bei der Hybridisierung mit der *Dm* HA-Cl I genspezifischen Sonde konnten auch bei einer Exposition des Röntgenfilms von mehreren Tagen keine Signale detektiert werden. Da aus den vorausgehenden Analysen des Expressionsmusters dieser Kanal Untereinheit (s. 3.2.1 und 3.2.2) bereits bekannt ist, dass sie bei den adulten Tieren nur in den Lamina Monopolarzellen L1-3, sowie weniger Zellen in der Medulla, dem Thorakalganglion und den postsynaptischen Ocellarzellen exprimiert wird, ist davon auszugehen, dass die Menge der mRNA in den gesamt-RNA Extrakten der unterschiedlichen Entwicklungsstadien unter der Nachweisgrenze dieses Systems lag. Es kann somit keine Aussage zu der entwicklungspezifischen Expression dieses Gens gemacht werden.

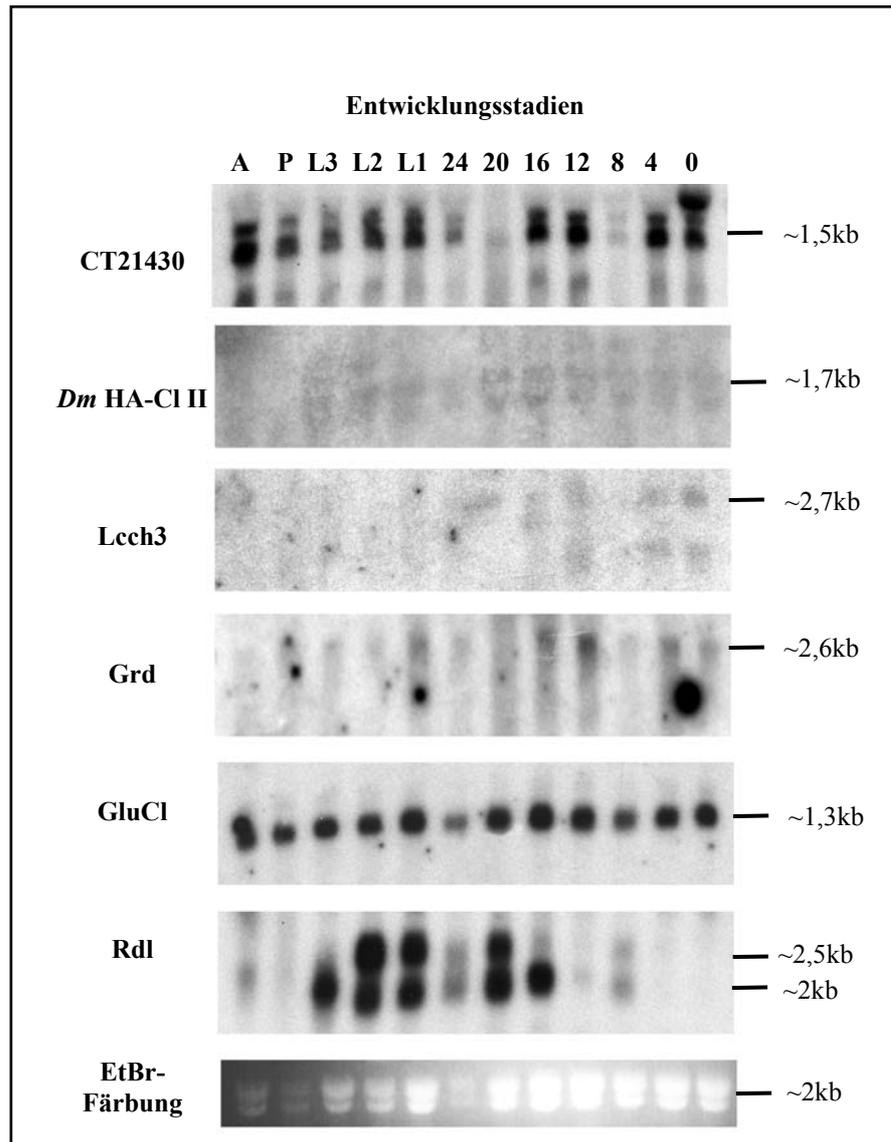


Abbildung 3.3-1: Analyse der entwicklungsspezifischen Expression der Liganden-gesteuerten Chlorid-Kanäle mittels Northern Blot. Die Transkripte der untersuchten Liganden-gesteuerten Chlorid-Kanäle (links in der Abb.) wurden in verschiedenen Entwicklungsstadien (oberhalb angegeben) mittels Northern Blot detektiert. Dazu wurden je 10µg gesamt-RNA der verschiedenen Entwicklungsstadien aufgetragen. Die Detektion erfolgte mit genspezifischen radioaktiv markierten Sonden. Rechts im Bild sind die Größen der detektierten RNAs in kb wiedergegeben. Als Ladekontrolle ist die 18S rRNA im Gel mittels einer Ethidiumbromid (EtBr) Färbung des Gels dargestellt worden. Die Abnahme der Leuchtintensität der Banden von rechts nach links ist auf eine ungleichmäßige Ethidiumbromid Verteilung im Gel zurückzuführen. A = adulte Fliegen, P = Pupen, L1-L3 = Larvalstadien 1-3, 0-24 = Alter der Embryonen in Stunden, GluCl = Glutamat-gesteuerter Cl-Kanal, Grd = Glycin Rezeptor, Lcch3 = *Ligand-gated chloride channel homolog 3*, Rdl = *Resistant to dieldrin*, Dm HA-Cl II = Histamin-gesteuerter Chlorid-Kanal Untereinheit II

Für das CT21430 Gen konnten im Northern Blot für alle Entwicklungsstadien Hybridisierungen mit der Sonde nachgewiesen werden. Überall waren zwei Signale detektierbar, die eine Größe von ~1500 nt aufwiesen. Dies entspricht der aus der Länge der Aminosäuresequenz (524 aa) resultierenden mRNA von 1572 nt, die der FlyBase Datenbank (<http://flybase.bio.indiana.edu/>) zu entnehmen ist. Es kann somit davon ausgegangen werden das es sich bei den detektierten Signalen wirklich um die Hybridisierung mit der mRNA des CT21430 Gens handelt. Da es sich bei den beiden Signalen um distinkte Banden handelt ist eine Degradation der mRNA nahezu auszuschließen, da in diesem Fall nur die mRNA als klare distinkte Bande zu erkennen wäre und die degradierte mRNA sich wahrscheinlich als „Schmier“ darstellen würde. Es ist daher davon auszugehen, dass es sich bei den beiden Banden um zwei Spleißvarianten des einen Gens handelt. Bei der RNA des 0 Stunden Embryos ist zusätzlich noch eine dritte Bande erkennbar, die sich oberhalb der 1500 nt Banden befindet. Möglicherweise handelt es sich dabei um eine dritte Spleißvariante. Die Signale in den Embryonalen Entwicklungsstadien nach 8 und nach 20 Stunden sind schwächer, was auf eine verringerte Transkription des Gens zu diesem Zeitpunkt schließen lässt. Das schwächere Signal bei dem 24 Stunden Embryonalstadium ist auf die geringere RNA Menge im Gel zurückzuführen (s. oben).

Bei der Hybridisierung der für das *Dm* HA-Cl II Gen spezifischen Sonde im Northern Blot konnten nur in den embryonalen Entwicklungsstadien schwache Signale detektiert werden. Diese Signale waren bei dem 0 Stunden Embryonalstadium kaum nachzuweisen, nahmen dann aber bis zu dem 20 Stunden Embryonalstadium kontinuierlich zu. Die geringere Signalstärke des 24 Std. Embryonalstadiums im Vergleich zu dem 20 Std. Stadium ist auf die geringere RNA Menge im Gel zurückzuführen. Es waren zwei Banden ähnlicher Größe zu erkennen, mit einer Länge von ungefähr 1700 nt. Dies korrelierte mit der für die unter 3.2.3 ermittelten Länge der mRNA von 1760 nt für dieses Gen, so das auch hier davon auszugehen ist, dass es sich um eine spezifische Hybridisierung der Sonde mit der mRNA des Gens handelte. Auch hier ist aus den oben aufgeführten Gründen davon auszugehen, dass es sich nicht um eine Degradation der mRNA sondern um zwei Spleißvarianten des Gens handelt. Für die RNA aus Larvalstadien sowie aus Puppen und adulten Fliegen konnte keine Hybridisierung der Sonden auf dem Blot nachgewiesen werden. Bei den unter 3.2 durchgeführten Untersuchungen zur Identifizierung der Histamin-gekoppelten Chlorid-Kanäle wurde jedoch gezeigt, dass diese Kanal Untereinheit durchaus in adulten Tieren exprimiert wird. Die Expression findet allerdings nur in wenigen Zellen vorwiegend des

visuellen Systems statt und liegt daher bei dem hier durchgeführten Northern Blot unter der Nachweisgrenze.

Gemäß den Ergebnissen des Northern-Blots wird das *Lcch3* Gen nur in den ersten 20 Stunden exprimiert, wobei die Expression bei dem 8 Stunden alten Embryo sehr schwach ist. Es wurden zwei Transkripte unterschiedlicher Größe detektiert, bei der das größere Transkript ~2700 nt umfasste und damit ungefähr der in der FlyBase Datenbank angegebenen Größe der mRNA dieses Gens von 2729 nt (AY060660) entsprach. Das kleinere Transkript wies eine ungefähre Differenz von 500 nt auf und war nur in den frühen Embryonalstadien (0, 4 und 12 Stunden) vorzufinden. Aus oben genannten Gründen ist auch hier davon auszugehen, dass es sich dabei um eine Spleißvariante handelt, die offensichtlich nur in den genannten Entwicklungsstadien in einem nachweisbaren Maß exprimiert wird. Aufgrund der Ergebnisse der Expressionsanalysen mittels RT-PCR zur Identifizierung des Histamin-gekoppelten Chlorid-Kanals (s. 3.2.1) kann davon ausgegangen werden, dass das *Lcch3* Gen (= CT38300) in adulten Tieren exprimiert wird, da es bei diesen Analysen in den Geweben des Nervensystems adulter Tiere nachgewiesen werden konnte. Folglich ist auch hier davon auszugehen, dass die geringe Menge an mRNA dieses Gens in dem gesamt RNA Extrakt der adulten Tiere für einen Nachweis mit diesem System nicht ausreichend war.

Bei den Ergebnissen der *Grd* Transkription zeigte sich ein ähnliches entwicklungspezifisches Expressionsmuster wie bei dem CT21430 Gen. Auch dieses Gen wird in allen Entwicklungsstadien transkribiert, jedoch ist die Transkriptionsrate im Gegensatz zu dem CT21430 Gen nicht stets gleich groß und nimmt ab dem ersten Larvalstadium bis zu den adulten Tieren kontinuierlich ab. In allen Stadien ließ sich ein Transkript von ~2,6 kb detektieren, was mit der mRNA Länge des *Grd* Gens von 2635 nt (X78349, in der FlyBase Datenbank) korreliert.

Das Transkript des *GluCl* Gens konnte in allen Entwicklungsstadien nachgewiesen werden. Es handelte sich hierbei um ein ~1,3kb langes Transkript, dass der Länge der aus der Aminosäuresequenz von 456 aa abgeleiteten mRNA Länge von 1368nt entspricht. Die detektierten Signale wiesen dabei in allen Stadien eine sehr hohe Intensität auf, was darauf schließen lässt das dieses Gen nicht entwicklungspezifisch reguliert wird.

Bei der Hybridisierung mit der *Rdl* genspezifischen Sonde ließen sich von den Entwicklungsstadien der 20 Stunden alten Embryonen bis zu den L2 Larven zwei Signale von Transkripten detektieren, die einer Größe von ~2 und ~2,5kb entsprachen. Zusätzlich wies noch der 8 Stunden Embryo diese Signale auf. Das Transkript von ~2kb

konnte außerdem noch in den 12 und 16 Stunden alten Embryonen sowie bei den L3 Larven detektiert werden. Die Größe dieses Transkripts korreliert mit der sich aus der Länge der Aminosäuresequenz von 606 aa ergebende mRNA Länge von 1818 nt. Die Identität des größeren Transkripts ließ sich nicht eindeutig bestimmen, jedoch ist das Vorkommen von alternativen Spleißen bei dem Rdl Gen bereits bekannt (French-Constant und Rocheleau, 1993), so dass es sich hierbei sehr wahrscheinlich um eine Spleißvariante handelt.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass für das GluCl Gen bei der hier verwendeten Nachweismethode keine entwicklungspezifische Expression festgestellt werden konnte, da bei allen Entwicklungsstadien annähernd gleich starke Signale zu detektieren waren. Die Transkripte der beiden Gene CT21430 und Grd ließen sich ebenfalls in allen Entwicklungsstadien nachweisen, jedoch ist hier eine Varianz in der Intensität der detektierten Signale zu erkennen, so dass man von einer entwicklungspezifischen Regulation der Transkriptionsrate sprechen kann. Die Transkripte der Gene *Dm* HA-Cl II, *Lcch3* und *Rdl* konnten nur in einer begrenzten Anzahl an Stadien nachgewiesen werden, so dass hier eine entwicklungspezifische Expression wahrscheinlich erscheint.

3.4 Gewebespezifische Expression der Liganden-gesteuerten Chlorid-Kanäle von *D. melanogaster*

Für eine Komplementierung der Ergebnisse zur Untersuchung des spezifischen Expressionsmusters der Familie der Liganden-gesteuerten Chlorid-Kanäle von *Drosophila* wurde zu der entwicklungspezifischen- auch die gewebespezifische Expression der einzelnen Untereinheiten dieser Familie aufgeklärt. Eine erste Analyse erfolgte bereits bei den zur Identifikation der Histamin-gekoppelten Chlorid-Kanal Untereinheiten durchgeführten RT-PCR Experimenten an gewebespezifischer cDNA adulter *D. melanogaster* (s. 2.14 und 3.2.1). Aus den Ergebnissen dieser Untersuchungen ergab sich eine erste Einteilung der hier untersuchten 10 Transkripte in vier Gruppen, bei welcher sich jedoch das CT23391 Transkript nicht einordnen ließ, da es in keinem der untersuchten Gewebe nachweisbar war (s. 3.2.1). Für eine weitergehende Analyse dieser Gruppen wurden einzelne Mitglieder mittels einer *in-situ* Hybridisierung auf die Zellspezifität ihrer Expression untersucht.

Die Hybridisierungen wurden mit Digoxigenin-markierten Sinn und Gegensinn cRNA-Sonden an 10µm dicken Kopfschnitten von *Drosophila melanogaster* durchgeführt (s. 2.17). Die Herstellung der sequenzspezifischen cRNA-Sonden für die jeweiligen Transkripte sowie die anschließende Qualitätskontrolle mittels eines Dot-Blots erfolgte wie bereits unter 3.2.2 für die Transkripte der Untereinheiten *Dm* HA-Cl I und *Dm* HA-CL II beschrieben. Die Sinn-cRNA Sonden fungierten als Negativkontrolle, da diese Sonden nicht komplementär zur mRNA der Gene sind und somit keine spezifische Hybridisierung erfolgen konnte. Sofern bei der Hybridisierung mit der Sinn-cRNA Sonde keine Signale zu detektieren waren, konnte davon ausgegangen werden das es sich bei den Signalen die bei der Hybridisierung mit der Gegensinn-cRNA Sonde auftraten um spezifische Signale handelte. Im Folgenden sind nur *in-situ* Hybridisierungen aufgeführt die spezifische Signale aufwiesen, die Negativkontrollen wurden nicht abgebildet.

Die erste der oben genannten vier Gruppen wird von den Genen CT19189 und CT23187 gebildet, die eine ubiquitäre Verteilung im Nervensystem und in peripheren Geweben zeigt. Für beide Gene konnten in der RT-PCR bei allen untersuchten Geweben Amplifikate im Agarosegel nachgewiesen werden (s. Abb. 3.4-1 A), so dass bei dieser Untersuchung keine Gewebespezifität festgestellt werden konnte. Eine genauere Analyse des Expressionsmusters mittels einer *in-situ* Hybridisierung wurde für das Gen CT19189 durchgeführt.

Die Hybridisierung mit der Gegensinn-cRNA Sonde zeigte Signale in allen Somata des Nervensystems sowie in den Photorezeptorzellen und dem Fettkörper (s. Abb. 3.4-1 B). Die in Abbildung B zu erkennende Färbung der Kornea ist auf einen unspezifischen Farbniederschlag zurückzuführen der sowohl bei den Hybridisierungen mit den Sinn- als auch mit den Gegensinn-cRNA Sonden auftrat und somit kein spezifisches Signal darstellt.

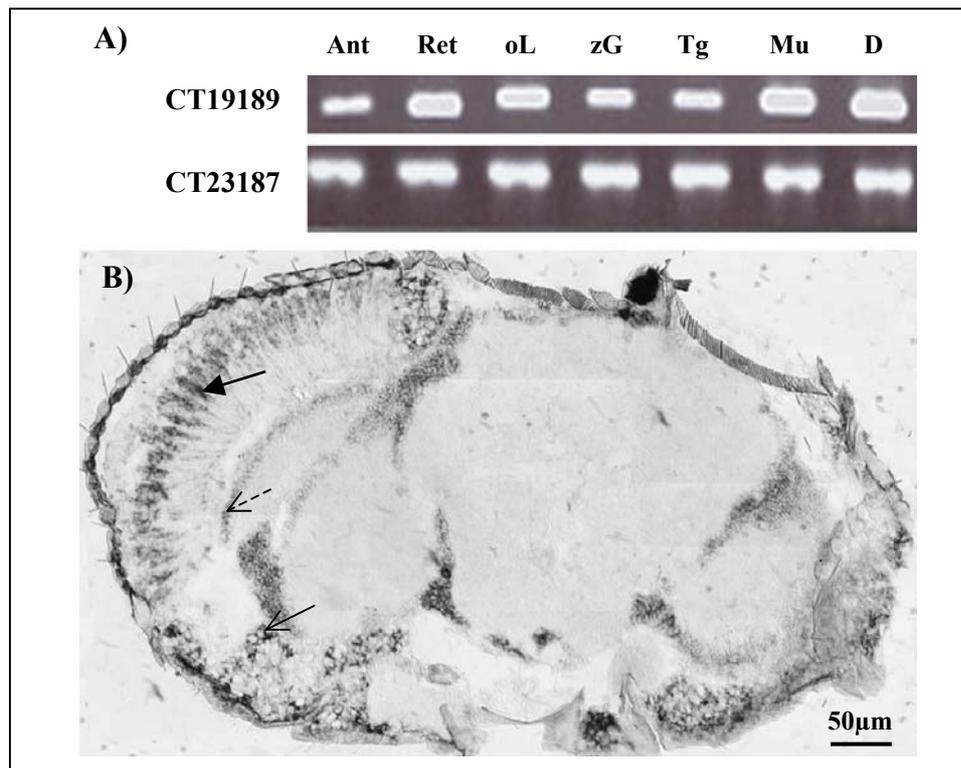


Abbildung 3.4-1: Analyse der gewebespezifischen Expression der Gene CT19189 und CT23187 mittels RT-PCR und *in-situ* Hybridisierung (CT19189). In Abbildung A) ist die ubiquitäre Verteilung der beiden untersuchten Gene in der RT-PCR dargestellt. Die RT-PCR wurde an der cDNA der Gewebe Antennen (Ant), Retinae (Ret), optischen Loben (oL), zentral Gehirn (zG), Thorakalganglion (Tg), Muskel (Mu) und Darm (D) mit genspezifischen Oligonukleotiden durchgeführt. Das Ergebnis ist in einem 1%igen Agarosegel durch eine Ethidiumbromid Färbung dargestellt. Die *in-situ* Hybridisierung in Abbildung B) erfolgte mit einer Gegensinn Digoxigenen-markierten cRNA Sonde für das CT19189 Gen an einem 10µm dicken Frontalschnitt des Kopfes von *D. melanogaster*. Die Visualisierung der Hybridisierungssignale erfolgte mittels einer an anti-Digoxigenin Antikörper gekoppelten alkalischen Phosphatase durch eine Farbreaktion mit den Substraten NBT und BCIP. Die Transkription der mRNA in allen Somata der Neurone (unterbrochener Pfeil) des Gehirns, sowie in den Photorezeptorzellen (geschlossener Pfeil) und dem Fettkörper (offener Pfeil) konnte nachgewiesen werden.

Die ubiquitäre Expression CT19189 Gens, die bereits bei der Analyse mittels der gewebespezifischen RT-PCR zu erkennen war, konnte somit durch die *in-situ* Hybridisierung verifiziert werden. Die gezeigte Expression des Gens in der Retina (s. Abbildung 3.4-1 A) lies sich mit Hilfe der *in-situ* Hybridisierung auf die Photorezeptorzellen eingrenzen.

Der zweiten Gruppe gehören die Gene CT5895, CT25610 und Lcch3 an. Alle drei Gene zeigten in den RT-PCR Experimenten an gewebespezifischer cDNA adulter *D. melanogaster* ein identisches Expressionsmuster, dass sich ausschließlich auf die

Gewebe des Nervensystems (optische Loben, Zentralgehirn und Thorakalganglion) erstreckt. In nicht neuronalen Geweben wie Darm, Muskel, Retina und Antennen konnte keine Expression ermittelt werden (s. Abbildung 3.4-2 A). Für eine Verifizierung dieser Ergebnisse wurde exemplarisch für das CT5896 Gen eine *in-situ* Hybridisierungen durchgeführt.

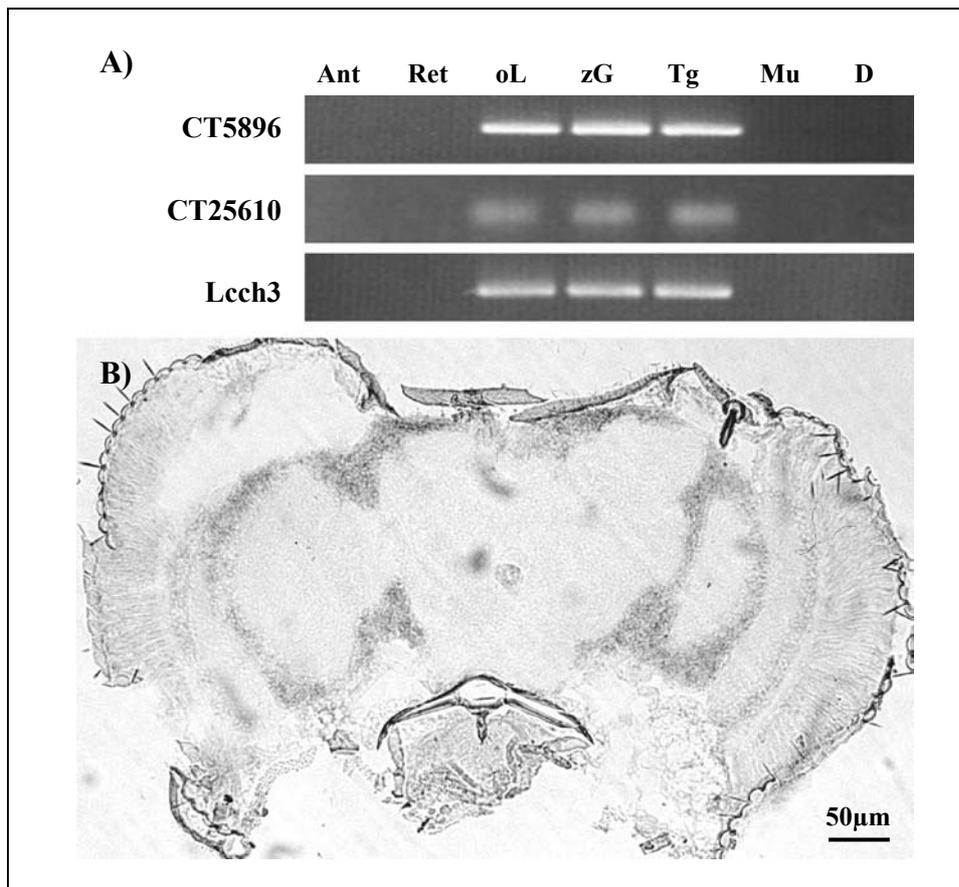


Abbildung 3.4-2: Analyse der gewebespezifischen Expression der Gene CT5896, CT25610 und Lcch3 mittels RT-PCR und *in-situ* Hybridisierung (CT5896). In Abbildung A) ist das Ergebnis der RT-PCR mittels einer Ethidiumbromid Färbung in einem 1%igen Agarosegel dargestellt. Die Expression aller drei Gene (links in der Abb.) bezieht sich ausschließlich auf die Gewebe des Nervensystems (optische Loben = oL, zentrales Gehirn = zG und Thorakalganglion = Tg). In den peripheren Geweben (Antennen = Ant, Retinae = Ret, Muskel = Mu, Darm = D) konnte keine Expression nachgewiesen werden. **B)** *in-situ* Hybridisierung mit der Digoxigenin-markierten Gegensinn cRNA-Sonde des CT5896 Gens an einem 10µm dicken Frontalschnitt aus der Kopfmittle von *Drosophila melanogaster*. Der Nachweis erfolgte über eine Farbreaktion mit den Substraten der alkalischen Phosphatase NBT und BCIP. In allen Zellen des Nervensystems des Kopfes konnten Hybridisierungen nachgewiesen werden.

Das Ergebnis der Hybridisierung zeigte, dass ausschließlich in den Nervenzellen des Gehirns Signale nachweisbar waren. Dies bezog sich sowohl auf die Bereiche Lamina,

Medulla und Lobula der optischen Loben als auch auf verschiedene Bereiche des zentralen Gehirns. Die Hybridisierungen fanden nur in den Somata der Zellen, nicht in den Neuropilen statt. In nicht neuronalen Geweben wie z.B. Retina und Antennen konnten keine Signal detektiert werden. Dies unterstützt die aus den RT-PCR Untersuchungen gewonnenen Ergebnisse und beweist die gewebespezifische Expression dieses Gens.

Die dritte Gruppe besteht aus den Genen Rdl und CT21430, die eine sehr heterogene Expression aufweisen. Auch bei diesen Genen wurde RT-PCR Experimente mit spezifischen Oligonukleotiden und gewebespezifischer cDNA durchgeführt (s. 2.9.6; 2.14 und 3.2.1). Beide Gene weisen hierbei ein unterschiedliches Expressionsmuster auf, dass sich sowohl auf die Gewebe des Nervensystems als auch auf periphere Gewebe erstreckt (s. Abb. 3.4-3 A). Die Transkripte des Rdl Gens waren sowohl in den Geweben des Nervensystems (optische Loben, Zentralgehirn und Thorakalganglion) als auch in den peripheren Geweben der Antennen, Retinae und des Darms nachweisbar (s. unten). Die Lokalisation des Rdl Gens in adulten *Drosophilas* wurde von anderen Gruppen bereits ausführlich untersucht (Harrison et al., 1996) und korrelierte mit den Ergebnissen aus den hier erzielten RT-PCR Experimenten. Eine weitere Untersuchung des Expressionsmusters mittels *in-situ* Hybridisierung wurde daher nur für das CT21430 Gen durchgeführt.

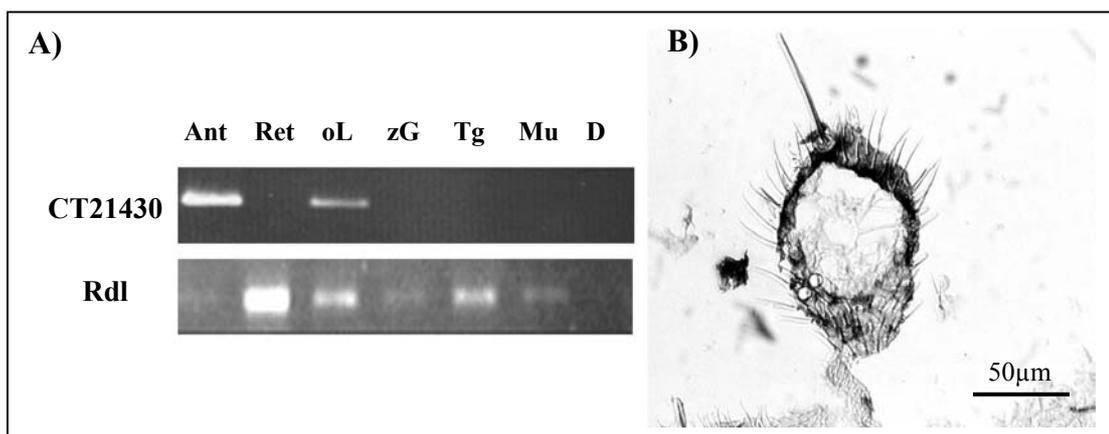


Abbildung 3.4-3: Analyse der gewebespezifischen Expression der Gene CT21430 und Rdl mittels RT-PCR und *in-situ* Hybridisierung (CT21430). Abbildung A) zeigt das Ergebnis der RT-PCR in einem 1%igen Agarosegel mit Ethidiumbromid Färbung. Ant = Antennen, Ret = Retinae, oL = optische Loben, zG = zentrales Gehirn, Tg = Thorakalganglion, Mu = Muskel, D = Darm. B) *in-situ* Hybridisierung mit der Digoxigenin-markierten Gegensinn cRNA-Sonde des CT21430 Gens an einem 10µm dicken Cryoschnitt durch das erste und zweiten Antennensegment von *Drosophila melanogaster*. Der Nachweis erfolgte über eine Farbreaktion mit den Substraten der alkalischen Phosphatase NBT und BCIP.

Bei der Hybridisierung der Digoxigenin-markierten CT21430 Gegensinn cRNA Sonde mit 10µm dicken Cryoschnitten des Kopfes von *Drosophila melanogaster* konnten im Bereich der optischen Loben sowie im zweiten Antennensegment (s. Abbildung 3.4-3 B) Signale detektiert werden. Auch hier konnte die gewebespezifische Expression des Gens durch die Ergebnisse der *in-situ* Hybridisierung bestätigt werden.

Die vierte Gruppe letztendlich besteht aus den beiden als Histamin-gekoppelte Chlorid-Kanal Untereinheiten identifizierten Genen *Dm HA-Cl I* und *Dm HA-Cl II*. Beide Gene dieser Gruppe konnten in der gewebespezifischen RT-PCR ausschließlich in den optischen Loben und Thorakalganglion nachgewiesen werden. Eine weitergehende Verifizierung ihres Expressionsmusters durch *in-situ* Hybridisierungen ist bereits unter 3.2.2 und 3.2.4 ausführlich dargestellt worden und soll hier nicht weiter besprochen werden.

3.5 Generierung und phänotypische Analyse transgener Tiere

Einer der interessantesten und bedeutendsten Aspekte bei der Identifizierung und Charakterisierung von Genen ist Ihre Funktion im Organismus. Um die Funktion eines Gens im Organismus zu untersuchen ist es am zweckmäßigsten dieses Gen selektiv zu inaktivieren.

Da die Erzeugung genetischer *knockouts* oftmals sehr zeitaufwendig ist und zudem das Risiko besteht, dass ein kompletter *knockout* eines Gens sich als letal erweist und demgemäss keine weiteren Aufschlüsse über seine Funktion im Organismus geben kann, erwies sich die RNA-Interferenz (RNAi) als das Mittel der Wahl. Bei dem als RNA-Interferenz bezeichneten Prozess induziert die Anwesenheit doppelsträngiger RNA (dsRNA) ein sequenzspezifisches posttranskriptionelles *gene silencing* (Elbashir et al., 2001). Die dsRNA wird *in vivo* durch die RNase III Nuklease Dicer in 21-22nt lange RNA Fragmente gespalten (siRNA) (Bernstein et al., 2001), die mit der korrespondierenden mRNA interagieren und zu ihrem Abbau in der Zelle führen. Hierdurch ist eine Translation nicht mehr möglich und es kommt zu keiner weiteren Expression des Proteins.

Zudem ist es mittels des GAL4/UAS Systems (Brand und Perrimon, 1993) möglich, die Transkription der dsRNA zeit- und gewebespezifisch zu aktivieren (s. 3.5.2) und somit die Expression des korrespondierenden Gens selektiv zu inaktivieren. Für die Nutzung

des GAL4/UAS Systems mussten transgene UAS-RNAi Fliegen für die jeweils zu untersuchenden Gene erzeugt werden (s. 2.18). Hierbei handelt es sich um transgene Tiere, die durch P-Element vermittelte Transformation in die Keimbahn von *Drosophila melanogaster* erzeugt wurden und stromabwärts von der UAS Sequenz ein genspezifisches DNA Konstrukt enthalten, dass nach erfolgter Transkription zu einer Hybridisierung der komplementären 300-400nt langen RNA Stränge sowie der Ausbildung einer Haarnadelschleife führt (s. 2.18.1).

Da es sich bei der Herstellung transgener *Drosophila melanogaster* durch Mikroinjektion (s. 2.18) um eine bis dahin nicht etablierte Methode in der Arbeitsgruppe handelte, stellte dies eine besondere Herausforderung dieser Arbeit dar. Hierfür wurden aus der Familie der Liganden-gesteuerten Chlorid-Kanäle von *D. melanogaster* 5 Kandidaten ausgewählt, die aufgrund der vorausgehenden Ergebnisse als besonders interessant eingestuft wurden. Es handelte sich dabei um die Gene CT21430, Lcch3 und GluCl, sowie um die beiden Untereinheiten des Histamin gesteuerten Chlorid-Kanals *Dm* HA-Cl I und II.

3.5.1 Herstellung transgener *Drosophila*-Linien für RNA-Interferenz Versuche

Zur Erzeugung transgener Fliegenlinien (UAS-RNAi Linien) wurden für die Gene CT21430, Lcch3, GluCl und *Dm* HA-Cl I und II sogenannte pUAST-RNAi Vektoren hergestellt (s. 2.18.1) und in Kombination mit dem Helferplasmid pUChs Δ 2-3 in die Embryonen von *D. melanogaster* injiziert (s. 2.18.2). Mittels des Transposase Gens des Helferplasmids wird eine P-Element vermittelte Transformation des pUAST-RNAi Konstruktes in die Keimbahn von *Drosophila melanogaster* erzeugt. Durch eine anschließende Selektion der transformierten Fliegen (s. 2.18.3) konnten homozygote transgene Linien für die Gene CT21430, GluCl und *Dm* HA-Cl II erzeugt werden. Eine Identifizierung der homozygoten Tiere war anhand ihrer roten Augenfarbe möglich. Für die Gene *Dm* HA-Cl I und Lcch3 ist bis zum Abschluss der Arbeit die Erzeugung der pUAST-RNAi Vektoren, sowie die Injektion in die Embryonen gelungen. Bei der Selektion transformierter Fliegen (s. 2.18.3) konnten noch keine transgenen Tiere dieser Linien identifiziert werden. Dies ist auf die hohe Letalität der injizierten Embryonen zurückzuführen. Nur 10% der injizierten Embryonen überleben die Injektion und

entwickeln sich zu L1 Larven, von diesen 10% sind durchschnittlich nur weitere 10% (also nur 1% der Ausgangsmenge) transgen und entwickeln sich zu adulten Tieren.

Für eine Aktivierung der Transkription der genspezifischen dsRNA in den transgenen Tieren ist eine weitere Kreuzung mit einer Treiberlinie nötig (s.2.19 und 3.5.2).

Gene	pUAST-RNAi Vektoren	transgene UAS-RNAi Linien	Kreuzungen mit Treiberlinien
CT21430	P{UAS-21430-14-3-3zeta dsRNA}	[w1118];P{UAS-21430-14-3-3zeta dsRNA}	tub-GAL4, Nrv2-GAL4, GAL4-Hsp70
<i>Dm</i> HA-CI I	P{UAS-22815-14-3-3zeta dsRNA}	-	-
<i>Dm</i> HA-CI II	P{UAS-34515-14-3-3zeta dsRNA}	[w1118];P{UAS-34515-14-3-3zeta dsRNA}	GAL4-Hsp70
Lcch3	P{UAS-Lcch3-14-3-3zeta dsRNA}	-	-
GluCI	P{UAS-Glu-14-3-3zeta dsRNA}	[w1118];P{UAS-Glu-14-3-3zeta dsRNA}	tub-GAL4, Nrv2-GAL4, GAL4-Hsp70

Tabelle 3.5.1-1: Übersicht über die erzeugten RNAi Vektoren, transgenen Linien sowie den durchgeführten Kreuzungen mit verschiedenen Treiberlinien. Dargestellt sind die zur Herstellung transgener Fliegen verwendeten Gene sowie die genauen Bezeichnungen der für diese Gene erzeugten pUAST-RNAi Vektoren und der homozygoten transgenen Linien. Zusätzlich sind noch die für jede der transgenen Linien verwendeten Treiberlinien aufgeführt: tub-GAL4 = yw; P{tub-GAL4; TM3, Sb}, Nrv2-GAL4 = w[*];P{w[+mC]=Nrv2-GAL4.S}3;P{w[+mC]=Nrv2-GAL4.S}8, GAL4-Hsp70 = w[*];P{w[+mC]=GAL4-Hsp70.PB}89-2-1

Tabelle 3.5.1 gibt einen Überblick über die für die Herstellung transgener Tiere erzeugten pUAST-RNAi Vektoren sowie über die durch P-Element vermittelte Transformation in die Keimbahn von *Drosophila melanogaster* erzeugten, homozygoten transgenen Fliegenlinien und ihre Kreuzungen mit den jeweiligen Treiberlinien.

3.5.2 Zeit- und gewebespezifische-Aktivierung der Transkription

Mit Hilfe des GAL4/UAS Systems von Brand und Perrimon (Brand und Perrimon, 1993) ist eine gezielte Transkription von Genen möglich. Die Transkription der unter

der Kontrolle einer *upstream activation sequence* (UAS) stehenden doppelsträngigen RNA (dsRNA) in den transgenen Fliegenlinien findet erst nach einer Bindung des Transkriptionsfaktors GAL4 an die UAS Sequenz der transgenen Fliegen statt. GAL4 wird natürlicherweise nicht in *Drosophila* exprimiert, hierfür ist eine Kreuzung mit einer speziellen GAL4 exprimierenden Linie notwendig. Der Ort der Expression wird durch den dem GAL4-Gen vorgeschalteten Promotor bestimmt (s. Abbildung 3.5.2-1).

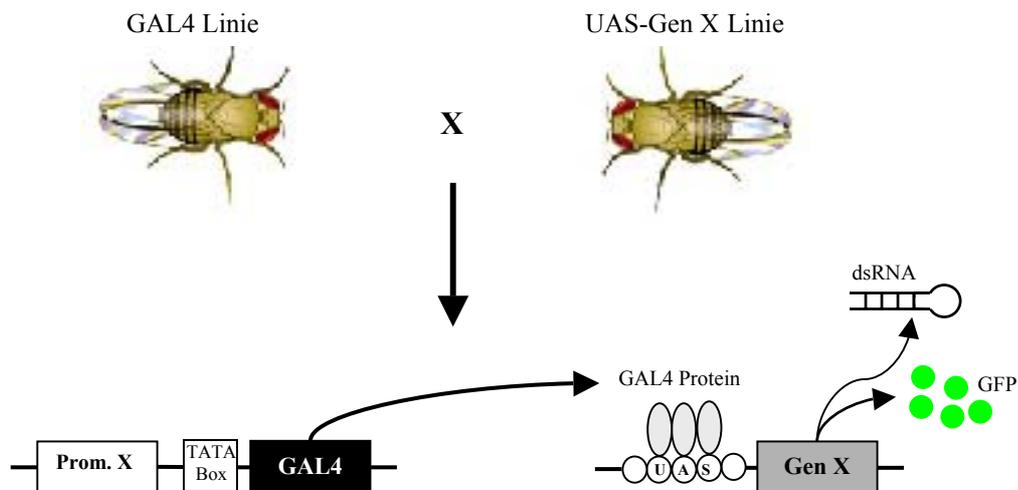


Abbildung 3.5.2-1: Schematische Darstellung der spezifischen Aktivierung der Transkription mittels des GAL4/UAS Systems. Durch die Kreuzung (=X) einer transgenen *Drosophila* GAL4 Linie (= GAL4 Linie) die unter der Kontrolle eines gewebespezifischen Promotors (= Prom. X) den Transkriptionsfaktor GAL4 exprimiert, mit einer transgenen *Drosophila* UAS-Gen X Linie kommt es durch die Bindung des GAL4 Proteins an die 5 GAL4-Bindungsstellen (=upstream activation sequence = UAS) zu einer gewebespezifischen Aktivierung der Transkription des sich stromabwärts befindenden Gens (= Gen X). Die Aktivierung der Transkription des Ziel-Gen erfolgt ausschließlich in den Zellen die GAL4 exprimieren. Bei dem Gen X handelte es sich entweder um RNAi Konstrukte, was zu einer spezifischen Transkription doppelsträngiger RNA (dsRNA) führte oder um das Cameleon 2.1 Gen, welches zu der Expression von GFP führte.

Für die Untersuchungen der Funktion der Gene CT21430 und GluCl im Nervengewebe wurden die beiden transgenen Linien mit der Gal4 exprimierenden Linie Nrv2-GAL4 ($w[*]; P\{w[+mC]=Nrv2-GAL4.S\}3; P\{w[+mC]=Nrv2-GAL4.S\}8$) gekreuzt (s. 2.19). Eine visuelle Kontrolle der gewebespezifischen Expression erfolgte durch eine weitere Kreuzung der GAL4 Linie mit der Cam-UAS ($w[1118]; P\{w[+mC]=UAS-Cameleon.2.1\}82$) Linie, welche durch die Bindung des Transkriptionsfaktors GAL4 an die UAS Sequenz das Gen Cameleon 2.1 exprimiert. Bei Cameleon 2.1 handelt es sich

um ein fluoreszierendes Calcium Sensor Protein, welches bei einer Wellenlänge von 488nm angeregt und bei 525nm detektiert werden konnte.

Anhand der aus diesen Kreuzungen resultierenden Tiere konnte gezeigt werden, dass das GAL4-Protein unter der Kontrolle des Nervana-Promotors ausschließlich im Nervengewebe exprimiert wird und hierdurch die gewebespezifische Transkription der unter der Kontrolle einer UAS Sequenz stehenden Gene bewirkt. Die Expression fand in allen Entwicklungsstadien statt und konnte mit Hilfe des konfokalen Laserscannermikroskops und der Leica TCS NT Software dokumentiert werden.

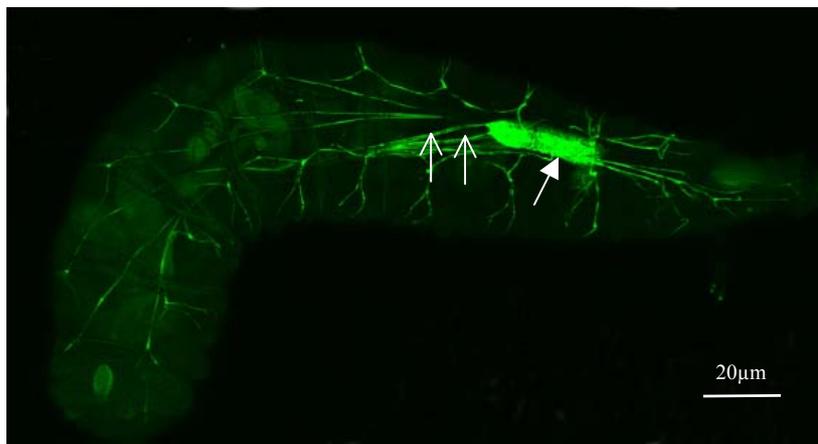


Abbildung 3.5.2-2: Konfokale Fluoreszenzaufnahme einer aus der Nrv2-GAL4/Cam-UAS Kreuzung stammenden L2 Larve. Der anteriore Bereich der Larve befindet sich rechts im Bild, der posteriore Bereich links. Die Fluoreszenz ist auf das Nervensystem beschränkt. Die stärkste Fluoreszenz ist im Zentralnervensystem, das mit einem gefüllten Pfeil gekennzeichnet ist, zu erkennen. Auch im peripheren Nervensystem (offener Pfeil) konnte Fluoreszenz nachgewiesen werden.

Aufgrund dieses Nachweises konnte davon ausgegangen werden, dass die Treiberlinie Nrv2-GAL4 ($w[*]; P\{w[+mC]=Nrv2-GAL4.S\}3; P\{w[+mC]=Nrv2-GAL4.S\}8$) auch bei den Kreuzungen mit den für die RNA-Interferenz Versuche erzeugten Linien der Gene GluCl ($[w1118]; P\{UAS-Glu-14-3-3zeta\} dsRNA$) und CT21430 ($[w1118]; P\{UAS-21430-14-3-3zeta\} dsRNA$) ausschließlich eine Aktivierung der Transkription im Nervengewebe bewirkt.

Für die Erzeugung eines temporären *knockouts* in allen Geweben der Tiere wurde eine Treiberlinie verwendet, die GAL4 universell exprimiert. Hierbei handelt es sich um die Linie tub-GAL4 ($yw; P\{tub-GAL4; TM3, Sb\}$), die GAL4 unter der Kontrolle des Tubulin-Promotors exprimiert. Diese Untersuchungen wurden an den Genen CT21430

und GluCl durchgeführt. Auch hier wurde das Expressionsmuster durch eine weitere Kreuzung mit der Cam-UAS Linie ($w[1118]; P\{w[+mC]= UAS-Cameleon.2.1\}82$) kontrolliert und mit Hilfe des konfokalen Laserscannermikroskops und der Leica TCS NT Software dokumentiert. Es konnte nachgewiesen werden, dass die Expression in allen Entwicklungsstadien und allen Geweben stattfindet. Im Embryonal- und ersten Larvalstadium befindet sie sich jedoch auf einem noch sehr niedrigen Niveau, was erst ab dem zweiten Larvalstadium (L2) stark zunimmt. In allen Geweben der Larven (ab L2) und adulten Tiere konnte eine starke Fluoreszenz nachgewiesen werden. Für die Dokumentation wurden Laserscanneraufnahmen von L2 Larven sowie Aufnahmen von präparierten Geweben der Larven von Darm, Fettkörper, Malpighi-Gefäßen und dem Nervengewebe gemacht

Dies ist ein Nachweis dafür, dass es unter der Regulation eines Gens x durch den Tubulin-Promotor zu einer besonders hohen Transkriptionsrate des Gens kommt, was mit einer starken Expression dieses Proteins einhergeht.

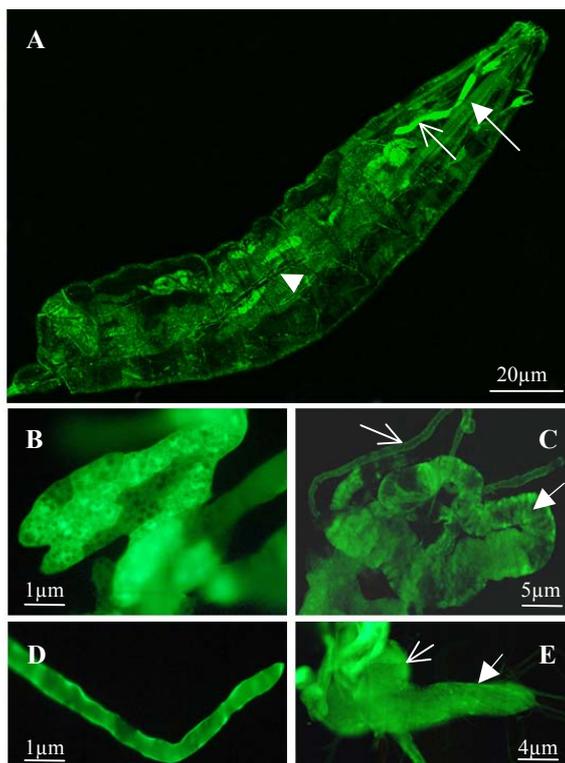


Abbildung 3.5.2-3: Fluoreszenzaufnahmen einer aus der tub-GAL4/Cam-UAS Kreuzung stammenden L2 Larve sowie einiger daraus präparierter Gewebe.

Abb. A zeigt eine Übersicht über die gesamte Larve. Oben rechts befindet sich der anteriore Pol, unten links der posteriore Pol der Larve. Die auf der Expression des fluoreszierenden Calcium Sensor Proteins Cameleon 2.1 beruhende Fluoreszenz erstreckt sich auf annähernd alle Gewebe. Exemplarisch wurde die Expression im Muskel (gefüllter weißer Pfeil), sowie in der Speicheldrüse (offener weißer Pfeil) und in den Tracheen (weiße Pfeilspitze) markiert. In Abb. B ist die starke Expression im Fettkörper zu sehen, in Abb. C die Expression im Darm (geschlossener Pfeil) und in den Malpighi - Gefäßen (offener Pfeil).

In Abb. D ist die mittels der Fluoreszenz visualisierte Expression des fluoreszierenden Calcium Sensor Proteins Cameleon 2.1 in einem Malpighi-Gefäß und in Abb. E in den Anlagen des zentralen Nervengewebes zu erkennen. Das ventral Ganglion wurde hier mit einem gefüllten weißen Pfeil markiert, die Gehirn Hemisphären mit einem offenen weißen Pfeil.

Hierauf basierend konnte davon ausgegangen werden, dass die Treiberlinie tub-GAL4 (yw; P{tub-GAL4; TM3, Sb}) auch bei den Kreuzungen mit den für die RNA-Interferenz Versuche erzeugten Linien der Gene GluCl ([w1118];P{UAS-Glu-14-3-3zeta dsRNA}) und CT21430 ([w1118];P{UAS-21430-14-3-3zeta dsRNA}) zu einer hohen Transkriptionsrate der genspezifischen dsRNA in allen Gewebe führt.

Auch bei der verwendeten Treiberlinie GAL4-Hsp70 (w[*];P{w[+mC]=GAL4-Hsp70.PB}89-2-1) sollte eine ubiquitär Expression des Transkriptionsfaktors GAL4 stattfinden. Aufgrund des unter der Kontrolle des *heatshock* Promotors Hsp 70 stehenden Gens, sollte diese jedoch im Gegensatz zu der tub-GAL4 Linie, zeitlich induzierbar sein. Unter Verwendung dieser Treiberlinie wurden RNAi Untersuchungen mit den transgenen Linien der Gene *Dm* HA-CL II, CT21430 und GluCl durchgeführt. Die Induktion der Transkription der aus diesen Kreuzungen resultierenden Tiere erfolgte im L2 Stadium wie unter 2.19.1 beschrieben. Zum Nachweis des Expressionsmusters dieses Promotors sowie der Effektivität der Induktion mittels eines Hitzeschocks wurde eine weitere Kreuzung mit der Cam-UAS Linie (w[1118]; P{w[+mC]= UAS-Cameleon.2.1}82) durchgeführt. Eine Analyse der aus diesen Kreuzungen resultierenden Tiere mittels des konfokalen Laserscannermikroskops ergab, dass das Expressionsmuster demjenigen entsprach, das bei Fliegen zu finden ist, die Cameleon 2.1 unter der Kontrolle des Tubulin Promotors exprimieren. Die Fluoreszenz jedoch war schwächer, was auf eine geringere Expression des Cameleon 2.1 Proteins des unter der Regulation des *heatshock*-Promotors stehenden GAL4 Proteins zurückzuführen ist. Eine Steigerung der Expression des Cameleon 2.1 Proteins konnte auch durch einen Hitzeschock nicht erreicht werden. Die Expression blieb stets auf einem konstanten Niveau.

Aufgrund der oben dargestellten Ergebnisse konnte davon ausgegangen werden, dass die Treiberlinie GAL4-Hsp70 (w[*];P{w[+mC]=GAL4-Hsp70.PB}89-2-1) auch bei den Kreuzungen mit den für die RNA-Interferenz Versuche erzeugten Linien der Gene GluCl ([w1118];P{UAS-Glu-14-3-3zeta dsRNA}), CT21430 ([w1118];P{UAS-21430-14-3-3zeta dsRNA}) und *Dm* HA-CL II ([w1118];P{UAS-34515-14-3-3zeta dsRNA}) zu einer ubiquitären Transkription der genspezifischen dsRNA in den Gewebe führte, die jedoch nicht zeitlich induzierbar war.

3.5.3 Phänotypische Analyse temporärer *knockout* Fliegen

Für eine phänotypische Analyse der temporären *knockout* Linien war es notwendig zuvor nachzuweisen, dass die aktivierte Transkription der dsRNA zu einer Reduktion der korrespondierenden mRNA in den Zellen führt. Nur so konnte ausgeschlossen werden, dass ein der Vergleichsgruppe entsprechender Phänotyp auf eine mangelnde Reduktion der Expression des Gens zurückzuführen ist.

Die Analyse der Effekte der dsRNA auf die korrespondierende mRNA erfolgte mittels eines Northern Blots. Für diese Analyse wurden jeweils 10µg gesamt-RNA der für die Injektionen verwendeten w1118 Fliegen, sowie der für die jeweilige Aktivierung verwendeten Treiber (GAL4)- und Effektor (UAS RNAi)-Linien und der entsprechenden GAL4/UAS RNAi Linie isoliert (s. 2.12.1). Anschließend wurde die RNA in einem 1% RNA Agarosegel elektrophoretisch getrennt und durch einen Kappilartransfer auf die Nylon Membran transferiert (s. 2.15.2). Für die Detektion der mRNA des zu untersuchenden Gens in den verschiedenen Fliegenlinien wurden radioaktiv markierte cDNA Sonden verwendet. Die verwendeten Sonden entsprachen jenen, die bei der Analyse der entwicklungspezifischen Expression der Liganden-gesteuerten Chlorid-Kanäle benutzt wurden (s. 2.15.3). Im Falle einer spezifischen Reduktion der korrespondierenden mRNA in den GAL4/UAS RNAi Tieren sollte bei der Hybridisierung der genspezifischen Sonden mit der mRNA im Northern Blot nur bei dieser Linie eine Reduktion des Signals erkennbar sein.

Zur Dokumentation der RNAi Effekte nach der aktivierten Transkription der dsRNA ist hier beispielhaft die Reduktion der mRNA des CT21430 Gens in der tub-GAL4/[w1118];P{UAS-21430-14-3-3zeta dsRNA} Linie dargestellt worden.

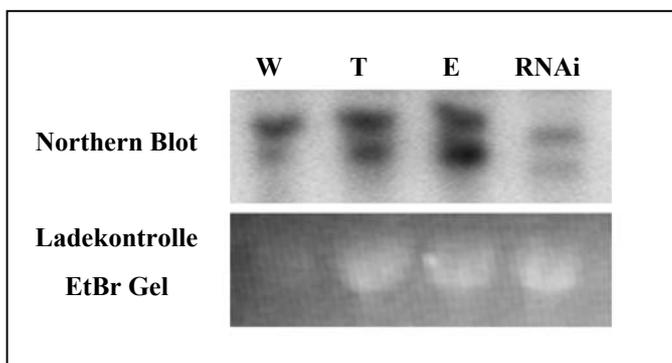


Abbildung 3.5.3-1: Nachweis der reduzierten mRNA des CT21430 Gens bei den GAL4/ UAS RNAi Fliegen. Die mRNA des CT21430 Gens wurde in verschiedenen Fliegenlinien (oben angegeben) mittels Northern Blot detektiert. Der Nachweis erfolgte durch eine genspezifische

radioaktiv markierte Sonde. Als Ladekontrolle des verwendeten Agarosegels wurde die 18S rRNA mittels einer Ethidiumbromid Färbung (EtBr) dargestellt. W = W1118 Fliegenstamm, T = Tub-GAL4 Treiberlinie, E = UAS/RNAi Effektorlinie des CT21430 Gens, RNAi = Tub-GAL4/UAS RNAi *knockout* Linie des CT21430 Gens

In Abbildung 3.5.3-1 ist bei der GAL4/UAS RNAi Linie eine deutliche Reduktion des Signals gegenüber den Vergleichsgruppen zu erkennen. Die geringe Signalstärke bei den Fliegen der W118 Linie ist auf eine geringere RNA Menge im Gel zurückzuführen, was an dem ebenfalls schwächeren Signal der 18S rRNA bei der Ladekontrolle des Agarosegels ersichtlich ist. Hierdurch konnte gezeigt werden dass es durch die Aktivierung der Transkription von dsRNA zu einer spezifischen Reduktion der korrespondierenden mRNA kommt.

Die phänotypischen Analysen der temporären *knockout* Tiere erstreckten sich auf Untersuchungen zum Entwicklungszyklus und zur Vitalität der Tiere. Um Aussagen über die Vitalität der Tiere machen zu können, wurden die Verhaltensparameter Laufen, Putzen und Ruhen herangezogen und die Dauer der einzelnen Parameter pro min bestimmt (s. 2.19). Als Kontrollgruppe fungierten *Drosophila melanogaster* des Wildtyps (Canton S). Für eine exakte Analyse wurde die Signifikanz der ermittelten Daten im Vergleich zu den aus den Vitalitätsanalysen des Wildtyps hervorgehenden Daten mittels eines t-Tests bestimmt. Die quantitative Auswertung der Daten wurde mit dem Programm GraphPad Prism Version 4.0 durchgeführt und die hieraus resultierenden Mittelwerte, Standardabweichungen und Signifikanzen graphisch dargestellt (s.u.).

Bei der Erzeugung transgener Effektorlinien durch P-Element vermittelte Transformation besteht immer die Gefahr, dass die Insertion innerhalb eines anderen Gens erfolgt, wodurch eine Transkription dieses Gens modifiziert würde. Hieraus könnte ein veränderter Phänotyp der Effektorlinie resultieren, welcher die Ergebnisse einer phänotypischen Analyse der aus den Kreuzungen mit der Treiberlinie resultierenden *knockout* Tiere verfälschen würde. Daher wurden zusätzliche Vitalitätsanalysen mit den transgenen Linien der untersuchten Gene (= Effektorlinien) im Vergleich zum Wildtyp durchgeführt.

Die Analyse der Effektorlinien (s. Abbildung 3.5.3-2) zeigte, dass nur bei der transgenen CT21430 Linie (= [w1118];P{UAS-21430-14-3-3zeta dsRNA}) für das Vitalitätsparameter Laufen mit 3.125 ± 1.125 sec/min ein signifikanter Unterschied ($P < 0,05$) zum Wildtyp mit 8.438 ± 1.846 sec/min bestand. Alle anderen Messungen ergaben keine signifikanten Unterschiede zum Wildtyp. Für die transgenen Linien der Gene *Dm HA-CI II* und *GluCI* konnte somit eine Auswirkung in Bezug auf die Vitalität der Tiere, basierend auf der genomischen Insertion der UAS-RNAi Konstrukte ausgeschlossen werden.

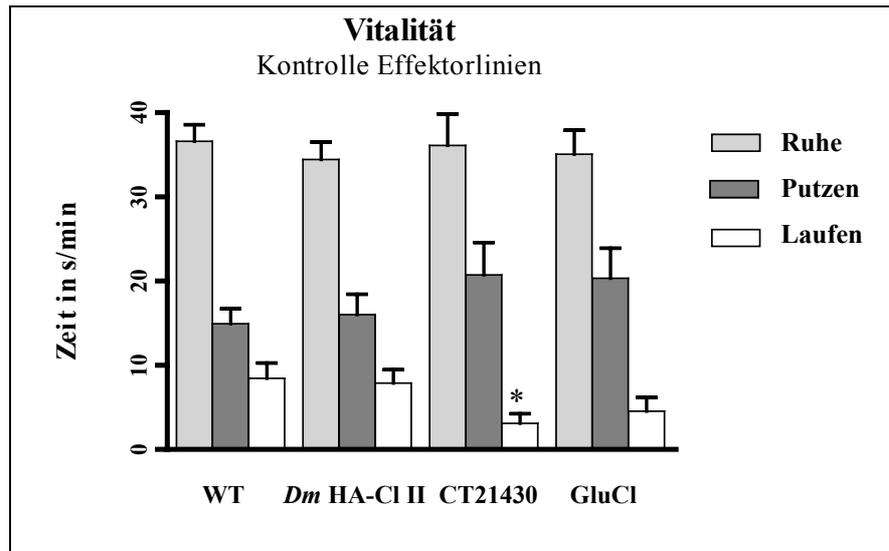


Abbildung 3.5.3-2: Vitalitätstest der Effektorlinien. Die Dauer der Verhaltensparameter Ruhen, Putzen und Laufen in Sekunden pro Minute wurden für die transgenen Linien (= Effektorlinien) der Gene *Dm HA-CI II*, CT21430 und GluCl sowie für Fliegen des Wildtyps (WT) bestimmt. Die Mittelwerte wurden graphisch dargestellt (Blockbalken) und basieren auf Einzelmessungen von jeweils 16 Tieren. Die Standardabweichung (Fehlerbalken) zeigt die Variabilität der Messwerte. * = signifikant im Vergleich zum WT

Die Analyse der temporären *knockouts* der untersuchten Liganden-gesteuerten Chlorid-Kanäle auf den Entwicklungszyklus erfolgte wie unter 2.19.2 beschrieben. Als Kontrollgruppe fungierten hier die aus den Kreuzungen mit der jeweiligen Treiberlinie und der Cam-UAS ($w[1118]; P\{w[+mC]=UAS-Cameleon.2.1\}82$) Linie resultierenden Tiere. Diese Tiere wurden als Kontrollgruppe gewählt, da hier die Aktivierung der Transkription lediglich die Expression des Cameleon 2.1 Gens bewirkt, die keinen Einfluss auf die Entwicklung haben sollte und die Kreuzungen zeitgleich mit den GAL4/UAS RNAi Kreuzungen angesetzt wurden. Sämtliche auf die Kreuzungen einwirkenden entwicklungsrelevanten Faktoren, wie z.B. Schwankungen der Umgebungstemperatur, Luftfeuchtigkeit o.ä., sind somit bei den RNAi Tieren und der Kontrollgruppe identisch und daher zu vernachlässigen. Eine statistische Auswertung war nicht möglich, da nur das erste Eintreten in ein neues Entwicklungsstadium innerhalb der jeweiligen Gruppen protokolliert wurde. Die Auswertung der Daten erfolgte graphisch (s.u.).

Die Analyse der aus den Kreuzungen mit der Treiberlinie GAL4-Hsp70 ($w[*];P\{w[+mC]=GAL4-Hsp70.PB\}89-2-1$) resultierenden Tiere führte zu folgenden Ergebnissen:

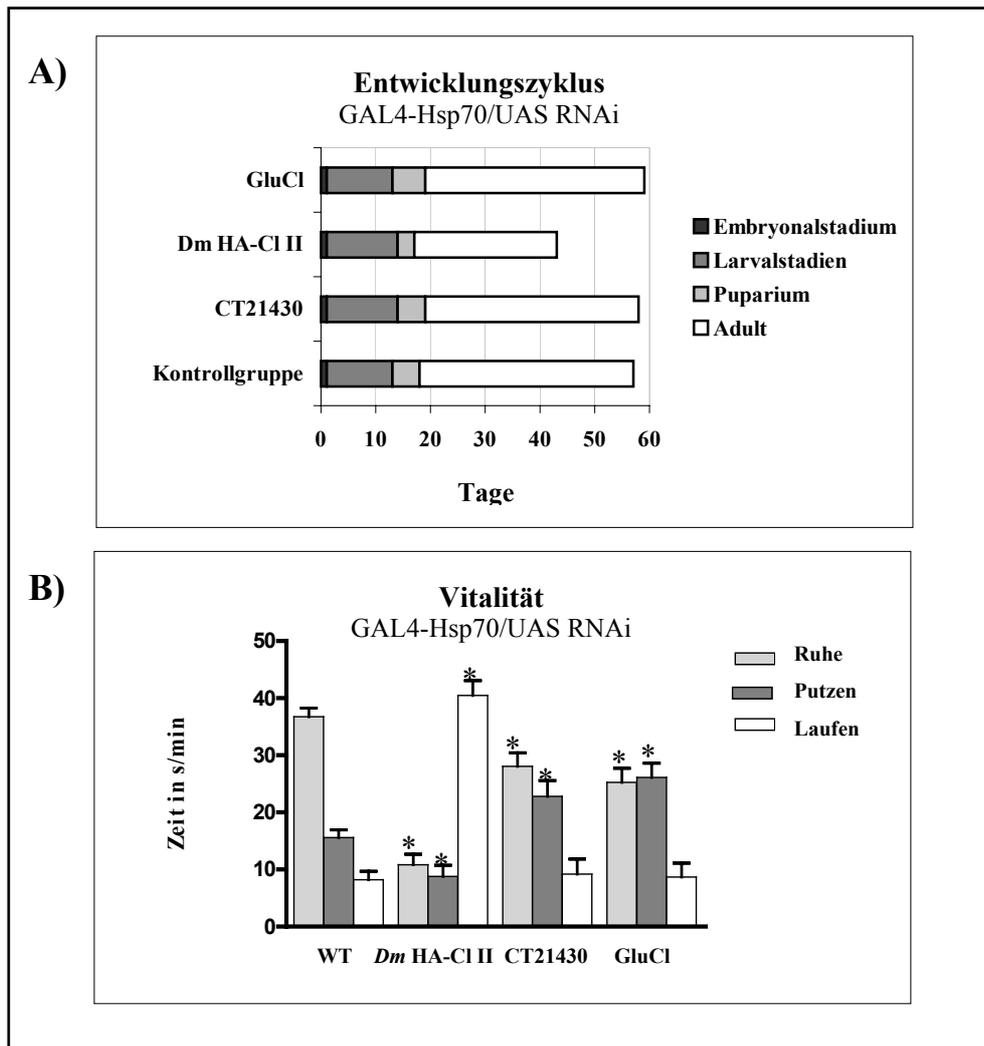


Abbildung 3.5.3-3: Phänotypische Analyse des Entwicklungszyklus und der Vitalität der GAL4-Hsp70/UAS RNAi *knockout* Fliegen. A) Die Dauer der einzelnen Entwicklungsstadien in Tagen wurde für die aus den Kreuzungen mit der Treiberlinie GAL4-Hsp70 resultierenden *knockout* Fliegen der Gene CT21430, *Dm HA-CI II* und *GluCl* ermittelt und graphisch dargestellt (Balken). Als Kontrollgruppe fungierte die GAL4-Hsp70/UAS Cameleon 2.1 Linie. B) Vitalität der aus der Kreuzung mit der GAL4-Hsp70 Treiberlinie stammenden *knockout* Tiere der Gene CT21430, *Dm HA-CI II* und *GluCl*, gemessen an den Verhaltensparametern Ruhem, Putzen und Laufen in sec/min. Die Mittelwerte (Blockbalken), Standardabweichung (Fehlerbalken) und Signifikanzen (*) wurden graphisch dargestellt und basieren auf jeweils 24 Einzelmessungen. Als Kontrollgruppe fungierten Fliegen des Wildtyps (WT).

Die temporären *knockout* Fliegen der Gene CT21430 und *GluCl* zeigten bei den Untersuchungen zum Entwicklungszyklus keine gravierenden Unterschiede zur Kontrollgruppe (s. Abbildung 3.5.3-3 A). Die Dauer der Larvalstadien war bei den CT21430 *knockout* Fliegen mit 13 Tagen lediglich um einen Tag im Vergleich zur Kontrollgruppe verlängert. Bei den *GluCl* *knockout* Fliegen hingegen war das Pupaarium

mit einer Dauer von 6 Tagen, ebenso wie die Lebensdauer der adulten Fliegen mit 40 Tagen, um einen Tag verlängert. Bei allen drei Linien entwickelten sich aus allen Puppen adulte Tiere. Die Anzahl der aus den drei Kreuzungen resultierenden adulten Tiere lag jeweils zwischen 120-200 Individuen. Die temporären *knockout* Fliegen des *Dm HA-CI II* Gens hingegen zeigten gravierende Unterschiede in ihrer Entwicklung zur Kontrollgruppe. Die Embryonal- und Larvalstadien entsprachen in ihrer Dauer der Kontrollgruppe, das Puparium jedoch war mit einer Dauer von 3 Tagen auffällig verkürzt. Ein Großteil der Tiere starb bereits im Larvalstadium und nahezu 50% der Tiere die das Puparium erreicht hatten starben während dessen. Die Anzahl der aus der Kreuzung resultierenden adulten Tiere lag bei 4 Individuen, die eine stark verkürzte Lebensdauer von maximal 26 Tagen hatten.

Die Analyse der Vitalität (s. Abbildung 3.5.3-3 B) der Tiere zeigte bei den temporären *Dm HA-CI II knockout* Fliegen mit 10.81 ± 1.83 sec/min beim Ruhen, 8.77 ± 1.94 sec/min beim Putzen und 40.42 ± 2.58 sec/min beim Laufen signifikante Unterschiede zum Wildtyp (36.63 ± 1.96 sec/min Ruhe, 14.94 ± 1.78 sec/min Putzen, 8.44 ± 1.85 Laufen). Offensichtlich führt die reduzierte Expression des *Dm HA-CI II* Gens zu einer drastisch erhöhten Laufaktivitäten der Fliegen, die mit stark verringerten Ruhezeiten und Putzaktivitäten einhergeht. Des Weiteren konnte bei diesen Tieren ab einem Alter von 16 Tagen ein starkes Zittern, sowie Koordinationsstörungen und ein aufgetriebenes Abdomen beobachtet werden.

Die Unterschiede der CT21430 *knockouts* waren nur in Bezug auf die Parameter Ruhe ($P = 0,0140$) und Putzen ($P = 0,0409$) signifikant. Dies beruht auf einer Verringerung der Ruhezeiten (28.00 ± 2.40 sec/min), sowie einer Verlängerung der Dauer des Putzens (22.79 ± 2.78 sec/min) der Tiere. Beim Laufen konnte kein signifikanten Unterschied ($P = 0,8276$) zum Wildtyp festgestellt werden.

Auch die Verringerung der Expression des *GluCI* Gens führte zu signifikanten Veränderungen der Vitalitätsparameter Ruhe ($P = 0,0020$) und Putzen ($P = 0,0023$). Wie bereits bei dem CT21430 *knockout* dargestellt, ist dies auch hier auf eine Reduktion der Ruhezeit (25.21 ± 2.48 sec/min) sowie eine vermehrte Putzaktivität (26.08 ± 2.51 sec/min) zurückzuführen. Eine Beeinflussung der Laufaktivität konnte nicht festgestellt werden.

Eine weitere ubiquitäre Transkription der dsRNA wurde für die transgenen Linien der Gene CT21430 und *GluCI* durch eine Kreuzung mit der Treiberlinie *tub-GAL4* (*yw*; $P\{tub-GAL4; TM3, Sb\}$) durchgeführt. Wie unter 3.5.2 dargestellt, führt die *GAL4* Expression durch den Tubulin Promotor zu einer starken Aktivierung der Transkription.

Hierdurch wurde eine Verstärkung der Transkription der dsRNA und daraus resultierend eine stärkere Reduktion der Expression der untersuchten Gene erwartet.

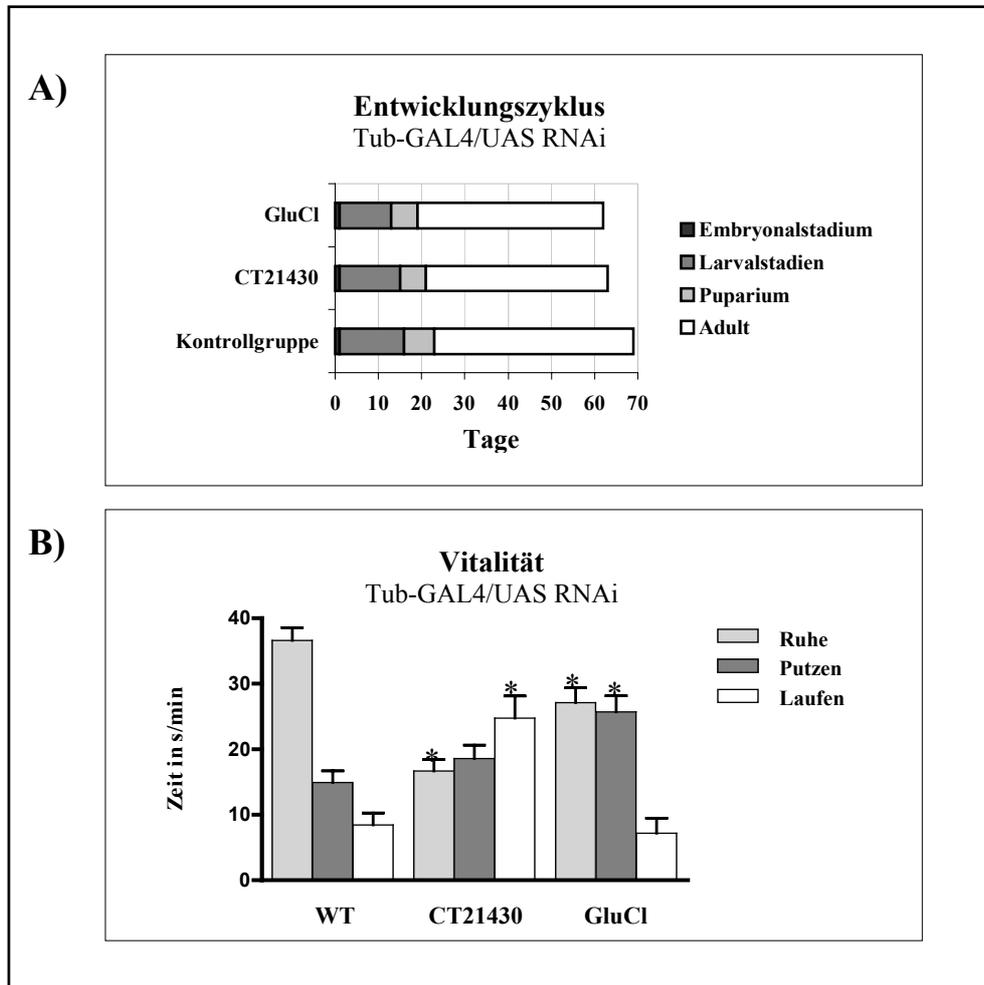


Abbildung 3.5.3-4: Phänotypische Analyse des Entwicklungszyklus und der Vitalität der Tub-GAL4/UAS RNAi *knockout* Fliegen. **A)** Graphische Darstellung der Dauer der einzelnen Entwicklungsstadien in Tagen (Balken) für die aus den Kreuzungen mit der Treiberlinie Tub-GAL4 resultierenden *knockout* Fliegen der Gene CT21430 und GluCl. Als Kontrollgruppe fungierte die Tub-GAL4/UAS Cameleon 2.1 Linie. **B)** Vitalität der aus der Kreuzung mit der Tub-GAL4 Treiberlinie stammenden *knockout* Tiere der Gene CT21430 und GluCl, gemessen an den Verhaltensparametern Ruhen, Putzen und Laufen in sec/min. Die Mittelwerte (Blockbalken), Standardabweichungen (Fehlerbalken) und Signifikanzen (*) wurden graphisch dargestellt und basieren auf Einzelmessungen von 24 Tieren. Als Kontrollgruppe fungierten Fliegen des Wildtyps (WT).

Die verstärkte Reduktion der Expression der CT21430 und GluCl Gene führte zu einem veränderten Entwicklungszyklus (s. Abbildung 3.5.3-4 A). Bei den aus den Kreuzungen mit der Tub-GAL4 Treiberlinie stammenden *knockout* Fliegen der Linie GluCl war eine Verkürzung der Larvalstadien um 3 Tage gegenüber der Kontrollgruppe zu beobachten.

Das Puparium war um einem Tag und die Lebenserwartung der adulten Fliegen um 3 Tagen verkürzt. Insgesamt scheint es möglich, dass die stärker aktivierte Transkription der dsRNA gegen das GluCl Genprodukt zu einem verkürzten Entwicklungszyklus führt. Die Effekte der *knockout* Fliegen der Linie CT21430 in Bezug auf den Entwicklungszyklus waren weniger drastisch. Lediglich eine Verkürzung der Larvalstadien und des Pupariums um einen Tag konnte beobachtet werden. Die Lebensdauer der adulten Fliegen lag jedoch mit 42 Tagen deutlich unter jener aus der Kontrollgruppe stammender Tiere mit 46 Tagen. Aus allen Puppen der beiden *knockout* Linien sowie aus denen der Kontrollgruppe entwickelten sich adulte Tiere. Die Anzahl der aus den drei Kreuzungen resultierenden adulten Tiere lag jeweils zwischen 50-120 Individuen.

Eine Analyse der Vitalität der Tiere (s. Abbildung 3.5.3-4 B) zeigte bei beiden Linien signifikante Unterschiede zum Wildtyp. Die aus den Kreuzungen der transgenen GluCl UAS RNAi Linie mit der Tub-GAL4 Treiberlinie resultierenden Tiere zeigten mit 27.11 ± 2.292 sec/min eine signifikante ($P = 0,0074$) Verringerung der Ruhezeit, sowie eine gesteigerte Putzdauer (25.71 ± 2.47 sec/min, $P = 0,0041$). Für das Vitalitätsparameter Laufen konnte kein signifikanter Unterschied zum Wildtyp festgestellt werden (7.18 ± 2.31 sec/min, $P = 0,7105$). Dies entsprach weitgehend dem Phänotyp der aus den Kreuzungen mit der Treiberlinie GAL4-Hsp70 resultierenden Tiere dieser Linie, was die hier erzielten Ergebnisse bestätigte.

Die Vitalitätsanalyse der aus der Kreuzung der Tub-GAL4 Treiberlinie und der transgenen CT21430 UAS RNAi Linie resultierenden Tiere zeigte signifikante Unterschiede bei den Parametern Ruhe und Laufen im Vergleich zum Wildtyp. Die Ruhezeiten der Tiere waren mit 16.68 ± 1.76 sec/min stark verringert ($P = P < 0.0001$), wohingegen die Laufdauer mit 24.75 ± 3.39 sec/min signifikant gesteigert war ($P = 0,0012$). In Bezug auf die Putzdauer konnten keine signifikanten Unterschiede zum Wildtypen festgestellt werden ($P = 0,2406$). Die Vitalitätsanalyse der Tub-GAL4/UAS RNAi Tiere der Linie CT21430 entsprach somit nicht dem der GAL4-Hsp70/UAS RNAi Fliegen dieser Linie (s.o.).

Für eine Analyse der Funktion der Gene CT21430 und GluCl im Nervensystem wurden durch die Kreuzung der Treiberlinie Nrv2-GAL4 ($w[*];P\{w[+mC]=Nrv2-GAL4.S\}3;P\{w[+mC]=Nrv2-GAL4.S\}8$) mit den transgenen UAS/RNAi Linien dieser Gene (s. 3.5.1) gewebespezifische *knockouts* generiert. Die Analyse des Entwicklungszyklus und der Vitalität führte zu folgenden Ergebnissen:

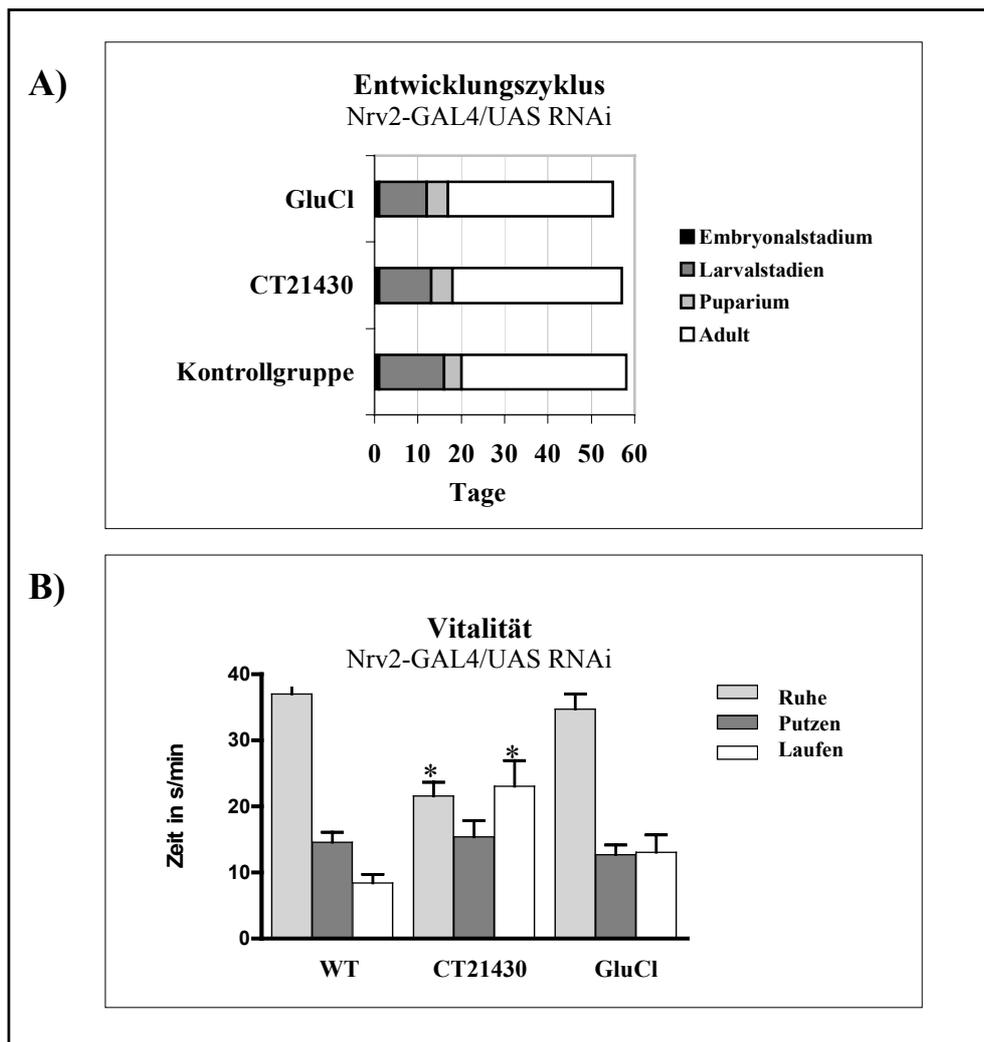


Abbildung 3.5.3-5: Phänotypische Analyse der gewebespezifischen *knockouts* der Nrv2-GAL4/UAS RNAi Fliegen der Gene CT21430 und GluCl. A) Analyse des Entwicklungszyklus. Die Dauer der einzelnen Entwicklungsstadien in Tagen wurde graphisch in Form von Balken dargestellt. Als Kontrollgruppe fungierte die Nrv2-GAL4/UAS Cameleon 2.1 Linie. **B)** Vitalität der aus der Kreuzung mit der Nrv2-GAL4 Treiberlinie stammenden *knockout* Tiere der Gene CT21430 und GluCl, gemessen an den Verhaltensparametern Ruhen, Putzen und Laufen in sec/min. Die Mittelwerte (Blockbalken), Standardabweichungen (Fehlerbalken) und Signifikanzen (*) wurden graphisch dargestellt und basieren auf Einzelmessungen von 24 Tieren. Als Kontrollgruppe fungierten Fliegen des Wildtyps (WT).

Die gewebespezifische Reduktion der Genexpression zeigte bei beiden Genen keine gravierenden Einflüsse auf die untersuchten Parameter des Entwicklungszyklus (s. Abbildung 3.5.3-5 A). Lediglich bei der Dauer der Larvalstadien konnte eine um 4 Tage bei dem GluCl *knockout* und 3 Tage bei dem CT21430 *knockout* Tieren verkürzte Entwicklungsdauer beobachtet werden. Die Metamorphose während des Pupariums wurde scheinbar bei allen Tieren erfolgreich durchlaufen und endete mit dem Schlüpfen

der adulten Tiere. Die Anzahl der aus den Kreuzungen resultierenden Tiere lag jeweils zwischen 150-230 Individuen.

Mittels der Vitalitätsanalyse (s. Abbildung 3.5.3-5 B) konnten keine phänotypische Veränderung durch die Reduktion der Expression des *GluCl* Gens im Nervengewebe nachgewiesen werden. Zwar konnte mit 13.04 ± 2.65 sec/min eine Steigerung der Laufaktivität festgestellt werden, diese war jedoch nicht signifikant ($P = 0,2070$). Auch die Ruhezeiten mit 34.71 ± 2.32 sec/min ($P = 0,5609$) und die Putzdauer mit 12.67 ± 1.49 sec/min ($P = 0,3359$) zeigten keine signifikanten Veränderungen im Vergleich zum Wildtyp. Die Reduktion der Expression des *CT21430* Gens hingegen führte zu einer signifikanten Verringerung der Ruhezeiten (21.58 ± 2.06 sec/min, $P = P < 0.0001$) und Steigerung der Laufdauer (23.04 ± 3.90 sec/min, $P = 0,0061$). Für das Vitalitätsparameter Putzen konnte keine signifikante Veränderung nachgewiesen werden (15.38 ± 2.46 sec/min, $P = 0,8969$).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die ubiquitäre Reduktion der Expression der Gene *Dm HA-Cl II*, *CT21430* und *GluCl* durch eine aktivierte Transkription der dsRNA mittels des *heatshock* Promotors der Treiberlinie *GAL4-Hsp70* einen signifikanten Einfluss auf die Vitalität der Tiere hat. Die deutlichsten Effekte waren bei dem temporären *knockout* des *Dm HA-Cl II* Gens zu beobachten. Nur hier konnte auch ein Einfluss auf den Entwicklungszyklus nachgewiesen werden.

Durch eine stärkere, ubiquitäre Reduktion der Expression der *CT21430* und *GluCl* Gene mittels der *Tub-GAL4* Treiberlinie konnte der Einfluss des *GluCl* Gens auf die Vitalitätsparameter Ruhe und Putzen bestätigt werden. Die stärker reduzierte Genexpression scheint zu einer möglichen Verkürzung des Entwicklungszyklus zu führen. Auch beim *CT21430 knockout* konnten signifikante Unterschiede zum Wildtyp festgestellt werden, die sich jedoch in der Verteilung der Dauer der einzelnen Aktivitäten stark von den *GAL4-Hsp70/UAS RNAi* Tieren unterschieden. Ein relevanter Einfluss auf den Entwicklungszyklus bleibt zu diskutieren.

Durch die selektiv reduzierte Expression der Gene im Nervensystem konnte gezeigt werden, dass das *GluCl* Gen in diesem System scheinbar keinen Einfluss auf die Vitalitätsparameter ausübt. Das *CT21430* Gen hingegen scheint in diesem System die Vitalität der Tiere zu beeinflussen. Ein Einflussnahme auf den Entwicklungszyklus ist bei beiden *knockouts* ungewiss und bleibt zu diskutieren.

4 Diskussion

Der Familie der Liganden-gesteuerten inhibitorischen Ionenkanäle kommt eine große Bedeutung in der schnellen synaptischen Signalübertragung durch verschiedenste Neurotransmitter zu. Zusätzlich stellt diese Genfamilie ein wichtiges Ziel für verschiedenste Medikamente, Gifte und nicht zuletzt für Insektizide dar (s. 1.2).

GABA ist sowohl bei Vertebraten als auch bei Invertebraten der wichtigste inhibitorische Neurotransmitter. Bei Vertebraten sind verschiedene GABA Rezeptoren bekannt, von denen der GABA_A Rezeptor ebenfalls zu den inhibitorischen Ionenkanal Rezeptoren gehört und Angriffsstelle zahlreicher Psychopharmaka wie Benzodiazepine und Barbiturate ist. Bei Insekten stellt der GABA Rezeptor die Angriffsstelle für Insektizide wie Dieldrin und Ivermectin dar. Aber noch ein weiteres Mitglied der Familie der inhibitorischen Liganden-gesteuerten Ionenkanäle von *Drosophila melanogaster* ist als Ziel für Insektizide beschrieben worden. Es handelt sich hierbei um die Untereinheit des Glutamat-gesteuerten Chlorid-Kanals GluCl, der von besonders großem Interesse ist, da es keine Glutamat-gesteuerten Chlorid-Kanäle bei Vertebraten gibt. Dieses Gen stellt daher einen sehr spezifischen Angriffsort für Insektizide dar. Dies macht die besondere Bedeutung dieser Gruppe von Rezeptoren deutlich. Bisher ist jedoch nur sehr wenig über die Mitglieder dieser Familie bekannt gewesen.

Aufgrund der abschließenden Ermittlung der vollständigen Sequenz des Genoms durch das *Drosophila* Genom Projekt (Adams et al., 2000) wurde die Identifizierung aller kodierender Gene der Mitglieder dieser Familie ermöglicht. Hierbei konnten 12 Gene potentieller inhibitorischer Chlorid-Kanal Untereinheiten identifiziert und teilweise analysiert werden. Hierzu gehören auch die drei bereits als ionotrope GABA (γ -Aminobuttersäure) Rezeptoren identifizierten Gene Rdl, Lcch3 und Grd (Hosie et al., 1997), sowie die Untereinheit des Glutamat-gesteuerten Chlorid-Kanals GluCl (Cully et al., 1996) und die beiden im Rahmen dieser Doktorarbeit identifizierten und intensiv untersuchten potentiellen Untereinheiten des Histamin-gesteuerten Chlorid-Kanals *Dm* HA-Cl I und II (Witte et al., 2002).

Mittels der phylogenetischen Analysen (s. 3.1) konnte die Verwandtschaft der *Dm* HA-Cl I und II Gene mit den humanen Glycin Rezeptoren dargestellt werden. Dies unterstützt die Annahme eines gemeinsamen genetischen Ursprungs (s.u.). Des weiteren wurde deutlich, dass die beiden als ionotrope GABA Rezeptor Untereinheiten identifizierten Gene Grd und Lcch3 nicht in die gleichen Gruppen von humanen GABA

Rezeptoren einzuordnen waren. Dies lässt trotz der Präferenz desselben Liganden auf einen getrennten Ursprung in der genetischen Entwicklung schließen. Für alle weiteren untersuchten Gene der Familie der Liganden-gesteuerten Chlorid-Kanäle von *D. melanogaster* konnte eine phylogenetische Verwandtschaft zu den Untereinheiten des Glutamat-gesteuerten Chlorid-Kanals von *C. elegans* gezeigt werden.

Bisher sind diese Rezeptoren jedoch vorwiegend elektrophysiologisch analysiert worden (Cully et al., 1996; Hosie et al., 1997; Hosie et al., 2001; Lee et al., 2003). Für eine weitergehende Analyse dieser Gene wurde daher im Rahmen dieser Doktorarbeit für unterschiedliche Mitglieder dieser Familie die entwicklungspezifische- sowie die gewebespezifische- Expression ermittelt. Zusätzlich konnte für drei Gene dieser Gruppe (*Dm* HA-Cl II, *GluCl* und *CT21430*) ein temporärer *knockout* mittels der RNA-Interferenz erzeugt werden, so dass es möglich war erste Aussagen über die *in vivo* Funktion dieser Genprodukte zu machen.

Der Histamin-gesteuerte Chlorid-Kanal aus der Familie der inhibitorischen Liganden-gesteuerten Chlorid-Kanäle ist seit vielen Jahren Gegenstand intensiver Untersuchungen (Hardie, 1989; McClintock und Ache, 1989). Das Histamin ist bei Arthropoden als Neurotransmitter der Photorezeptorzellen (Nassel et al., 1988; Hardie, 1989), sowie der mechanosensorischen Zellen (Buchner et al., 1993) bekannt. Eine Identifizierung der Untereinheiten dieses bedeutenden ionotropen Rezeptors auf molekularbiologischer Ebene war bis zum Beginn dieser Arbeit jedoch noch nicht erfolgt. Die Identifizierung und Charakterisierung dieses Kanals war daher ein zentrales Anliegen dieser Arbeit.

4.1 Selektive Steuerung der RNA-Interferenz durch das GAL4/UAS System

Ein wichtiges Ziel dieser Arbeit war die Charakterisierung ausgewählter Gene der Familie der inhibitorischen Liganden-gesteuerten Chlorid-Kanäle. Ein zentraler Aspekt bei der Charakterisierung von Genen ist ihre Funktion im Organismus. In der vorliegenden Arbeit ist es erstmalig gelungen temporäre *knockouts* für verschiedene Untereinheiten dieser Klasse von Rezeptoren bei *D. melanogaster* zu erzeugen. Das hierfür verwendete GAL4/UAS System ermöglicht, dass das zu untersuchende Gen durch die zeit- und gewebespezifisch gesteuerte Induktion der RNA-Interferenz exakt analysiert werden kann (Brand und Perrimon, 1993; Duffy, 2002). Der Begriff *knockout*

bezeichnet hierbei nicht das Ausschalten des Gens, sondern die reduzierte Expression des Proteins.

Im Vergleich zur homologen Rekombination, mit der ortspezifische Mutationen und Deletionen eingeführt werden können und die häufig zur Erzeugung von *knockouts* bei Mäusen eingesetzt werden (Capecchi, 1994; Moreadith und Radford, 1997), bietet das GAL4/UAS System zahlreiche Vorteile. Die Erzeugung genomischer *knockouts* ist eine sehr zeitintensive und kostspielige Methode. Außerdem hat sie den Nachteil, dass die Deletion einzelner Gene oftmals zu letalen Entwicklungsstörungen führt. Die Funktion derartiger Gene kann daher mit dieser Methode nicht analysiert werden. Auch ist ein solcher genomischer *knockout* nicht gewebespezifisch steuerbar.

Das Cre-loxP-System bietet wie auch das GAL4/UAS System die Möglichkeit das Zielgen erst zu einem späteren Entwicklungszeitpunkt oder in bestimmten Geweben auszuschalten (Ray et al., 2000). Auch bei diesem System kommt der *knockout* Effekt erst nach einer Kreuzung mit einer weiteren transgenen Linie zum tragen. Im Gegensatz zu der Aktivierung der Transkription durch die Kreuzung von Treiber- und Effektorlinie beim GAL4/UAS System, weisen beim Cre-loxP-System jedoch nur 25% der Tiere der F1 Generation einen konditionalen *knockout* auf. Eine weitere zeit- und kostenintensive Etablierung einer transgenen Linie aus den Tieren der F1 Generation ist notwendig. Ein derartiger Prozess entfällt beim GAL4/UAS System. Bei allen aus den Kreuzungen der Treiber- und Effektorlinie stammenden Tiere der F1 Generation ist das GAL4/UAS System aktiv.

In der vorliegenden Arbeit konnte diese Methode in der Arbeitsgruppe etabliert und die Funktionalität dieses System für verschiedenen Untereinheiten der Liganden-gesteuerten Chlorid-Kanälen von *D. melanogaster* nachgewiesen werden.

4.2 Der Histamin-gesteuerte Chlorid-Kanal von *Drosophila melanogaster*

Im Rahmen dieser Doktorarbeit ist es gelungen die zwei potentiellen Untereinheiten des Histamin-gesteuerten Chlorid-Kanals *Dm* HA-Cl I und II zu identifizieren und teilweise zu charakterisieren. Die Identifizierung erfolgte primär über die Analyse des Expressionsmusters und konnte sowohl auf gewebe- als auch auf zellspezifischer Ebene

aufgeklärt werden. Zusätzlich konnten erste Aussagen über die entwicklungspezifische Expression des *Dm* HA-Cl II Gens gemacht werden.

Durch eine vollständige Ermittlung der Nukleotid-Sequenz und einen anschließenden Homologievergleich mit der genomischen Sequenz war es möglich Aussagen über die genomische Organisation dieser Gene zu machen. Des Weiteren wurde mittels einer 5'-RACE der genaue Transkriptionsstart bestimmt.

Um Aussagen über die *in vivo* Funktion eines Gens machen zu können, ist jedoch kaum eine Analyse so gehaltvoll wie die von *knockout* Tieren. Es ist gelungen für die *Dm* HA-Cl II Untereinheiten eine transgene UAS/RNAi Linie (s. 2.18.1 und 3.5.1) zu generieren und erste phänotypische Analysen dieser temporären *knockout* Fliegen durchzuführen. Für die *Dm* HA-Cl I Untereinheit ist die Erzeugung des entsprechenden pUAST-RNAi Vektors gelungen, so dass alle Voraussetzungen für die Generierung transgener Fliegen dieser Linie geschaffen wurden.

4.2.1 Expressionsmuster

Die Identifizierung der beiden Untereinheiten erfolgte primär über die Analyse des Expressionsmusters. Dies basierte auf den Kenntnissen, die aufgrund von elektrophysiologischen Studien zu diesem Kanal und immunhistochemischen Analysen der Histidin Decarboxylase gemacht wurden und eine ausschließliche Expression in den optischen Loben und dem Thorakalganglion vermuten ließen (Hardie, 1989; Melzig et al., 1996). Durch eine erste Analyse des Expressionsmusters sämtlicher inhibitorischer Liganden-gesteuerter Ionenkanäle von *Drosophila* (exklusiv der Gene *GluCl* und *Grd*) mittels einer gewebespezifischen RT-PCR ist es gelungen die Anzahl der in Frage kommenden Kandidaten dieser Gruppe auf zwei Gene einzuschränken. Hierbei handelte es sich um die Gene CT22815 und CT34515 (später *Dm* HA-Cl I und II), deren Expression nur in den optischen Loben und dem Thorakalganglion nachzuweisen war.

Eine detailliertere Analyse des Expressionsmuster des *Dm* HA-Cl I Gens durch *in-situ* Hybridisierungen zeigte innerhalb der Lamina die exklusive Expression der Gene in den Lamina Monopolarzellen (LMC) L1-3, was in dem Fall, dass es sich hierbei um die Histaminrezeptoren handelt, darauf schließen lässt, dass die Photorezeptoren R1-R6 nur mit dieser Subpopulation postsynaptisch verbunden sind. Dies wird durch die Kenntnisse über die Architektur des visuellen Systems bestätigt (Braitenberg, 1967;

Fischbach und Dittrich, 1989), nach dem die Lamina Monopolarzellen in direktem Kontakt zu den Photorezeptoren R1-R6 der Retina stehen.

Die begrenzte Anzahl an Zellen in der Medulla, in denen die Gene nachgewiesen werden konnten passt zu den Kenntnissen über die Verschaltung der Photorezeptoren R7 und R8, die hier synaptische Kontakte zu bisher noch unidentifizierten Neuronen bilden (Fischbach und Dittrich, 1989; Shaw et al., 1989). Die Summe von ~800 detektierten Zellen innerhalb der Medulla pro Komplexauge lässt in dem Fall, dass es sich hier um den postsynaptischen Rezeptor der Photorezeptoren handelt aufgrund der ungefähren Anzahl von 800 Ommatidien pro Komplexauge auf eine 2:1 Verschaltung der Photorezeptoren auf die postsynaptischen Zellen schließen.

Nur eine sehr begrenzte Anzahl an Zellen im Zentralgehirn bildet synaptische Kontakte zu den Photorezeptoren der Ocellen (Mizunami, 1995). Daher ist es wahrscheinlich, dass es sich bei den ~20 Zellen im dorsalen Bereich des Zentralgehirns, die mittels der *in-situ* Hybridisierung der *Dm* HA-CI I spezifischen Sonde detektiert werden konnten, um die ersten Interneurone der Ocellarzellen handelt.

Die extrem schwachen Hybridisierungssignale für die mRNA des *Dm* HA-CI II Gens lassen sich nur schwer erklären. Die Transkription der mRNAs beider Gene konnte jedoch in den RT-PCR Experimenten gezeigt werden und fand in einem Vergleichbaren Maß statt. Durch die Erzeugung einer transgenen Promotor-GAL4 *Dm* HA-CI II Linie (s.u.) war es möglich, eine genauere Analyse der Rezeptor exprimierenden Zellen dieses Gens durchzuführen. Es zeigte sich, dass auch dieses Gen innerhalb der Lamina nur in den Lamina Monopolarzellen (LMC) exprimiert wird, die postsynaptisch mit den Photorezeptoren R1-6 verbunden sind (Braitenberg, 1967; Fischbach und Dittrich, 1989). Eine erste Analyse dieser Neurone lässt darauf schließen, dass es sich hierbei um die Lamina Monopolarzellen L1 und L2 handelt. Diese Vermutung basiert auf Untersuchungen von Fischbach und Dittrich, nach denen die Axone der LMCs in unterschiedlichen Schichten des Medulla-Neuropils enden (Fischbach und Dittrich, 1989). Weitere Untersuchungen sind hier jedoch unbedingt notwendig. Bei den vereinzelt Somata im Medulla-Cortex, die diese Untereinheit exprimieren, handelt es sich vermutlich um die postsynaptischen Zellen der Photorezeptoren R7 und R8 (s.o.).

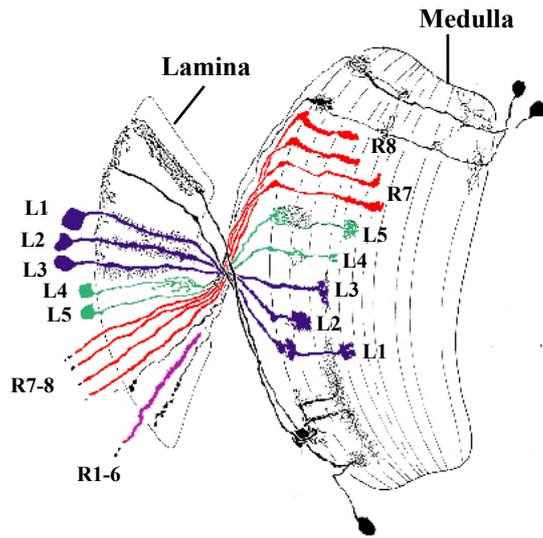


Abbildung 4.2.1-1: Neuronale Organisation der Photorezeptorzellen und Lamina Monopolarzellen im optischen Lobus von *D. melanogaster*. Die Photorezeptoren R1-6 bilden in der Lamina synaptische Kontakte mit den Lamina Monopolarzellen, welche in die Medulla projizieren und hier in verschiedenen Schichten enden. Die Axone der Photorezeptoren R7 und R8 durchziehen die Lamina und bilden in der Medulla synaptische Kontakte zu bisher noch nicht identifizierten Neuronen. R = Photorezeptorzellen, L = Lamina Monopolarzellen. Modifiziertes Schema aus (Fischbach und Dittrich, 1989)

Zusammenfassend ist zu sagen, dass in den optischen Loben nur in den postsynaptischen Zellen der Photorezeptoren die Transkription beider Gene erfolgte, was die Schlussfolgerung erhärtet, wonach es sich bei diesen Genen um zwei Untereinheiten des Histamin-gesteuerten Chlorid-Kanals handelt. Diese Folgerung wird durch die Ergebnisse zweier weiterer Gruppen bestätigt, die zeitgleich aber mit anderen Methoden ebenfalls die Gene CT22815 und CT34515 als Untereinheiten des Histamin-gesteuerten Chlorid-Kanals identifizierten (Gisselmann et al., 2002; Zheng et al., 2002).

Bei den Untersuchungen zum entwicklungspezifischen Expressionsmuster der Gene zeigte sich, dass für das *Dm* HA-Cl II Gen in verschiedenen Stadien zwei Transkripte nachweisbar waren. Beide Transkripte sind in ihrer Größe sehr ähnlich und entsprechen mit ~1700nt der mRNA Länge des Gens. Da es sich dabei um zwei klare distinkte Banden ähnlicher Größe handelt ist es sehr unwahrscheinlich, dass dies auf eine Degradation der RNA zurückzuführen ist, da diese sich aufgrund vieler verschiedener hieraus resultierender Produkte eher als eine Art Schmier darstellen würde. Auch spricht der geringe Größenunterschied der beiden Banden eher dafür, dass es sich hierbei um zwei Spleißvarianten eines Gens handelt, was für andere Mitglieder dieser Familie von ionotropen Rezeptoren bereits beschrieben wurde (Hosie et al., 2001). Dies wird durch eine Untersuchung zweier cDNA Klone dieses Gens unterstützt, bei denen eine Deletion von 4 Aminosäuren (Ser³⁷⁵-Ala-Leu-Gln³⁷⁸) innerhalb der interzellularen M3-M4 Schleife nachgewiesen werden konnte (Zheng et al., 2002). Ein funktioneller Unterschied dieser zwei Spleißvarianten konnte bisher noch nicht gezeigt werden.

Da Histamin nur bei adulten *Drosophilas* als alleiniger Transmitter der Photorezeptoren fungiert (Melzig et al., 1996), erscheint es sehr unwahrscheinlich, dass die Transkription des Gens in den Embryonalstadien auf seine Funktion im visuellen System zurückzuführen ist. Daher ist anzunehmen, dass die Expression des Proteins in diesem Entwicklungsstadien auf seine Relevanz als Untereinheit des postsynaptischen Rezeptors der Mechanorezeptoren (Buchner et al., 1993) zurückzuführen ist.

Die extrem schwachen Signale des *Dm* HA-Cl II Gens sowie die fehlenden Signale des *Dm* HA-Cl I Gens in den Northern Blot Analysen führten zu der Annahme, dass die mRNA Menge dieser Gene in den gesamt RNA Extrakten für einen Nachweis mit diesem System zu gering ist. Dies wird durch die sensitiveren Ergebnisse der RT-PCR Analysen untermauert, mit welcher die Transkription der Gene bei adulten Tieren nachgewiesen werden konnte.

Aus den oben genannten Gründen ist davon auszugehen, dass die Sensitivität der Nachweismethode für eine Untersuchung der entwicklungspezifischen Expression dieser schwach exprimierten Gene nicht ausreichend war. Für derartige Untersuchungen ist daher auf andere Methoden zurückzugreifen, wie z.B. die gezielte Expression eines Markerproteins wie GFP an dem Ort und Zeitpunkt der Rezeptorexpression.

Durch die Erzeugung von Promotor-GAL4-Fusionsvektoren für beide Gene, sowie die Herstellung einer transgenen Promotor-GAL4 *Dm* HA-Cl II Linie in Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Prof. Heisenberg (s. 3.2.4), wurden während dieser Doktorarbeit alle Voraussetzungen für derartige weiterführende Experimente geschaffen. Hierdurch wird es möglich, die Expression der Untereinheiten des Histamin-gesteuerten Chlorid-Kanals zu jedem Zeitpunkt der Entwicklung genau zu verfolgen und analysieren. Zusätzlich bietet eine derartige Linie neue Möglichkeiten für eine Transkriptomanalyse der postsynaptischen Zellen der Photorezeptoren.

4.2.2 Topologie und Phylogenie

Die Ermittlung der Nukleotid-Sequenz der *Dm* HA-Cl I Rezeptor-cDNA und die Komplettierung dieser Ergebnisse mit den aus der 5'- und 3'-RACE ermittelten Sequenzen ergab eine Gesamtlänge von 2186bp für die cDNA dieses Gens. Dies entsprach jedoch nicht dem vom *Drosophila* Genomprojekt vorhergesagten Aufbau, der eine mRNA Länge von 1458nt vorhersagte. Es konnte nachgewiesen werden, dass die

kompletten 5'- und 3'- untranslatierten Regionen (UTR) des Gens in diesen Vorhersagen nicht erfasst worden sind.

Die vollständige Ermittlung der Nukleotid-Sequenz des *Dm* HA-Cl II Gens ergab eine Gesamtlänge von 1760bp für die cDNA dieses Gens. Auch dies stimmte nicht mit der vorhergesagten mRNA Länge von 1164nt dieses Gens vom *Drosophila* Genomprojekt überein. Die Abweichung lässt sich ebenfalls auf die nicht analysierten 5'- und 3'-UTR Regionen der Vorhersage zurückführen.

Diesen Regionen kommt jedoch aufgrund ihrer Eigenschaften in Bezug auf die Regulation der genetischen Aktivität eine große Bedeutung zu (Kohn et al., 2003; Kuersten und Goodwin, 2003). Dies macht die Notwendigkeit einer exakten Bestimmung des Transkriptionsstarts, trotz bestehender Sequenz-Vorhersagen, deutlich. Die zum Teil extrem kurzen Introns von ~60bp beider Gene, die für ein Spleißen in Vertebraten viel zu kurz wären, sind typisch für die Mitglieder der Familie der Liganden-gesteuerten Chlorid-Kanäle von *Drosophila*. Nur für die Gene Rdl, CT5896 und CT19189 konnten keine derartig kurzen Introns nachgewiesen werden (Adams et al., 2000). Aber auch sehr große Introns wie das 6,2kbp umfassenden Intron Nr.3 aus dem Rdl Gen kann durch Spleißen aus der prä-mRNA entfernt werden (Hosie et al., 2001).

Zusammenfassend kann gesagt werden das es sich bei der strukturellen Zusammensetzung der Gene um einen für *D. melanogaster* typischen Aufbau handelt. Die aufgrund der Sequenzen vorhergesagte Topologie der beiden Rezeptor Untereinheiten ist mit den 4 Transmembrandomänen und der N-terminalen Cys-Cys Schleife charakteristisch für die Familie der Liganden-gesteuerten Ionenkanäle.

Ein Vergleich der aus den Nukleotidsequenzen resultierenden Aminosäuresequenzen beider Gene mit weiteren Mitgliedern der Familie der Liganden-gesteuerten Chlorid-Kanäle von Vertebraten und Invertebraten zeigt, dass mit 42% die größte Homologie zwischen den Genen *Dm* HA-Cl I und II besteht. Die hohe Homologie dieser Gruppe zu den Glycin Rezeptoren der Vertebraten lässt vermuten, dass es keine den *Dm* HA-Cl I und II Genen entsprechenden homologen Gene bei Vertebraten gibt und beide Gruppen denselben genetischen Ursprung haben. Dies stimmt mit den Kenntnissen überein, nach denen Histamin bei Vertebraten bisher nur als Transmitter metabotroper Rezeptoren bekannt ist (Parsons, 1991; Lovenberg et al., 1999). Im Gegensatz dazu konnten bei Invertebraten bisher keine metabotropen Histaminrezeptoren (Roeder, 2003) oder ionotrope Glycin Rezeptoren identifiziert werden, was die oben postulierte Annahme unterstützt, wonach es keine den ionotropen Histaminrezeptor homologe Rezeptoren bei

Vertebraten gibt. Histamin konnte bisher jedoch nicht nur in den postsynaptischen Zellen der Photorezeptoren bei Insekten nachgewiesen werden, sondern auch in einer großer Anzahl von Zellen im Zentralgehirn (Bornhauser und Meyer, 1997). Eine mögliche Erklärung dieses Phänomens wäre, dass noch andere, bisher nicht als solche identifizierte Untereinheiten an der Bildung des nativen Histamin-gesteuerten Ionenkanals bei Insekten beteiligt sind. Daher stellt sich die Frage der Zusammensetzung der Untereinheiten dieses Rezeptors. Als potentielle Kandidaten kämen hierbei alle Untereinheiten in Frage die ebenfalls in den postsynaptischen Zellen der Photorezeptoren exprimiert werden. Eine weitere Möglichkeit wäre jedoch auch das Vorkommen eines zweiten, eventuell metabotropen Histamin Rezeptors.

4.2.3 *In vivo* Funktion der Untereinheiten *Dm* HA-Cl I und II

Der Untersuchung der *in vivo* Funktion eines Gens kommt bei seiner Beschreibung eine zentrale Bedeutung zu. Es ist bisher noch weitgehend ungeklärt, wie die Zusammensetzung der Untereinheiten des nativen Histamin-gesteuerten Chlorid-Kanals aussieht. Es ist jedoch bekannt, dass die beiden Untereinheiten *Dm* HA-Cl I und II auch einzeln bei der heterologen Expression in Oocyten in der Lage sind, einen funktionellen homomeren Kanal zu bilden (Gisselmann et al., 2002; Zheng et al., 2002). Daher stellte sich die Frage, welche Rolle einer einzelnen Untereinheit in Bezug auf ihre Funktion im Organismus zukommt und ob die selektive Reduktion selbiger kompensiert werden kann.

Im Rahmen dieser Doktorarbeit ist es erstmalig gelungen, mit Hilfe der RNA-Interferenz temporäre *knockout* Fliegen des *Dm* HA-Cl II Gens zu erzeugen. Die Aktivierung der Transkription der dsRNA dieser UAS-RNAi Linie erfolgte durch eine Kreuzung mit der GAL4-Hsp70 Treiberlinie, die zu einer ubiquitären Expression der dsRNA führt (s. 3.5.2). Die mit 40.42 ± 2.58 sec/min signifikant erhöhte Laufdauer gegenüber 8.44 ± 1.85 sec/min beim Wildtyp ist auf die Interaktion der erzeugten dsRNA mit der korrespondierenden mRNA des Rezeptors zurückzuführen. Im Gegensatz dazu ist eine signifikante Reduktion der Ruhe- und Putzzeiten zu beobachten gewesen. Für den Histamin-gesteuerten Chlorid-Kanal von *D. melanogaster* sind zwei unterschiedliche Funktionen bekannt: einerseits als postsynaptischer Rezeptor der Photorezeptoren im visuellen System (Hardie, 1989; Nassel, 1999) und andererseits als postsynaptischer Rezeptor der Haarsensillen im mechanosensorischen System (Buchner

et al., 1993). Es ist zu vermuten, dass die Veränderung der Vitalitätsparameter auf die Funktion der Untereinheit innerhalb des postsynaptischen Rezeptors der mechanosensorischen Neurone der Haarsensillen zurückzuführen sind. Insbesondere die mit 8.77 ± 1.94 sec/min signifikant verkürzte Putzdauer im Vergleich zu 14.94 ± 1.78 sec/min beim Wildtyp ist ein deutliches Indiz für die Bedeutung des Rezeptors im mechanosensorischen System, in dem der Histaminrezeptor eine wichtige Rolle bei der effizienten Pflege der Körperoberfläche von *Drosophila* spielt (Melzig et al., 1996).

Die Auswirkungen des temporären *knockouts* des *Dm* HA-Cl II Gens auf den Entwicklungszyklus sowie auf die Lebensdauer der Tiere war eklatant. Die mit bis zu 50% hohe Letalität in den Larval- und Puppenstadium war nicht erwartet worden und ist nicht mit der Funktion des Rezeptors im visuellen System zu erklären.

Es ist jedoch ein Beweis dafür, dass die reduzierte Expression dieser Untereinheit nicht vom Organismus ausgeglichen werden kann. Die zweite identifizierte Untereinheit *Dm* HA-Cl I ist demnach alleine offensichtlich nicht in der Lage, *in vivo* einen voll funktionsfähigen Chlorid-Kanal zu bilden und den Mangel des *Dm* HA-Cl II Proteins zu kompensieren.

Ob umgekehrt die *Dm* HA-Cl II Untereinheit in der Lage ist, einen Mangel des *Dm* HA-Cl I Proteins zu kompensieren, bleibt ungewiss. In elektrophysiologischen Untersuchungen konnte nachgewiesen werden, dass diese Untereinheit eine höhere Sensitivität gegenüber Histamin besitzt als die *Dm* HA-Cl I Untereinheit (Gisselmann et al., 2002). Bisher sind zahlreiche Mutationen des *ort* (*ora transientless*) Gens bekannt, welches das *Dm* HA-Cl I Transkript enthält, bei denen die hieraus resultierenden Tiere Defekte in der synaptischen Transmission der Photorezeptoren aufweisen (Gengs et al., 2002). Eine Untersuchung der temporären *Dm* HA-Cl II *knockout* Fliegen mittels eines ERG auf ebensolche Defekte wäre daher besonders interessant und würde weitere Aufschlüsse über die Funktion dieses Gens geben.

Es ist zu vermuten, dass auch die *Dm* HA-Cl I Untereinheit essentiell ist und ein Funktionsverlust des Gens nicht vollständig kompensiert werden kann. Defekte wie sie bei dem temporären *knockout* des *Dm* HA-Cl II Gens beobachtet wurden und die vermutlich auf die Rolle des Rezeptors im mechanosensorischen System zurückzuführen sind, wurden für diese Tiere noch nicht beschrieben. Erste Untersuchungen an Mutanten des *ort* Gens weisen jedoch auf eine Verhaltensänderung der Tiere nach einem mechanischen Schock hin, welche nicht auf die Funktion des Gens im visuellen System zurückzuführen ist (Iovchev et al., 2002).

Es ist bemerkenswert, dass der Verlust eines der beiden Gene des Histamin-gesteuerten Chlorid-Kanals offensichtlich nicht kompensiert werden kann, da nachgewiesen werden konnte, dass beide Untereinheit bei einer heterologen Expression in *Xenopus* Oocyten in der Lage sind, einen funktionellen homomultimeren Kanal zu bilden (Gisselmann et al., 2002; Zheng et al., 2002). Es wäre denkbar, dass dies auf die geringeren Sensitivität der homomultimeren Kanäle im Vergleich zu dem aus einer Coexpression beider Untereinheiten resultierenden heteromultimeren Kanal (Zheng et al., 2002) zurückzuführen ist.

Die Funktion des *Dm* HA-Cl I Gens in Bezug auf die Vitalität und den Entwicklungszyklus der Fliegen ist bisher noch weitgehend ungeklärt. Aufschluss darüber kann nur ein *knockout* des Gens geben, für welchen durch die Erzeugung eines genspezifischen pUAST-RNAi Vektors und die Injektion desselbigen in *Drosophila* Embryonen zur Erzeugung einer transgenen UAS-RNAi Linie bereits alle Voraussetzungen geschaffen wurden.

4.3 Spezifische Expression der Liganden-gesteuerten Chlorid-Kanäle von *D. melanogaster*

Die Ermittlung des räumlichen und zeitlichen Expressionsmusters der Untereinheiten der Liganden-gesteuerten Chlorid-Kanäle ist für das Wissen über das Zusammenspiel einzelner Untereinheiten von großer Bedeutung. Wie intensive Studien an den nicotinischen Acetylcholin- und GABA_A Rezeptoren der Säugetiere zeigten, ist hier die pentamere Struktur des Kanals aus zwei identischen und drei verschiedenen Untereinheiten aufgebaut (Betz, 1990; Macdonald und Olsen, 1994). Wie jedoch der Aufbau der Liganden-gesteuerten Chlorid-Kanäle bei *Drosophila* aussieht, ist noch weitgehend ungeklärt. Dies macht die enorme Bedeutung der Coexpression einzelner Untereinheiten und damit potentieller Interaktionspartner deutlich. Erst hierdurch wird eine umfassende Charakterisierung dieser Kanäle möglich.

	Ant	Ret	oL	zG	Tg	Mu	D	E	L	P	A
CT19189	+	+	+	+	+	+	+	/	/	/	/
CT21430	+	-	+	-	-	-	-	+	+	+	+
CT23187	+	+	+	+	+	+	+	/	/	/	/
CT23391	-	-	-	-	-	-	-	/	/	/	/
CT25610	-	-	+	+	+	-	-	/	/	/	/
CT5896	-	-	+	+	+	-	-	/	/	/	/
<i>Dm</i> HA-Cl I	-	-	+	-	+	-	-	/	/	/	/
<i>Dm</i> HA-Cl II	-	-	+	-	+	-	-	+	-	-	-
GluCl	/	/	+	+	+	+	/	+	+	+	+
Rdl	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-
Grd	/	/	/	/	/	/	/	+	+	+	+
Lcch3	-	-	+	+	+	-	-	+	-	-	-

Tabelle 4.3-1: Übersicht über die zeit- und gewebespezifische Expression der Mitglieder der Familie der inhibitorischen Liganden-gesteuerten Chlorid-Kanäle von *Drosophila melanogaster*. Aufgeführt sind die Expressionsmuster sämtlicher Mitglieder dieser Genfamilie in verschiedenen Geweben (Ant-D) und Entwicklungsstadien (E-A). Ant = Antenne; Ret = Retina; oL = optischer Lobus; zG = zentral Gehirn; Tg = Thorakalganglion; Mu = Muskel; D = Darm; E = Embryo; L = Larve; P = Puppe; A = adult; + = Expression konnte nachgewiesen werden; - = Expression konnte nicht nachgewiesen werden; / = wurde nicht untersucht.

Durch die Untersuchung des gewebespezifischen Expressionsmusters der Mitglieder dieser Ionenkanal Familie konnte eine erste Einteilung selbiger in 4 Gruppen durchgeführt werden (s. 3.4). Diese Einteilung erfolgte, weil nur Gene gemeinsam einen Kanal bilden können, die auch gemeinsam exprimiert werden. Dies bedeutet, dass Untereinheiten, die keinerlei Überlappungen in ihrem Expressionsmuster haben, als mögliche Interaktionspartner eines Kanals nicht in Frage kommen. Da die Möglichkeit besteht, dass zwei Gene in identischen Geweben jedoch in verschiedenen Zellen innerhalb dieser Gewebe exprimiert werden und somit trotzdem nicht als mögliche Interaktionspartner in Frage kommen, wurden diese Ergebnisse mittels *in-situ* Hybridisierungen für ausgesuchte Mitglieder aller 4 Gruppen verifiziert (s. 3.4).

Mit Hilfe dieser detaillierten Analyse konnte gezeigt werden, dass es sich bei allen gewebespezifischen Expressionen mit Ausnahme der vierten Gruppe, welche die beiden Untereinheiten des Histamin-gesteuerten Chlorid-Kanals enthält, um eine ubiquitäre Verteilung innerhalb der Gewebe handelt. Hierbei fiel auf, dass keineswegs jene Gene

in die gleiche Gruppe fielen, welche die selben Homologien zu bereits identifizierten Liganden-gesteuerten Chlorid-Kanäle haben. Daher stellt sich die Frage, ob Untereinheiten mit verschiedenen Ligandenbindungsstellen gemeinsam einen funktionellen Kanal bilden können. Wie Untersuchungen anhand der GABA Rezeptor Untereinheit Rdl und Glutamat Rezeptor Untereinheit GluCl (Cully et al., 1996) zeigen, ist das Zusammenspiel zweier Untereinheiten mit Ligandenbindungsstellen für unterschiedliche Neurotransmitter innerhalb eines Kanals durchaus möglich (Ludmerer et al., 2002). Daher kommt die erste Gruppe, die in allen untersuchten Geweben exprimiert wird als potentieller Interaktionspartner für alle Untereinheiten der Familie der Liganden-gesteuerten Chlorid-Kanäle in Frage.

Die zweite Gruppe wird ausschließlich im Nervensystem exprimiert und umfasst die Gene CT5896, CT25610 und Lcch3. Ein Zusammenwirken dieser Untereinheiten innerhalb eines heteromultimeren Kanals ist nicht auszuschließen. Aber auch alle anderen Mitglieder dieser Genfamilie, die ebenfalls in diesen Geweben exprimiert werden kommen als möglich Interaktionspartner in Frage.

Die dritte Gruppe umfasste die Gene CT21430 und Rdl. Diese Gruppe zeigt eine sehr heterogene Expression in Geweben des Nervensystems und peripheren Geweben. Das Rdl Gen gehört zu den GABA Rezeptoren (Hosie et al., 1997) und ist als Ziel für Insektizide von großer Bedeutung. Wie Studien an diesem Gen belegen, ist diese Untereinheit in der Lage alleine einen funktionellen homomeren Kanal zu bilden. Untersuchungen an nativen GABA Rezeptoren deuten jedoch darauf hin, dass es sich hierbei um keine Rdl Homomultimere handelt (Zhang et al., 1995). Ein Zusammenspiel der beiden GABA Rezeptor Untereinheiten Rdl und Lcch3 ist aufgrund des gewebespezifischen Expressionsmusters im Nervensystem nicht auszuschließen (s.o.). Innerhalb der peripheren Gewebe ist dies jedoch nicht möglich, da hier nur das Rdl Gen exprimiert wird. Die Co-Expression beider Gene führt jedoch zu einer reduzierten GABA Sensitivität und einer kürzeren Öffnungszeit des Kanals (Zhang et al., 1995). Insgesamt erscheint es daher unwahrscheinlich, dass diese beiden GABA Rezeptor Untereinheiten *in vivo* gemeinsam einen Kanal bilden.

Bei dem CT21430 Gen handelt es sich um ein Homolog zu den Glycin-gesteuerten Chlorid-Kanälen von Vertebraten. Die exklusive Expression in den Antennen und optischen Loben macht dieses Gen besonders interessant. Ein derartig spezielles Expressionsmuster konnte für kein weiteres Gen dieser Familie nachgewiesen werden. Die Expression in den Antennen deutet auf eine Funktion im olfaktorischen System der Fliegen hin. Bisher sind als Riechrezeptoren für *Drosophila* jedoch nur Mitglieder der

Familie der 7-Helix-Rezeptoren beschrieben worden (Vosshall et al., 1999). Als potentielle Interaktionspartner kommen für dieses Gen alle Gene in Frage die ebenfalls in diesen Geweben exprimiert werden.

GABAerge Neurone und GABA Rezeptoren sind im Zentralen Nervensystem von *Drosophila melanogaster* in allen Entwicklungsstadien zu finden (Buchner et al., 1988; Jackson et al., 1990; Harrison et al., 1996; Yasuyama et al., 2002). Aufgrund der Rolle dieses Rezeptors als Ziel für Insektizide (Ffrench-Constant et al., 1993; Stilwell et al., 1995; Hosie et al., 1996; Ludmerer et al., 2002) ist die entwicklungspezifische Expression der Gene der einzelnen Untereinheiten dieser Gruppe besonders interessant. Das einzige Gen dieser Gruppe, das den Erwartungen entsprechend in allen Entwicklungsstadien mittels Northern Blot Analysen nachgewiesen werden konnte, war das Grd Gen. Von dem CT23391 Gen ausgenommen konnte jedoch die Expression aller Gene bei adulten Fliegen in der gewebespezifischen Expressionsanalyse nachgewiesen werden (s. 3.4). Da jedoch nicht alle untersuchten Gene im Northern Blot bei den adulten Tieren nachgewiesen werden konnten, sind die Ergebnisse der Analyse kritisch zu betrachten, da die Sensitivität des Systems für schwach exprimierte Gene offensichtlich nicht groß genug ist.

Dessen ungeachtet ist der Nachweis gelungen, dass das Lcch3 Gen in einem Großteil der Embryonalstadien in einem stärkeren Maß exprimiert wird als in den Larval- und Puppenstadien oder auch bei adulten Tieren. Diese Regulation der Transkription deutet darauf hin, dass dem Lcch3 Gen in diesen Entwicklungsstadien eine besondere Bedeutung zukommt. Diese Vermutung wird durch die wichtige Rolle des GABAergen Systems in der frühen neuronalen Entwicklung der Embryonen (Kulkarni et al., 1994) bestätigt. Möglicherweise erklärt dies auch das Vorkommen des ca. 500nt kleineren Transkripts in den frühen Embryonalstadien, bei dem es sich vermutlich um eine Spleißvariante des Gens handelt (s. 3.3).

Auch für das Rdl Gen konnte eine entwicklungspezifische Expression von den späten Embryonalstadien bis zum Beginn des Pupariums festgestellt werden. Der Nachweis zweier unterschiedlich großer Transkripte des Rdl Gens im Northern Blot deutet auf die Existenz einer Spleißvariante hin, welche bisher noch nicht identifiziert wurde. Bislang sind 3 Spleißvarianten dieses Gens bekannt. Die drei alternativen Spleißprozesse finden in den Exons 3 und 6 statt, die für die extrazelluläre N-terminale Domäne kodieren und vermutlich zu einer veränderten Sensitivität des Rezeptors gegenüber dem Agonisten führen (Ffrench-Constant und Rocheleau, 1993; Hosie et al., 2001). Hiermit

übereinstimmend ist festgestellt worden, dass die Kinetik rekombinanter GABA_A Rezeptoren von der Zusammensetzung ihrer Untereinheiten abhängig ist und durch das Vorkommen unterschiedlicher α -Isoformen beeinflusst wird (Angelotti und Macdonald, 1993; Mathews et al., 1994; Verdoorn, 1994; Gingrich et al., 1995; Brussaard et al., 1997). Hierdurch wird die enorme Bedeutung mehrerer Spleißvarianten eines Gens deutlich. Der Grund der erhöhten Transkriptionsrate des Gens in den späten Embryonal- und den Larvalstadien, ebenso wie das zusätzliche Auftreten einer weiteren Spleißvariante von den 20 Stunden alten Embryonen bis zu den L2 Larven ist bisher noch ungeklärt. Möglicherweise steht dies in Zusammenhang mit der bei adulten Tieren ermittelten starken Expression im Nervensystem (s.o.), die in den späten Embryonalstadien und in den Larvalstadien zunehmend an Bedeutung gewinnt. Ebenfalls denkbar wäre, dass die erhöhte Transkription in diesen Stadien mit der Funktion des GABA Rezeptors hinsichtlich der Lokomotion und Geotaxis (Leal und Neckameyer, 2002), die auch in den Larvalstadien wichtige Funktionen erfüllt, im Zusammenhang steht.

Abschließend kann gesagt werden, dass die drei GABA Rezeptor Untereinheiten Grd, Lcch3 und Rdl alle verschiedene entwicklungspezifische Expressionsmuster aufweisen, was die Vermutung weiter erhärtet, dass die Lcch3 und Rdl Untereinheiten keinen gemeinsamen Chlorid-Kanal bilden (s.o.).

In zahlreichen Untersuchungen an Glutamat-gesteuerten Chlorid-Kanälen konnte gezeigt werden, dass die Expression in Muskel und Nervenzellen stattfindet (Giles und Usherwood, 1985; Horseman et al., 1988; Delgado et al., 1989). Mittels der Northern Blot Analysen ist es zusätzlich gelungen nachzuweisen, dass das GluCl Gen in allen Entwicklungsstadien gleichstark exprimiert wird (s. 3.3). Hierdurch konnte gezeigt werden, dass es sich um kein entwicklungspezifisch reguliertes Gen handelt. Die stets gleichstarke Expression macht jedoch die Relevanz des Gens zu allen Zeitpunkten der Entwicklung deutlich. Hierdurch gewinnt dieser Rezeptor weitere Bedeutung als Ziel für mögliche Insektizide, da diese zu jedem Zeitpunkt der Entwicklung ihre Wirkung entfalten könnten.

Pharmakologische Studien an homomultimeren GluCl Kanälen zeigen das diese Kanäle nicht den nativen Kanälen entsprechen. Folglich bildet auch diese Untereinheit mit anderen Proteinen zusammen einen heteromultimeren Kanal (Smith et al., 2000). Die Coexpression der GluCl und Rdl Untereinheiten ist unterdessen bekannt (Ludmerer et al., 2002). Wie anhand der Ergebnisse der entwicklungspezifischen Expression der Rdl und GluCl Gene zu erkennen ist, unterscheiden sich beide jedoch in ihrem zeitlichen

Expressionsmuster. Das GluCl Gen konnte auch in den frühen Embryonalstadien und den Puppenstadien in einem detektierbaren Maß nachgewiesen werden, was für das Rdl Gen nicht der Fall war. Dies lässt darauf schließen, dass die beiden Untereinheiten nicht in allen Entwicklungsstadien gemeinsam einen heteromultimeren Kanal bilden. Diese Vermutung wird durch Untersuchungen an Membranen des Kopfes von *Drosophila melanogaster* bestätigt, nach denen nur 65% der Ivermectin sensitiven Rezeptoren sowohl die Rdl als auch die GluCl Untereinheit enthalten. Die restlichen 35% enthalten zwar die GluCl-, nicht jedoch die Rdl Untereinheit (Ludmerer et al., 2002). Die Zusammensetzung der restlichen Untereinheiten dieser Kanäle ist bisher noch ungeklärt. Als potentielle Kandidaten kämen hierfür alle Gene der Familie der Liganden-gesteuerten Chlorid-Kanäle in Frage, die Überschneidungen im Expressionsmuster aufweisen.

Zusätzlich zu den Mitgliedern der GABA und Glutamat Rezeptoren sowie der Untereinheiten des Histamin Rezeptors (s.o.) wurde noch die entwicklungspezifische Expression des CT21430 Gens analysiert. Es konnte nachweisen werden, dass dieses Gen ebenfalls in allen Entwicklungsstadien exprimiert wird. Das Auftreten zweier klarer distinkter Banden ähnlicher Größe im Northern Blot lässt auch hier auf die Existenz zweier Spleißvarianten des Gens schließen. Bei dem 0 Stunden Embryo konnte noch eine weitere Bande detektiert werden. Da diese Bande sich oberhalb der anderen beiden Banden befindet und das detektierte Transkript somit größer ist, kann eine Degradation der mRNA ausgeschlossen werden. Vermutlich handelt es sich daher um eine dritte Spleißvariante, die nur in diesem frühen Embryonalstadium transkribiert wird. Es erscheint sehr unwahrscheinlich, dass die Expression des Gens in sämtlichen Entwicklungsstadien auf die oben postulierte Funktion im olfaktorischen System zurückzuführen ist. Für die Analyse der Funktion dieses hoch interessanten Gens wurde daher eine transgene UAS-RNAi Linie zur Erzeugung temporärer *knockouts* für *in vivo* Untersuchungen hergestellt.

4.4 *In vivo* Funktion ausgewählter Untereinheiten der Liganden-gesteuerten Chlorid-Kanäle von *D. melanogaster*

Über die *in vivo* Funktion der einzelnen Mitglieder der Familie der Liganden-gesteuerten Chlorid-Kanäle von *Drosophila* ist bisher erst sehr wenig bekannt. Gerade

für die Untereinheit des Glutamat-gesteuerten Chlorid-Kanals (GluCl), ist dies jedoch im Hinblick auf die weitere Erforschung dieses Rezeptors als spezifischer Angriffsort für Insektizide von großer Bedeutung. Aber auch die sehr spezielle Expression des CT21430 Gens in den Antennen und optischen Loben wirft die Frage der möglichen *in vivo* Funktion dieses Gens auf. Für beide Gene ist es gelungen, transgene UAS-RNAi (= Effektor-) Linien zu erzeugen (s. 2.18 und 3.5.1).

Die Analyse der aus den Kreuzungen der Effektorlinie mit der GAL4-Hsp70 Treiberlinie resultierenden GluCl *knockout* Fliegen zeigte eine signifikante Veränderung im Vitalitätstest gegenüber den Fliegen des Wildtyps. Die signifikante Veränderungen konnten hierbei für die Parameter Ruhe und Putzen festgestellt werden (s.3.5.3). Die Ruhezeiten der *knockout* Tiere war gegenüber dem Wildtyp stark reduziert, wohingegen die Putzdauer deutlich erhöht war. Diese Ergebnisse konnten durch die Erzeugung weiterer temporärer *knockouts* dieses Gens durch die Kreuzung der Effektorlinie mit einer weiteren ubiquitären Treiberlinie (= Tub-GAL4) bestätigt werden. Auch hier war eine signifikant reduzierte Ruhezeit sowie eine gesteigerte Putzaktivität zu beobachten. Entgegen den Erwartungen war die Differenz der ermittelten Werte im Vergleich zum Wildtyp jedoch geringer als bei den aus der Kreuzung mit der GAL4-Hsp70 Treiberlinie resultierenden Tiere. Wie die Visualisierung der Expressionsmuster der Treiberlinien zeigte (s. 3.5.2) führt der Tubulin Promotor der Tub-GAL4 Linie zu einer stärkeren Aktivierung der Transkription als der *heat-shock* Promotor der GAL4-Hsp70 Linie. Es wäre zu erwarten gewesen, dass dies auch zu einer Verstärkung der RNAi Effekte führt, was hier aber nicht der Fall war. Es ist daher denkbar, dass beide Promotoren zwar zu einer ubiquitären Expression führen, sich jedoch in der Stärke ihrer Expression in den einzelnen Geweben unterscheiden. In dem Fall das der *heat-shock* Promotor genau in den Geweben, in denen das GluCl Gen exprimiert wird, eine stark aktivierte Transkription bewirkt, wäre ein derartig verstärkter RNAi Effekt erklärbar.

Es ist anzunehmen, dass die Veränderung der Vitalitätsparameter auf neurologische Defekte zurückzuführen ist, die sich aus der Rolle des Glutamat Rezeptors im Nervensystem ergibt (Giles und Usherwood, 1985; Horseman et al., 1988). In diesem Fall ist es jedoch erstaunlich, dass keine signifikanten Veränderungen der untersuchten Parameter bei dem gewebespezifischen *knockout* mittels der Nrv2-GAL4 Treiberlinie nachzuweisen waren. Durch die Kreuzung dieser Treiberlinie mit der Cam-UAS (w[1118]; P{w[+mC]= UAS-Cameleon.2.1}82) Linie war ein Visualisierung des Expressionsmusters möglich (s. 3.5.2). Hierbei konnte gezeigt werden, dass

ausschließlich eine Expression im Nervensystem erfolgte. Aufgrund dieser Analyse kann jedoch nicht unterschieden werden, ob es sich hierbei um Neurone oder um Gliazellen handelt. In dem Fall das es sich um eine Expression in den Gliazellen handelt, wäre der unveränderte Phänotyp der Nrv2-GAL4/UAS RNAi GluCl Linie nicht weiter verwunderlich. Dies wird durch die Kenntnisse über das Expressionsmuster des Glutamat-gesteuerten Chlorid-Kanals unterstützt, der bisher lediglich in Neuronen und Muskelzellen (Giles und Usherwood, 1985; Horseman et al., 1988; Delgado et al., 1989) nicht jedoch in Gliazellen nachgewiesen werden konnte.

Die hier postulierte Veränderung der Vitalitätsparameter aufgrund der Rolle des Glutamat Rezeptors im Nervensystem wird durch die Studie einer *Drosophila* Linie unterstützt, die eine Mutation im GluCl Gen aufweist (Kane et al., 2000). Bei dieser Linie handelt es sich nicht um einen *knockout*, sondern um den Austausch einer Aminosäure (P299S) innerhalb der codierenden Region des GluCl Gens. Auch hier konnten Verhaltensveränderungen nachgewiesen werden, die auf neurologische Defekte hinweisen.

Die Auswirkungen des temporären *knockouts* des GluCl Gens auf die Entwicklung zeigte sich bei den aus den Kreuzungen mit der Tub-GAL4 Treiberlinie stammenden *knockout* Fliegen. Die Verkürzung der Dauer der Larvalstadien und des Pupariums, ebenso wie die insgesamt verkürzte Lebensdauer weisen auf eine entwicklungspezifische Relevanz des GluCl Gens hin. Diese Vermutung wird durch die Ergebnisse der Untersuchungen zur entwicklungspezifischen Expression unterstützt (s.o.), in denen nachgewiesen werden konnte, dass das GluCl Gen in sämtlichen Entwicklungsstadien exprimiert wird.

Aufgrund der hier durchgeführten Analysen konnte erstmalig die entwicklungspezifische Relevanz des GluCl Gens gezeigt, sowie seine physiologische Funktion im Nervensystem weiter bestätigt werden. Zusätzlich ermöglicht die im Rahmen dieser Arbeit erzeugte UAS-RNAi Linie neue Wege für die pharmakologische Entwicklung und Wirksamkeitstestung von Insektiziden.

Eine Interpretation der phänotypischen Veränderungen der CT21430 *knockout* Fliegen ist schwierig. Die Vitalitätsanalyse der CT21430 Effektorlinie ergab eine signifikante Veränderung des Vitalitätsparameters Laufen gegenüber dem Wildtyp. Dies lässt eine Insertion des CT21430 UAS/RNAi Konstruktes innerhalb eines anderen Gens vermuten (s. 3.5.3). Die phänotypischen Veränderungen der aus den Kreuzungen mit den Treiberlinien resultierenden *knockout* Fliegen lassen sich daher nicht klar der Funktion

des CT21430 Gens zuordnen. Es kann jedoch nicht ausgeschlossen werden, dass der veränderte Phänotyp der Effektorlinie nicht auf eine Insertion innerhalb eines anderen Gens zurückzuführen ist, sondern aus einem zufälligen Erscheinungsbild hervorgeht. Es ist auffällig, dass nur bei einem von drei Vitalitätsparametern ein signifikanter Unterschied festzustellen war. Eine genauere Analyse der Effektorlinie wäre daher wünschenswert. Nur so ist es möglich, eine klare Aussage bezüglich einer möglichen Veränderung des Phänotyps der Effektorlinie zu treffen. Erst dann ist eine zuverlässige Interpretation der phänotypischen Veränderungen der aktivierten CT21430 UAS-RNAi Linie möglich. Bereits jetzt kann jedoch gesagt werden, dass auch dieses Gen einen signifikanten Einfluss auf die verschiedenen Vitalitätsparameter zu haben scheint.

4.5 Zusammenfassung

Im Zentrum dieser Arbeit stand der Histamin-gesteuerte Chlorid-Kanal, welcher der wichtigste Rezeptor im visuellen System von Arthropoden ist. Seine Identifizierung und Charakterisierung war daher von grundlegender Bedeutung und einer der wichtigsten Aspekte dieser Arbeit. Daneben sind auch weitere Mitglieder der Familie der inhibitorischen Liganden-gesteuerten Chlorid-Kanäle von *Drosophila melanogaster* von großer physiologischer Relevanz. Die Bedeutung dieser Kanäle liegt nicht nur allgemein in einem notwendigen und besseren Verständnis der Biologie der Signalperzeption, sondern im speziellen auch in der Bedeutung dieser Kanäle im Zusammenhang mit einer Reihe von Insektiziden, die hier ihren Angriffsort haben. Insbesondere der Glutamat-gesteuerte Chlorid-Kanal, der ausschließlich bei Invertebraten vorkommt, ist hier von großem Interesse.

Bisher ist aber noch sehr wenig über die *in vivo* Funktion der Mitglieder dieser Genfamilie bekannt. Sämtliche Untersuchungen hierzu beruhten auf Analysen an Fliegen, die zufällige Mutationen innerhalb dieser Gene aufwiesen. Die gezielte Erzeugung temporärer *knockouts* durch RNA-Interferenz für diese Gene war daher ein wichtiger Aspekt und eine besondere Herausforderung dieser Arbeit.

Im Zuge dieser Arbeit ist es durch die Kombination vielfältiger molekularbiologischer, zellbiologischer wie auch bioinformatischer Methoden gelungen, zwei Untereinheiten des Histamin-gesteuerten Chlorid-Kanals (*Dm* HA-Cl I und II) zu identifizieren und zu charakterisieren. Darüber hinaus konnte die vollständige Nukleotid-Sequenz ermittelt

und die strukturelle Zusammensetzung beider Gene erörtert werden. Dieses erlaubte Vorhersagen über die mutmaßliche Topologie und den phylogenetischen Ursprung dieser Gene.

Durch die Ermittlung der zellspezifischen Expression beider Gene konnte erstmalig eine detaillierte Aussage über die mutmaßliche Verschaltung der postsynaptischen Zellen mit den Photorezeptoren gemacht werden. Des Weiteren wurde nachgewiesen, dass das *Dm* HA-Cl II Gen entwicklungspezifisch reguliert ist, was vermutlich auf seine besondere Relevanz als postsynaptischer Rezeptor der Mechanorezeptoren zurückzuführen ist.

Sowohl für das *Dm* HA-Cl I als auch für das *Dm* HA-Cl II Gen konnten Promotor-GAL4 Fusionsvektoren für die Erzeugung transgener Tiere durch Mikroinjektion erstellt werden. Hierdurch ist eine grundlegende Voraussetzung für die Visualisierung der spezifischen Genexpression in allen Entwicklungsstadien geschaffen worden. Erste Ergebnisse zeigen die Funktionalität des benutzten Systems an und erlauben eine detaillierte Aussage zur zellspezifischen Expression des untersuchten Gens.

Durch die erfolgreiche Konstruktion spezieller pUAST-RNAi Vektoren für beide Gene wurden alle Voraussetzungen zur Herstellung transgener UAS-RNAi Tiere für die Erzeugung temporärer *knockouts* geschaffen. Das hierfür verwendete GAL4/UAS System ist durch die vorliegende Arbeit in der Arbeitsgruppe etabliert und erstmalig für die Erzeugung temporärer *knockouts* an dieser Klasse von Rezeptoren bei *D. melanogaster* benutzt worden. Es ermöglicht, dass das zu untersuchende Gen durch die zeit- und gewebe-spezifisch gesteuerte Induktion der RNA-Interferenz exakt analysiert werden kann.

Durch Mikroinjektion in die Embryonen von *Drosophila* ist es für das *Dm* HA-Cl II Gen gelungen eine derartige Linie zu erzeugen. In ersten Analysen der mittels Kreuzungen dieser transgenen UAS-RNAi Linie mit einer Treiberlinie erzeugten temporären *knockout* Fliegen konnte die Rolle dieses Gens in seiner Funktion als postsynaptischer Rezeptor der mechanosensorischen Haarsensillen erstmalig spezifiziert werden.

Aufgrund bioinformatischer Analysen konnte die Familie der inhibitorischen Ligandengesteuerten Ionenkanäle von *Drosophila melanogaster* auf 12 potentielle Untereinheiten eingegrenzt werden. Des Weiteren konnten für alle Mitglieder dieser Familie, ausgenommen der bereits gut untersuchten Gene Grd und GluCl, das gewebespezifische Expressionsmuster ermittelt werden, was eine Einteilung in 4 Gruppen ermöglichte.

Anhand der Expressionsmuster wird eine potentielle Interaktion der verschiedenen Rezeptor-Untereinheiten diskutiert.

Durch die Ermittlung der Entwicklungsspezifischen Expression konnte für die GABA Rezeptor Untereinheiten Grd, Lcch3 und Rdl sowie für das CT21430 und *Dm* HA-Cl II Gen eine Regulation der Transkription in unterschiedlichen Entwicklungsstadien gezeigt werden. Im Gegensatz dazu wurde nachgewiesen, dass das GluCl Gen keiner entwicklungspezifischen Regulation der Transkription unterliegt und zu jedem Zeitpunkt der Entwicklung exprimiert wird. Dieses unterstreicht die große physiologische Relevanz des Glutamat-Rezeptors und betont seine besondere Rolle als Angriffspunkt von Insektiziden.

Durch die Erstellung spezieller pUAST-RNAi Vektoren für die Gene CT21430, Lcch3 und GluCl wurden für drei weitere Mitglieder der Familie der inhibitorischen Liganden-gesteuerten Chlorid-Kanäle von *Drosophila* alle Voraussetzung zur Erzeugung transgener UAS-RNAi Linien geschaffen. Dieses ermöglicht zukünftig die ausführliche Analyse der *in vivo* Funktion dieser Gene mittels RNA-Interferenz.

Darüber hinaus ist es für die Gene CT21430 und GluCl im Rahmen dieser Arbeit gelungen, nicht nur homozygote transgene UAS-RNAi Linien zu erzeugen, sondern auch bereits erste phänotypische Analysen der Tiere mit temporärem *knockout* durchzuführen. Hierdurch war es möglich, erstmalig die entwicklungspezifische Relevanz des GluCl Gens *in vivo* nachzuweisen. Zudem konnte die außerordentlich wichtige Funktion dieses Gens im Nervensystem adulter Tiere verifiziert werden.

Zusammenfassend ist es gelungen, eine Vielzahl neuer essentieller Erkenntnisse über Struktur, Lokalisation und Funktion der Mitglieder der Familie der inhibitorischen Liganden-gesteuerten Chlorid-Kanäle der Fruchtfliege *Drosophila melanogaster* zu gewinnen. In diesem Zusammenhang konnte der Histamin-gesteuerte Chlorid-Kanal, welcher der wichtigste Rezeptor im visuellen System von Arthropoden ist, identifiziert und umfassend charakterisiert werden. Zusätzlich gelang es, grundlegende Kenntnisse über die Relevanz des Glutamat-gesteuerten Chlorid-Kanals zu erlangen, der nur bei Invertebraten vorkommt und daher für den Einsatz und die Entwicklung von Insektiziden von überaus großer Bedeutung ist. Hierdurch wurde ein wesentlicher Beitrag zum besseren Verständnis der Biologie dieser wichtigen Klasse von Ionenkanälen erbracht.

4.6 Ausblick

Eine überaus wichtige Information wäre die exakte Kenntnis über die molekulare Zusammensetzung der Untereinheiten des nativen Histamin-gesteuerten Chlorid-Kanals. Hierbei wäre zu klären, ob die bisher identifizierten *Dm* HA-Cl I und II Untereinheiten allein und in welcher Stöchiometrie den Kanal bilden, oder ob andere Proteine daran beteiligt sind. Hierfür eignen sich mehrere Methoden wie z.B. das *yeast-two-hybrid-system*, die Co-Immunpräzipitation und Microarray-Transkriptomanalysen der postsynaptischen Zellen der Photorezeptoren. Derartige Analysen wären auch für die übrigen Mitglieder der Familie der inhibitorischen Liganden-gesteuerten Ionenkanäle von *Drosophila melanogaster* von großer Bedeutung.

Eine weitergehende Analyse der *in vivo* Funktion des Histamin-gesteuerten Chlorid-Kanals wäre von essentieller Bedeutung. Aufgrund zuvor bekannter sowie hier dargestellter Ergebnisse ist anzunehmen, dass die *Dm* HA-Cl II Untereinheit von besonderer Relevanz im visuellen System ist. Ein ERG der temporären *knockout* Fliegen dieser Linie würde hierüber weiteren Aufschluss geben. Zudem implizieren die erzielten Ergebnisse eine zusätzliche Bedeutung der *Dm* HA-Cl II Untereinheit im mechanosensorischen System. Es bleibt daher offen und interessant, ob dieses ebenso für die *Dm* HA-Cl I Untereinheit gilt. Die Erzeugung einer homozygoten transgenen UAS-RNAi Linie für RNA-Interferenz Versuche hätte daher absolute Priorität.

Eine detaillierte Charakterisierung des Histamin-gesteuerten Chlorid-Kanals wäre insofern möglich, als dass die exakte Ermittlung des Expressionsmusters in allen Entwicklungsstadien auf zellulärer Ebene erreicht werden kann. Durch die Erstellung der Promotor-GAL4-Fusionsvektoren sind hierfür die wichtigsten Voraussetzungen geschaffen worden und erste Analysen mit der *Dm* HA-Cl II Linie zeigen die Funktionalität des Systems. Eine genaue Analyse sämtlicher Embryonal- und Larvalstadien würde einen wichtigen Beitrag über die entwicklungspezifische Expression dieses Rezeptors bringen.

Nicht zuletzt sollten unbedingt die Untersuchungen zur *in vivo* Funktion der GluCl und CT21430 Untereinheiten fortgesetzt werden. Hierdurch könnten weitere wichtige Erkenntnisse über die physiologische Relevanz dieser Gene erlangt werden. Im Falle

des GluCl Gens erlaubt die erstellte UAS-RNAi Linie zudem eine pharmakologische Entwicklung und Wirksamkeitstestung neuartiger Insektizide. Gleichmaßen ermöglicht diese Technik die Darstellung der physiologischen Relevanz der übrigen und bisher noch nicht untersuchten Mitglieder dieser Genfamilie. Die unentbehrlichen und wichtigen Grundlagen für ein solches Vorhaben wurden in der vorliegenden Studie erarbeitet.

5 Literaturverzeichnis

- Adams MD, Celniker SE, Holt RA, Evans CA, Gocayne JD, Amanatides PG, Scherer SE, Li PW, Hoskins RA, Galle RF, George RA, Lewis SE, Richards S, Ashburner M, Henderson SN, Sutton GG, Wortman JR, Yandell MD, Zhang Q, Chen LX, Brandon RC, Rogers YH, Blazej RG, Champe M, Pfeiffer BD, Wan KH, Doyle C, Baxter EG, Helt G, Nelson CR, Gabor GL, Abril JF, Agbayani A, An HJ, Andrews-Pfannkoch C, Baldwin D, Ballew RM, Basu A, Baxendale J, Bayraktaroglu L, Beasley EM, Beeson KY, Benos PV, Berman BP, Bhandari D, Bolshakov S, Borkova D, Botchan MR, Bouck J, Brokstein P, Brottier P, Burtis KC, Busam DA, Butler H, Cadieu E, Center A, Chandra I, Cherry JM, Cawley S, Dahlke C, Davenport LB, Davies P, de Pablos B, Delcher A, Deng Z, Mays AD, Dew I, Dietz SM, Dodson K, Doup LE, Downes M, Dugan-Rocha S, Dunkov BC, Dunn P, Durbin KJ, Evangelista CC, Ferraz C, Ferreira S, Fleischmann W, Fosler C, Gabrielian AE, Garg NS, Gelbart WM, Glasser K, Glodek A, Gong F, Gorrell JH, Gu Z, Guan P, Harris M, Harris NL, Harvey D, Heiman TJ, Hernandez JR, Houck J, Hostin D, Houston KA, Howland TJ, Wei MH, Ibegwam C, et al. (2000) The genome sequence of *Drosophila melanogaster*. *Science* 287:2185-2195.
- Altschul SF, Madden TL, Schaffer AA, Zhang J, Zhang Z, Miller W, Lipman DJ (1997) Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res* 25:3389-3402.
- Angelotti TP, Macdonald RL (1993) Assembly of GABAA receptor subunits: alpha 1 beta 1 and alpha 1 beta 1 gamma 2S subunits produce unique ion channels with dissimilar single-channel properties. *J Neurosci* 13:1429-1440.
- Aronstein K, Auld V, Ffrench-Constant R (1996) Distribution of two GABA receptor-like subunits in the *Drosophila* CNS. *Invert Neurosci* 2:115-120.
- Barnes WM (1994) PCR amplification of up to 35-kb DNA with high fidelity and high yield from lambda bacteriophage templates. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91:2216-2220.
- Basyuk E, Bertrand E, Journot L (2000) Alkaline fixation drastically improves the signal of in situ hybridization. *Nucleic Acids Res* 28:E46.

- Bernstein E, Caudy AA, Hammond SM, Hannon GJ (2001) Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference. *Nature* 409:363-366.
- Betz H (1990) Ligand-gated ion channels in the brain: the amino acid receptor superfamily. *Neuron* 5:383-392.
- Betz H, Schuster C, Ultsch A, Schmitt B (1993) Molecular biology of ionotropic glutamate receptors in *Drosophila melanogaster*. *Trends Pharmacol Sci* 14:428-431.
- Bornhauser BC, Meyer EP (1997) Histamine-like immunoreactivity in the visual system and brain of an orthopteran and a hymenopteran insect. *Cell Tissue Res* 287:211-221.
- Bownes M (1975) A photographic study of development in the living embryo of *Drosophila melanogaster*. *J Embryol Exp Morphol* 33:789-801.
- Braitenberg V (1967) Patterns of projection in the visual system of the fly. I. Retinal lamina projections. *Exp Brain Res* 3:271-298.
- Brand AH, Perrimon N (1993) Targeted gene expression as a means of altering cell fates and generating dominant phenotypes. *Development* 118:401-415.
- Brenner CA, Tam AW, Nelson PA, Engleman EG, Suzuki N, Fry KE, Larrick JW (1989) Message amplification phenotyping (MAPPING): a technique to simultaneously measure multiple mRNAs from small numbers of cells. *Biotechniques* 7:1096-1103.
- Brussaard AB, Kits KS, Baker RE, Willems WP, Leyting-Vermeulen JW, Voorn P, Smit AB, Bicknell RJ, Herbison AE (1997) Plasticity in fast synaptic inhibition of adult oxytocin neurons caused by switch in GABA(A) receptor subunit expression. *Neuron* 19:1103-1114.
- Buchner E, Buchner S, Burg MG, Hofbauer A, Pak WL, Pollack I (1993) Histamine is a major mechanosensory neurotransmitter candidate in *Drosophila melanogaster*. *Cell Tissue Res* 273:119-125.
- Buchner E, Bader R, Buchner S, Cox J, Emson PC, Flory E, Heizmann CW, Hemm S, Hofbauer A, Oertel WH (1988) Cell-specific immuno-probes for the brain of normal and mutant *Drosophila melanogaster*. I. Wildtype visual system. *Cell Tissue Res* 253:357-370.
- Burg MG, Sarthy PV, Koliantz G, Pak WL (1993) Genetic and molecular identification of a *Drosophila* histidine decarboxylase gene required in photoreceptor transmitter synthesis. *Embo J* 12:911-919.
- Campbell WC (1981) An introduction to the avermectins. *N Z Vet J* 29:174-178.

- Campbell WC, Fisher MH, Stapley EO, Albers-Schonberg G, Jacob TA (1983) Ivermectin: a potent new antiparasitic agent. *Science* 221:823-828.
- Capecchi MR (1994) Targeted gene replacement. *Sci Am* 270:52-59.
- Chou WH, Huber A, Bentrop J, Schulz S, Schwab K, Chadwell LV, Paulsen R, Britt SG (1999) Patterning of the R7 and R8 photoreceptor cells of *Drosophila*: evidence for induced and default cell-fate specification. *Development* 126:607-616.
- Cull-Candy SG (1976) Two types of extrajunctional L-glutamate receptors in locust muscle fibres. *J Physiol* 255:449-464.
- Cully DF, Paress PS, Liu KK, Schaeffer JM, Arena JP (1996) Identification of a *Drosophila melanogaster* glutamate-gated chloride channel sensitive to the antiparasitic agent avermectin. *J Biol Chem* 271:20187-20191.
- Delgado R, Barla R, Latorre R, Labarca P (1989) L-glutamate activates excitatory and inhibitory channels in *Drosophila* larval muscle. *FEBS Lett* 243:337-342.
- Dettner K, Peters W (1999) *Lehrbuch der Entomologie*. Stuttgart; Jena; Lübeck; Ulm: Gustav Fischer Verlag.
- Duffy JB (2002) GAL4 system in *Drosophila*: a fly geneticist's Swiss army knife. *Genesis* 34:1-15.
- Eggert T, Hauck B, Hildebrandt N, Gehring WJ, Walldorf U (1998) Isolation of a *Drosophila* homolog of the vertebrate homeobox gene Rx and its possible role in brain and eye development. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:2343-2348.
- Elbashir SM, Lendeckel W, Tuschl T (2001) RNA interference is mediated by 21- and 22-nucleotide RNAs. *Genes Dev* 15:188-200.
- Eldefrawi AT, Eldefrawi ME (1987) Receptors for gamma-aminobutyric acid and voltage-dependent chloride channels as targets for drugs and toxicants. *Faseb J* 1:262-271.
- Ffrench-Constant RH (1994) The molecular and population genetics of cyclodiene insecticide resistance. *Insect Biochem Mol Biol* 24:335-345.
- ffrench-Constant RH, Rocheleau TA (1993) *Drosophila* gamma-aminobutyric acid receptor gene Rdl shows extensive alternative splicing. *J Neurochem* 60:2323-2326.
- Ffrench-Constant RH, Rocheleau TA, Steichen JC, Chalmers AE (1993) A point mutation in a *Drosophila* GABA receptor confers insecticide resistance. *Nature* 363:449-451.
- Ffrench-Constant RH, Mortlock DP, Shaffer CD, MacIntyre RJ, Roush RT (1991) Molecular cloning and transformation of cyclodiene resistance in *Drosophila*: an

- invertebrate gamma-aminobutyric acid subtype A receptor locus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88:7209-7213.
- Ffrench-Constant RH, Anthony N, Aronstein K, Rocheleau T, Stilwell G (2000) Cyclodiene insecticide resistance: from molecular to population genetics. *Annu Rev Entomol* 45:449-466.
- Fischbach KH, Dittrich APM (1989) The optic lobe of *Drosophila melanogaster* 1: a golgi analysis of wild-type structure. *Cell Tissue Res* 235:357-370.
- Frye MA, Dickinson MH (2001) Fly flight: a model for the neural control of complex behavior. *Neuron* 32:385-388.
- Fryxell KJ, Meyerowitz EM (1987) An opsin gene that is expressed only in the R7 photoreceptor cell of *Drosophila*. *Embo J* 6:443-451.
- Gengs C, Leung HT, Skingsley DR, Iovchev MI, Yin Z, Semenov EP, Burg MG, Hardie RC, Pak WL (2002) The target of *Drosophila* photoreceptor synaptic transmission is a histamine-gated chloride channel encoded by *ort* (*hclA*). *J Biol Chem* 277:42113-42120.
- Giles D, Usherwood PN (1985) The effects of putative amino acid neurotransmitters on somata isolated from neurons of the locust central nervous system. *Comp Biochem Physiol C* 80:231-236.
- Gingrich KJ, Roberts WA, Kass RS (1995) Dependence of the GABAA receptor gating kinetics on the alpha-subunit isoform: implications for structure-function relations and synaptic transmission. *J Physiol* 489:529-543.
- Gisselmann G, Pusch H, Hovemann BT, Hatt H (2002) Two cDNAs coding for histamine-gated ion channels in *D. melanogaster*. *Nat Neurosci* 5:11-12.
- Hardie RC (1987) Is histamine a neurotransmitter in insect photoreceptors? *J Comp Physiol [A]* 161:201-213.
- Hardie RC (1989) A histamine-activated chloride channel involved in neurotransmission at a photoreceptor synapse. *Nature* 339:704-706.
- Hardie RC, Raghu P (2001) Visual transduction in *Drosophila*. *Nature* 413:186-193.
- Harrison JB, Chen HH, Sattelle E, Barker PJ, Huskisson NS, Rauh JJ, Bai D, Sattelle DB (1996) Immunocytochemical mapping of a C-terminus anti-peptide antibody to the GABA receptor subunit, RDL in the nervous system in *Drosophila melanogaster*. *Cell Tissue Res* 284:269-278.
- Hildebrandt H (1993) *Medizinisches Wörterbuch*. Hamburg: Nikol Verlagsgesellschaft mbH.

- Horseman BG, Seymour C, Bermudez I, Beadle DJ (1988) The effects of L-glutamate on cultured insect neurones. *Neurosci Lett* 85:65-70.
- Hosie AM, Aronstein K, Sattelle DB, French-Constant RH (1997) Molecular biology of insect neuronal GABA receptors. *Trends Neurosci* 20:578-583.
- Hosie AM, Buckingham SD, Presnail JK, Sattelle DB (2001) Alternative splicing of a *Drosophila* GABA receptor subunit gene identifies determinants of agonist potency. *Neuroscience* 102:709-714.
- Hosie AM, Ozoe Y, Koike K, Ohmoto T, Nikaido T, Sattelle DB (1996) Actions of picrodendrin antagonists on dieldrin-sensitive and -resistant *Drosophila* GABA receptors. *Br J Pharmacol* 119:1569-1576.
- Huber A, Schulz S, Bentrop J, Groell C, Wolfrum U, Paulsen R (1997) Molecular cloning of *Drosophila* Rh6 rhodopsin: the visual pigment of a subset of R8 photoreceptor cells. *FEBS Lett* 406:6-10.
- Ikeda T, Nagata K, Shono T, Narahashi T (1998) Dieldrin and picrotoxinin modulation of GABA(A) receptor single channels. *Neuroreport* 9:3189-3195.
- Iovchev M, Kodrov P, Wolstenholme AJ, Pak WL, Semenov EP (2002) Altered drug resistance and recovery from paralysis in *Drosophila melanogaster* with a deficient histamine-gated chloride channel. *J Neurogenet* 16:249-261.
- Jackson FR, Newby LM, Kulkarni SJ (1990) *Drosophila* GABAergic systems: sequence and expression of glutamic acid decarboxylase. *J Neurochem* 54:1068-1078.
- Jagannathan S, Laughton DL, Critten CL, Skinner TM, Horoszok L, Wolstenholme AJ (1999) Ligand-gated chloride channel subunits encoded by the *Haemonchus contortus* and *Ascaris suum* orthologues of the *Caenorhabditis elegans* *gbr-2* (*avr-14*) gene. *Mol Biochem Parasitol* 103:129-140.
- Kalidas S, Smith DP (2002) Novel genomic cDNA hybrids produce effective RNA interference in adult *Drosophila*. *Neuron* 33:177-184.
- Kandel ER, Schwartz JH, Jessel TM (1996) *Neurowissenschaften: eine Einführung*. Heidelberg: Spektrum Akademischer Verlag.
- Kane NS, Hirschberg B, Qian S, Hunt D, Thomas B, Brochu R, Ludmerer SW, Zheng Y, Smith M, Arena JP, Cohen CJ, Schmatz D, Warmke J, Cully DF (2000) Drug-resistant *Drosophila* indicate glutamate-gated chloride channels are targets for the antiparasitics nodulisporic acid and ivermectin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97:13949-13954.
- Kirschfeld K (1967) [The projection of the optical environment on the screen of the rhabdomere in the compound eye of the *Musca*]. *Exp Brain Res* 3:248-270.

- Kirschfeld K (1969) Optics of the compound eye. In: Processing of optical data by organisms and by machines (Reichardt W, ed).
- Kohn MH, Fang S, Wu CI (2003) Inference of Positive and Negative Selection on the 5' Regulatory Regions of *Drosophila* Genes. *Mol Biol Evol* 5:5.
- Kuersten S, Goodwin EB (2003) The power of the 3' UTR: translational control and development. *Nat Rev Genet* 4:626-637.
- Kulkarni SJ, Newby LM, Jackson FR (1994) *Drosophila* GABAergic systems. II. Mutational analysis of chromosomal segment 64AB, a region containing the glutamic acid decarboxylase gene. *Mol Gen Genet* 243:555-564.
- Langosch D, Laube B, Rundstrom N, Schmieden V, Bormann J, Betz H (1994) Decreased agonist affinity and chloride conductance of mutant glycine receptors associated with human hereditary hyperekplexia. *Embo J* 13:4223-4228.
- Leal SM, Neckameyer WS (2002) Pharmacological evidence for GABAergic regulation of specific behaviors in *Drosophila melanogaster*. *J Neurobiol* 50:245-261.
- Lee D, Su H, O'Dowd DK (2003) GABA receptors containing Rdl subunits mediate fast inhibitory synaptic transmission in *Drosophila* neurons. *J Neurosci* 23:4625-4634.
- Loh EY, Elliott JF, Cwirla S, Lanier LL, Davis MM (1989) Polymerase chain reaction with single-sided specificity: analysis of T cell receptor delta chain. *Science* 243:217-220.
- Lovenberg TW, Roland BL, Wilson SJ, Jiang X, Pyati J, Huvar A, Jackson MR, Erlander MG (1999) Cloning and functional expression of the human histamine H3 receptor. *Mol Pharmacol* 55:1101-1107.
- Ludmerer SW, Warren VA, Williams BS, Zheng Y, Hunt DC, Ayer MB, Wallace MA, Chaudhary AG, Egan MA, Meinke PT, Dean DC, Garcia ML, Cully DF, Smith MM (2002) Ivermectin and nodulisporic acid receptors in *Drosophila melanogaster* contain both gamma-aminobutyric acid-gated Rdl and glutamate-gated GluCl alpha chloride channel subunits. *Biochemistry* 41:6548-6560.
- Macdonald RL, Olsen RW (1994) GABAA receptor channels. *Annu Rev Neurosci* 17:569-602.
- Mathews GC, Bolos-Sy AM, Holland KD, Isenberg KE, Covey DF, Ferrendelli JA, Rothman SM (1994) Developmental alteration in GABAA receptor structure and physiological properties in cultured cerebellar granule neurons. *Neuron* 13:149-158.

- McClintock TS, Ache BW (1989) Histamine directly gates a chloride channel in lobster olfactory receptor neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86:8137-8141.
- Meinertzhagen IA, Hanson TE (1993) The development of the optic lobe. In: *The development of Drosophila melanogaster* (Bush BMH, Martinez-Arias A, eds).
- Melzig J, Burg M, Gruhn M, Pak WL, Buchner E (1998) Selective histamine uptake rescues photo- and mechanoreceptor function of histidine decarboxylase-deficient *Drosophila* mutant. *J Neurosci* 18:7160-7166.
- Melzig J, Buchner S, Wiebel F, Wolf R, Burg M, Pak WL, Buchner E (1996) Genetic depletion of histamine from the nervous system of *Drosophila* eliminates specific visual and mechanosensory behavior. *J Comp Physiol [A]* 179:763-773.
- Mizunami M (1995) Neural organization of ocellar pathways in the cockroach brain. *J Comp Neurol* 352:458-468.
- Mody I, De Koninck Y, Otis TS, Soltesz I (1994) Bridging the cleft at GABA synapses in the brain. *Trends Neurosci* 17:517-525.
- Montell C, Jones K, Zuker C, Rubin G (1987) A second opsin gene expressed in the ultraviolet-sensitive R7 photoreceptor cells of *Drosophila melanogaster*. *J Neurosci* 7:1558-1566.
- Moreadith RW, Radford NB (1997) Gene targeting in embryonic stem cells: the new physiology and metabolism. *J Mol Med* 75:208-216.
- Morgan JR, Gebhardt KA, Stuart AE (1999) Uptake of precursor and synthesis of transmitter in a histaminergic photoreceptor. *J Neurosci* 19:1217-1225.
- Nassel DR (1999) Histamine in the brain of insects: a review. *Microsc Res Tech* 44:121-136.
- Nassel DR, Holmqvist MH, Hardie RC, Hakanson R, Sundler F (1988) Histamine-like immunoreactivity in photoreceptors of the compound eyes and ocelli of the flies *Calliphora erythrocephala* and *Musca domestica*. *Cell Tissue Res* 253:639-646.
- Numa S, Noda M, Takahashi H, Tanabe T, Toyosato M, Furutani Y, Kikuyotani S (1983) Molecular structure of the nicotinic acetylcholine receptor. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 48:57-69.
- Ortells MO, Lunt GG (1995) Evolutionary history of the ligand-gated ion-channel superfamily of receptors. *Trends Neurosci* 18:121-127.
- Parsons ME (1991) Histamine receptors: an overview. *Scand J Gastroenterol Suppl* 180:46-52.

- Pflugfelder GO, Heisenberg M (1995) Optomotor-blind of *Drosophila melanogaster*: a neurogenetic approach to optic lobe development and optomotor behaviour. *Comp Biochem Physiol A Physiol* 110:185-202.
- Pollack I, Hofbauer A (1991) Histamine-like immunoreactivity in the visual system and brain of *Drosophila melanogaster*. *Cell Tissue Res* 266:391-398.
- Promega (1998) *Protocols and Application Guide*, Third Edition Edition.
- Ranganathan R, Cannon SC, Horvitz HR (2000) MOD-1 is a serotonin-gated chloride channel that modulates locomotory behaviour in *C. elegans*. *Nature* 408:470-475.
- Ray MK, Fagan SP, Brunicardi FC (2000) The Cre-loxP system: a versatile tool for targeting genes in a cell- and stage-specific manner. *Cell Transplant* 9:805-815.
- Reichhart JM, Ligoxygakis P, Naitza S, Woerfel G, Imler JL, Gubb D (2002) Splice-activated UAS hairpin vector gives complete RNAi knockout of single or double target transcripts in *Drosophila melanogaster*. *Genesis* 34:160-164.
- Roeder T (2003) Metabotropic histamine receptors--nothing for invertebrates? *Eur J Pharmacol* 466:85-90.
- Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, Scharf SJ, Higuchi R, Horn GT, Mullis KB, Erlich HA (1988) Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 239:487-491.
- Saint Marie RL, Carlson SD (1985) Interneuronal and glial-neuronal gap junctions in the lamina ganglionaris of the compound eye of the housefly, *Musca domestica*. *Cell Tissue Res* 241:43-52.
- Salcedo E, Huber A, Henrich S, Chadwell LV, Chou WH, Paulsen R, Britt SG (1999) Blue- and green-absorbing visual pigments of *Drosophila*: ectopic expression and physiological characterization of the R8 photoreceptor cell-specific Rh5 and Rh6 rhodopsins. *J Neurosci* 19:10716-10726.
- Sambrook J FEMT (1989) *Molecular cloning: A laboratory manual*. New York: Cold Spring Harbour.
- Sanger F, Nicklen S, Coulson AR (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Biotechnology* 24:104-108.
- Sarthy PV (1991) Histamine: a neurotransmitter candidate for *Drosophila* photoreceptors. *J Neurochem* 57:1757-1768.
- Schaefer BC (1995) Revolutions in rapid amplification of cDNA ends: new strategies for polymerase chain reaction cloning of full-length cDNA ends. *Anal Biochem* 227:255-273.

- Schaeren-Wiemers N, Gerfin-Moser A (1993) A single protocol to detect transcripts of various types and expression levels in neural tissue and cultured cells: in situ hybridization using digoxigenin-labelled cRNA probes. *Histochemistry* 100:431-440.
- Schramm G, Bruchhaus I, Roeder T (2000) A simple and reliable 5'-RACE approach. *Nucleic Acids Res* 28:E96.
- Sharma Y, Cheung U, Larsen EW, Eberl DF (2002) PPTGAL, a convenient Gal4 P-element vector for testing expression of enhancer fragments in drosophila. *Genesis* 34:115-118.
- Shaw SR (1981) Anatomy and physiology of identified non-spiking cells in the photoreceptor-lamina complex of the compound eye of insects, especially diptera. In: *Neurones without impulses* (Roberts A, Bush BMH, eds).
- Shaw SR, Frohlich A, Meinertzhagen IA (1989) Direct connections between the R7/8 and R1-6 photoreceptor subsystems in the dipteran visual system. *Cell Tissue Res* 257:295-302.
- Smith LM, Sanders JZ, Kaiser RJ, Hughes P, Dodd C, Connell CR, Heiner C, Kent SB, Hood LE (1986) Fluorescence detection in automated DNA sequence analysis. *Nature* 321:674-679.
- Smith MM, Warren VA, Thomas BS, Brochu RM, Ertel EA, Rohrer S, Schaeffer J, Schmatz D, Petuch BR, Tang YS, Meinke PT, Kaczorowski GJ, Cohen CJ (2000) Nodulisporic acid opens insect glutamate-gated chloride channels: identification of a new high affinity modulator. *Biochemistry* 39:5543-5554.
- Spradling AC, Rubin GM (1982) Transposition of cloned P elements into Drosophila germ line chromosomes. *Science* 218:341-347.
- Stilwell GE, French-Constant RH (1998) Transcriptional analysis of the Drosophila GABA receptor gene resistance to dieldrin. *J Neurobiol* 36:468-484.
- Stilwell GE, Rocheleau T, French-Constant RH (1995) GABA receptor minigene rescues insecticide resistance phenotypes in Drosophila. *J Mol Biol* 253:223-227.
- Strausfeld NJ, Campos-Ortega JA (1977) Vision in insects: pathways possibly underlying neural adaptation and lateral inhibition. *Science* 195:894-897.
- Stuart AE (1999) From fruit flies to barnacles, histamine is the neurotransmitter of arthropod photoreceptors. *Neuron* 22:431-433.

- Stuart AE, Morgan JR, Mekeel HE, Kempter E, Callaway JC (1996) Selective, activity-dependent uptake of histamine into an arthropod photoreceptor. *J Neurosci* 16:3178-3188.
- Sullivan W, Ashburner M, Hawley RS (2000) *Drosophila Protocols*. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Sutherland IH, Campbell WC (1990) Development, pharmacokinetics and mode of action of ivermectin. *Acta Leiden* 59:161-168.
- Swofford DL (1998) PAUP: Phylogenetic analysis using parsimony. In, 4.0 Edition. Illinois Natural History Survey, Champaign, IL.
- Thompson JD, Gibson TJ, Plewniak F, Jeanmougin F, Higgins DG (1997) The CLUSTAL_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Res* 25:4876-4882.
- Toyoshima C, Unwin N (1990) Three-dimensional structure of the acetylcholine receptor by cryoelectron microscopy and helical image reconstruction. *J Cell Biol* 111:2623-2635.
- Tranquilli WJ, Paul AJ, Seward RL, Todd KS, Dipietro JA (1987) Response to physostigmine administration in collie dogs exhibiting ivermectin toxicosis. *J Vet Pharmacol Ther* 10:96-100.
- Trujillo-Cenoz O (1965) Some aspects of the structural organization of the intermediate retina of dipterans. *J Ultrastruct Res* 13:1-33.
- Turner MJ, Schaeffer JM (1989) Mode of Action of Ivermectin. In: *Ivermectin and Abamectin* (Campbell WC, ed), pp 73-88. New York: Springer-Verlag.
- Unwin N (1993) Neurotransmitter action: opening of ligand-gated ion channels. *Cell* 72:31-41.
- Venter JC, Adams MD, Myers EW, Li PW, Mural RJ, Sutton GG, Smith HO, Yandell M, Evans CA, Holt RA (2001) The Sequence of the Human Genom. *Science* 291:1304-1351.
- Verdoorn TA (1994) Formation of heteromeric gamma-aminobutyric acid type A receptors containing two different alpha subunits. *Mol Pharmacol* 45:475-480.
- Vosshall LB, Amrein H, Morozov PS, Rzhetsky A, Axel R (1999) A spatial map of olfactory receptor expression in the *Drosophila* antenna. *Cell* 96:725-736.
- Wang CC, Pong SS (1982) Actions of avermectin B1a on GABA nerves. *Prog Clin Biol Res* 97:373-395.

- Winberg ML, Perez SE, Steller H (1992) Generation and early differentiation of glial cells in the first optic ganglion of *Drosophila melanogaster*. *Development* 115:903-911.
- Witte I, Kreienkamp HJ, Gewecke M, Roeder T (2002) Putative histamine-gated chloride channel subunits of the insect visual system and thoracic ganglion. *J Neurochem* 83:504-514.
- Wolff T, Ready DF (1993) Pattern formation in the *Drosophila* retina. In: *The development of Drosophila melanogaster* (Bates M, Martinez-Arias A, eds).
- Yasuyama K, Meinertzhagen IA, Schurmann FW (2002) Synaptic organization of the mushroom body calyx in *Drosophila melanogaster*. *J Comp Neurol* 445:211-226.
- Zhang HG, Lee HJ, Rocheleau T, French-Constant RH, Jackson MB (1995) Subunit composition determines picrotoxin and bicuculline sensitivity of *Drosophila* gamma-aminobutyric acid receptors. *Mol Pharmacol* 48:835-840.
- Zheng Y, Hirschberg B, Yuan J, Wang AP, Hunt DC, Ludmerer SW, Schmatz DM, Cully DF (2002) Identification of two novel *Drosophila melanogaster* histamine-gated chloride channel subunits expressed in the eye. *J Biol Chem* 277:2000-2005.
- Zuker CS, Cowman AF, Rubin GM (1985) Isolation and structure of a rhodopsin gene from *D. melanogaster*. *Cell* 40:851-858.

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt insbesondere folgenden Personen, die entscheiden zum Gelingen dieser Arbeit mit beigetragen haben:

Herrn Prof. Gewecke danke ich für die Überlassung des Themas, die stetige Unterstützung und Förderung meiner Arbeit und nicht zuletzt für die Begutachtung der Dissertation.

Herrn Dr. Roeder danke ich für die Betreuung der Arbeit, seine stete Hilfs- und Diskussionsbereitschaft, sowie die Fähigkeit immer alles mit Humor zu nehmen. Dein „ach das wird schon“ und „locker bleiben“ hat mich zwar manchmal wahnsinnig gemacht aber meistens hattest Du Recht.

Frau Dr. Iris Bruchhaus danke ich für die Durchführung der Hybridisierung der Northern Blots mit radioaktiv markierten Sonden, sowie Herrn Dr. Fiala für die Unterstützung bei der Erzeugung transgener Fliegen durch Mikroinjektion und A. Thum für die gute Kooperation bei der Erzeugung transgener Promotor GAL4 Linien.

Bei der gesamten Arbeitsgruppe Neurophysiologie möchte ich mich für die gute Arbeitsatmosphäre, die Hilfsbereitschaft, sowie die ständige Diskussionsbereitschaft und dem Interesse am Fortgang meiner Arbeit bedanken. Nicht zuletzt danke ich Euch allen für die vielen netten Feiern die wir zusammen verbracht haben.

Ein ganz besonderer Dank gilt meiner Familie, die mich immer unterstütz und stets an mich geglaubt hat.

Nicht zuletzt möchte ich mich auch noch bei Sven und allen meinen Freunden dafür bedanken, dass sie immer Verständnis für meine Arbeit hatten und sogar bereit waren Interesse an meinen Fliegen zu heucheln. Hier sei noch gesagt: Ich habe durchaus gemerkt das Ihr über mich und meine „Lieblinge“ gelächelt habt aber das ist O.K.