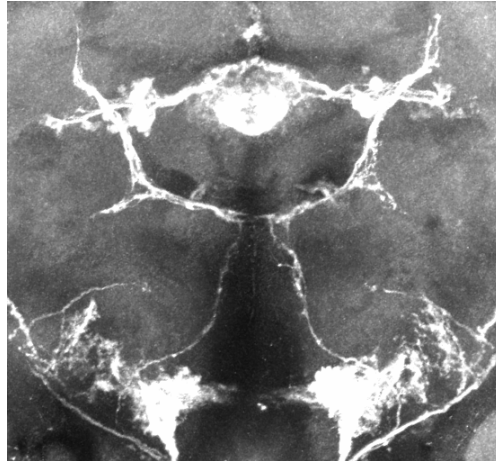


Funktionelle Analyse des Einflusses von putativen T β H-positiven
Neuronen auf das ethanolinduzierte Verhalten von *Drosophila*
melanogaster



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

vorgelegt von

Stefanie Hampel

Würzburg, Oktober 2007

Eingereicht am:

Mitglieder der Promotionskommission

Vorsitzender: Prof. Dr. M. Müller

Gutachter: Prof. Dr. E. Buchner

Gutachter: Prof. Dr. G. Krohne

Tag des Promotionskolloquiums:

Doktorurkunde ausgehändigt am:

gewidmet

Meinen Eltern

Viola und Joachim Hampel

und meinen Urgroßeltern

Olga und Hermann Götz

Es bleibt einem jeden immer noch soviel Kraft,

das auszuführen, wovon er überzeugt ist.

Johann Wolfgang von Goethe

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	10
1.1	Ethanol und seine Wirkung auf das Gehirn	10
1.2	Alkoholinduziertes Verhalten in <i>Drosophila melanogaster</i>	11
1.3	<i>Drosophila melanogaster</i> als Modellorganismus	14
1.4	Oktopamin und Noradrenalin - zwei homologe Moleküle	17
1.5	Das oktopaminerge System in <i>Drosophila melanogaster</i>	19
1.6	Fragestellung	25
2	Material und Methoden	26
2.1	Verwendete Materialien	26
2.2	Angewendete Methoden	33
2.3	Verhaltensversuche	40
2.4	Statistik	44
3	Ergebnisse	45
3.1	Organisation des Tyramin-beta-Hydroxylase(<i>TβH</i>) Gens	45
3.2	Deletionskartierung der Oktopamin-Nullmutante <i>TβH^{M18}</i>	47
3.3	Proteinstruktur und funktionelle Domänen des TβH-Proteins	48
3.4	Vergleich der TβH-Proteinkonzentration in Köpfen von <i>w¹¹⁸/TβH^{M18}</i> Fliegen zu <i>w¹¹⁸</i> Fliegen	50
3.5	Herstellung verschiedener <i>TβH</i> Promoter-GAL4 Treiberlinien	51
3.6	Charakterisierung von putativ TβH-positiven und eventuell oktopaminergen <i>TβH</i> -Promoter-GAL4 Treiberlinien	52
3.7	Strukturbeschreibung und Koloalisationsstudien der untersuchten GAL4-Expressionsmuster	59
3.8	Einfluss von putativen TβH-positiven Neuronen auf die Entwicklung von Ethanol sensitivität und Toleranz in <i>Drosophila melanogaster</i> .	97
4	Diskussion	123
4.1	Die Untersuchung des „TβH“-Expressionmusters zeigt keine Korrelation mit dem von Oktopamin auf.	123
4.2	Die Expression eines <i>hsp70-TβH</i> Transgens rettet tendenziell die reduzierte Ethanol toleranz in der <i>TβH^{M18}</i> Mutante.	124
4.3	Spezifische Koloalisation von Neuronen der verschiedenen <i>TβH</i> -Promotor-GAL4-Linien mit „TβH“ und Oktopamin.	125
4.4	Die für die GAL4-Konstrukte verwendeten fünf Promotorfragmente des <i>TβH</i> Gens enthalten partiell überlappende regulatorische Informationen.	127
4.5	Unterschiedliche Konzentrationen an Oktopamin regulieren unter anderem das ethanolinduzierte Verhalten.	129
4.6	Mögliche Gehirnareale, die die Entwicklung von Ethanol sensitivität oder Toleranz	

	vermitteln, sind der Zentralkomplex, das SOG und die Pars intercerebralis.	130
4.7	Verantwortlich für den Verlust der Fähigkeit Landmarken zu Fixieren sind etwa 10 Neurone der 1.3 <i>TβH</i> -GAL4-Linie.	135
5	Zusammenfassung	136
6	Summary	139
7	Literatur	142
8	Abkürzungen:	150
9	Anhang	151
9.1	Tabellen	151
9.2	Sequenzen der Deletionskartierung des <i>TβH</i> Gens	154
10	Erklärung	156
11	Lebenslauf	158
12	Danksagung	160

1 Einleitung

1.1 Ethanol und seine Wirkung auf das Gehirn

Alkohol ist das natürliche Produkt fermentierender Früchte. Seine positiven Effekte, wie Enthemmung und Euphorie, ließ es zur am häufigsten missbrauchten Droge weltweit werden. Die Komplexität und die Vielfalt der Ethanoleffekte beruhen paradoxerweise auf der Einfachheit seiner chemischen Struktur (FADDA and ROSSETTI 1998). Mittels Wasserstoffbrückenbindungen kann Alkohol die Organisation von Wassermolekülen in der extrazellulären Matrix modifizieren, so dass sich die Lösung von Liganden oder Ionen ändert, die mit ihren Rezeptorproteinen interagieren (YURTTAS et al. 1992).

Alkohol hat aufgrund seiner chemischen Struktur die Eigenschaft mit biologischen Substraten zu interagieren. Auf diese Weise wird eine Vielzahl von neurochemischen Effekten im Gehirn ausgelöst, die inhibitorische und exzitatorische Neurotransmittersysteme betreffen (DAVIES 2003; PEOPLES and WEIGHT 1995). Es wurde zum Beispiel eine Region von 45 Aminosäure-Resten in Transmembrandomänen der exzitatorischen Glycin- und inhibitorischen γ -Aminobuttersäure-(GABA_A) Rezeptoren identifiziert, die für die Modulation der Rezeptoren durch Ethanol einen Angriffspunkt darstellen (MIHIC et al. 1997; WEINER et al. 1994). Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass Ethanol mit den Transmembrandomänen des exzitatorischen 5-Hydroxytryptamin (5-HT₃, Serotonin) Rezeptors interagiert (ZHANG et al. 1997). Mittels elektrophysiologischer Studien an *Xenopus* Oozyten konnten ebenfalls direkte Ethanol-Protein Interaktionen für den N-methyl-D-Aspartat (NMDA) Rezeptor nachgewiesen werden (PEOPLES and WEIGHT 1995; WRIGHT et al. 1996). Dabei inhibiert Ethanol den exzitatorischen Liganden-gesteuerten NMDA Rezeptor (TRUJILLO and AKIL 1995). Durch Interaktion mit der allosterischen Domäne, die unabhängig von der Erkennungsstelle für die Agonisten Glutamat und Glycin ist, wird deren Bindungseffizienz reduziert (WRIGHT et al. 1996). Zudem interagiert Ethanol mit nicotinischen Acetylcholin (nACh) Rezeptoren, wie am Beispiel des Torpedo Fisches (*Botia sidthimunki*) gezeigt wurde. Ethanol

verschiebt das Gleichgewicht dieses Ionenkanals zum geöffneten Zustand hin (AISTRUP *et al.* 1999; FORMAN *et al.* 1995; LOVINGER *et al.* 1989; WU *et al.* 1994). Aufgrund der zahlreichen Mechanismen, über die Ethanol zum Beispiel die Membranorganisation, die Funktion von membrangebundenen Enzymen und Carrier-Proteinen und die Genexpression beeinflussen kann, wirkt er nicht-selektiv (DAVIES 2003; LOVINGER 1997; TABAKOFF and HOFFMAN 1996).

Die Ethanol-Interaktionen mit neurobiologischen Substraten sind weitgehend reversibel. Veränderungen der Gehirnfunktionen durch chronische Ethanoleinnahme sind adaptive Modifikationen im Gehirn und beruhen nicht direkt auf der Wirkung der Droge (DAVIES 2003; FADDA and ROSSETTI 1998; SIGGINS *et al.* 2005). Die genaue Wirkung von Ethanol im Bezug auf Pharmakologie und Alkoholabhängigkeit ist jedoch noch weitgehend ungeklärt.

1.2 Alkoholinduziertes Verhalten in *Drosophila melanogaster*

Geringe Dosen Alkohol führen beim Menschen zu Berauschtigkeit mit positiven Effekten wie Verlust sozialer Hemmungen und Euphorie. Bei höheren Dosen treten negative Effekte zum Vorschein, wie Verlust der motorischen Koordination, Dehydrierung und Bewusstlosigkeit (FADDA and ROSSETTI 1998). Beim Menschen führt die regelmäßige Einnahme von Alkohol über einen längeren Zeitraum zur Entwicklung einer erworbenen Alkoholresistenz, die als Toleranz bezeichnet wird (CRABBE *et al.* 1979; FADDA and ROSSETTI 1998; KALANT *et al.* 1971; SCHOLZ *et al.* 2000). Als Toleranz ist definiert, dass zum Erreichen des gleichen Effektes bei der zweiten Exposition eine höhere Alkoholmenge nötig ist als bei der ersten Exposition (KALANT *et al.* 1971; TABAKOFF *et al.* 1986).

Toleranz entwickelt sich auf Grund von zwei unterschiedlichen Mechanismen, erstens die metabolische und zweitens die funktionelle Toleranz (FADDA and ROSSETTI 1998; TABAKOFF *et al.* 1986). Unter metabolischer Toleranz versteht man Änderungen in der Absorption, Exkretion oder des Metabolismus von Ethanol. Dies hat zur Folge, dass Ethanol effektiver aus dem Körper entfernt, oder schon die Aufnahme unterbunden wird.

Bei der funktionellen Toleranz hingegen, handelt es sich um die Entwicklung der Resistenz auf zellulärem Level (KALANT et al. 1971; TABAKOFF et al. 1986). Es finden hierbei adaptive Veränderungen im zentralen Nervensystem statt (KALANT et al. 1971). Diese Veränderungen besitzen wahrscheinlich Ähnlichkeiten mit den Mechanismen, die dem Lernen und Gedächtnis unterliegen, wie bei Säugermodellen gezeigt wurde (BERKE and HYMAN 2000; CUNNINGHAM et al. 1983; FADDA and ROSSETTI 1998; KALANT et al. 1971; TABAKOFF et al. 1986). Vermutet wird, dass die Entwicklung von Alkoholabhängigkeit im Menschen mit diesen Veränderungen zusammenhängt (FADDA and ROSSETTI 1998). Aufgrund der Tatsache, dass sich die meisten experimentellen Ansätze beim Menschen aus ethischen Gründen nicht realisieren lassen, wurden zahlreiche Paradigmen entwickelt, um Alkoholtoleranz in Säuger- und Invertebraten Modellen zu studieren (CRABBE et al. 1994; SCHOLZ et al. 2000; TABAKOFF et al. 1986; WOLF and HEBERLEIN 2003; WOLF et al. 2002). Zum Beispiel werden Säuger-Modelle genutzt, die zeigen, dass Toleranz gegenüber ethanolinduzierter Hypothermie, Bewusstlosigkeit und sogar gegen letale Effekte entwickelt werden kann (CRABBE et al. 1979; CUNNINGHAM et al. 1983).

Mit solchen Tiermodellen können drei unterschiedliche Formen von funktioneller Toleranz definiert werden (KALANT et al. 1971; TABAKOFF et al. 1986). Die erste Art ist die akute Toleranz. Sie wird erworben und manifestiert sich im Zeitraum der Ethanol-Exposition. Rapide Toleranz, als zweite Form, wird durch die erste Alkoholgabe induziert. Mithilfe einer zweiten Ethanolgabe kann die rapide Toleranz gemessen werden, nachdem das Ethanol des ersten Kontakts vollständig metabolisiert wurde (Abbildung 1). Die chronische Toleranz ist letztendlich die dritte Form von Toleranz. Sie wird durch andauernden oder wiederholten Kontakt mit geringen Mengen an Alkohol über einen längeren Zeitraum entwickelt (BERGER et al. 2004; KALANT et al. 1971).

Zur Identifizierung von Genen und molekularen Mechanismen, die der funktionellen Toleranz unterliegen, wird häufig *Drosophila melanogaster* als Modellsystem verwendet (GUARNIERI and HEBERLEIN 2003; MANEV et al. 2003; SCHOLZ et al. 2000; WOLF and HEBERLEIN 2003). Für Fliegen ist gezeigt worden, dass sich die chronische Toleranz von der rapiden Toleranz unterscheidet. Sie hält doppelt so lange an und benötigt die Synthese von Proteinen (BERGER et al. 2004). Für diese

Arbeit ist jedoch ausschließlich die rapide, funktionelle Toleranz von Bedeutung, da sich diese auf synaptische Plastizität bezieht (SCHOLZ *et al.* 2000).

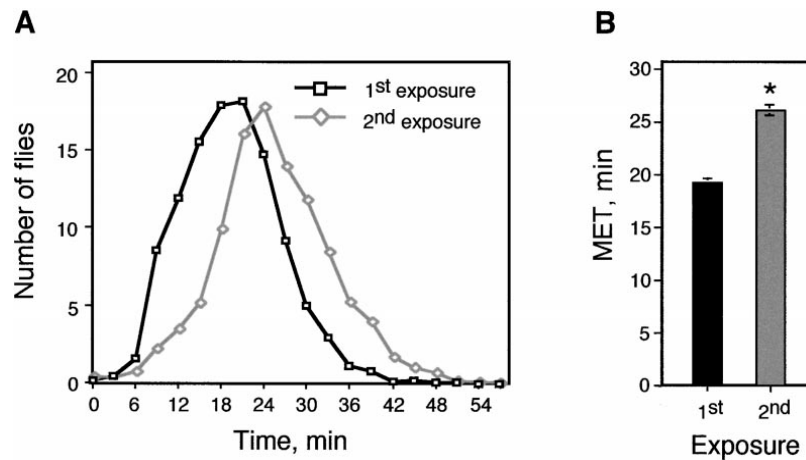


Abbildung 1: Entwicklung von Ethanol Toleranz bei Wildtyp-Fliegen im Inebriometer.

Schematisch dargestellt ist die Verteilung von Fliegen, die nach Ethanolbegasung aus dem Inebriometer fallen. Wildtypfliegen werden bei einer Standard Ethanolkonzentration nach Verlust ihrer posturalen Kontrolle eluiert, mit einem Profil ähnlich einer Normalverteilung (A) und einer Mean Elution Time (MET) von 19,56 min (B). Die MET ist dabei die Zeit, zu der durchschnittlich die meisten Fliegen aus dem Inebriometer eluiert werden. Bei erneuter Ethanolgabe derselben Fliegen 4 h nach der ersten Messung ist deren Elutionsprofil ebenfalls angenähert normal, aber in Richtung längerer Zeiten verschoben. Die zweite MET nach 4 h beträgt 26,26 min (B), was einer 35 %igen Zunahme entspricht und als Ethanoltoleranz definiert wird (SCHOLZ *et al.* 2000).

Da Fliegen zum Trinken nicht gezwungen werden können, sind ihre Atemwege der einzige Weg zur gezielten Ethanolapplikation. Dazu werden die Fliegen im Inebriometer mit Ethanoldampf einer definierten Konzentration begast. So kann die Entwicklung der rapiden, funktionellen Ethanoltoleranz der Versuchstiere induziert und gemessen werden. Das Inebriometer misst dabei den Effekt von Ethanol auf das Körpergleichgewicht der Fliege (COHAN 1985). Nach einer gewissen Zeit der Ethanolbegasung verlieren die Fliegen ihre posturale Kontrolle und fallen aus der Messapparatur (Abbildung 8).

1.3 *Drosophila melanogaster* als Modellorganismus

Seit 1901 wird mit *Drosophila* Stämmen in Laboratorien gearbeitet, erstmals eingeführt durch den Vererbungsforscher William Ernest Castle in Harvard (SNELL and REED 1993). Invertebraten haben ein um einige Größenordnungen weniger komplexes Nervensystem als Säuger, da sie nur ungefähr 150.000 Neurone ausbilden im Gegensatz zu 100 Milliarden Nervenzellen der Menschen (FEATHERSTONE and BROADIE 2000; SHIMADA *et al.* 2006). Obwohl Fruchtfliegen auf den ersten Blick Vertebraten nicht sehr ähnlich sind, existieren bei näherer Betrachtung viele Gemeinsamkeiten. Zum Beispiel müssen Fliegen genau wie höhere Organismen nach Nahrung suchen, sich reproduzieren, Aktivität und Ruhephasen koordinieren und den Tod vermeiden. Diese angeborenen Verhaltensweisen sind nicht nur unwahrscheinlich komplex, sondern auch durch Erfahrung modifizierbar. Solche Verhalten benötigen die Vernetzung von sensorischen Eingängen und Koordination mit angemessenen motorischen Reaktionen. Obwohl die Komplexität einer Entscheidungsfindung bei Invertebraten deutlich niedriger ist als bei Säugern, haben diese Organismen Fähigkeiten zur kognitiven Prozessierung. Zum Beispiel können Fliegen verschiedene Merkmale aus ihrer Umgebung miteinander verbinden und ein Gedächtnis für solche Assoziationen aufbauen (DUDAI 1988; LIU *et al.* 2006; QUINN *et al.* 1974; TULLY and QUINN 1985).

Vertebraten und Invertebraten stimmen in vielen Verhaltensmustern und in einigen Bereichen der Grundstruktur der Nervensysteme überein (BARGMANN 1998; GUARNIERI and HEBERLEIN 2003; MANEV *et al.* 2003). Für *Drosophila melanogaster* wurde beschrieben, dass im Laufe der Evolution viele Gene, Mechanismen und Prozesse hochkonserviert wurden und homolog zu denen höherer Lebewesen sind. Fruchtfliegen besitzen nahezu alle Neurotransmitter der Vertebraten, sowie Rezeptoren und Kanäle für Neurotransmitter und Signaltransduktionsmechanismen (FADDA and ROSSETTI 1998; ROEDER 2005). Dadurch wird die Bedeutung der Fliege als Modell aufgezeigt, um zum Beispiel die synaptische Entwicklung, Funktion und Plastizität in anderen Organismen zu verstehen (SCHUSTER 2006).

Die Bandbreite an verfügbaren experimentellen Techniken und Werkzeugen zur Studie an

Invertebraten unterscheidet sich deutlich von der bei Säugern (BRAND and PERRIMON 1993; MANEV et al. 2003). Der Hauptvorteil von Fliegen ist die Einfachheit des Organismus, die extrem kurze Generationszeit, die einfache Haltung der Versuchstiere und das Ausmaß mit denen sie genetisch manipulierbar sind (BRAND and PERRIMON 1993). Daraus ergibt sich der Vorteil, dass große Populationen bereitgestellt werden können. Bei Verhaltensanalysen mit einer großen Anzahl an genetisch identischen Tieren kann so die Variabilität reduziert und die statistische Signifikanz erreicht werden (WOLF and HEBERLEIN 2003). Die Kontrolle des genetischen Hintergrunds mit nur 4 Chromosomen, die Verfügbarkeit zahlreicher Wildtypen und Mutanten und die kurze Generationszeit unterstützen zudem eine systematische Analyse komplexer Zusammenhänge mittels *Drosophila* Genetik. Beispielsweise spielt bei der Suchtforschung und bei der Erforschung von Lernen und Gedächtnis die Fruchtfliege eine wichtige Rolle als Modellorganismus (DUDAI 1988; DZITOYEVA et al. 2003b; GUARNIERI and HEBERLEIN 2003; MANEV et al. 2003; RUBIN 1988; SCHOLZ et al. 2000; TULLY and QUINN 1985).

Moleküle, Gene und Signaltransduktionskaskaden, die mit akuter Ethanolintoxikation in Zusammenhang stehen, konnten in *Drosophila* beschrieben werden (GUARNIERI and HEBERLEIN 2003). Zum Beispiel wurden veränderte ethanolabhängige Verhaltensantworten mit verschiedenen Genen in der Fruchtfliege in Verbindung gebracht (MOORE et al. 1998; SCHOLZ et al. 2000). Dem Gen *hangover* konnte der Einfluss im ethanolinduzierten Verhalten nachgewiesen werden. *Hangover* kodiert für ein Zinkfingerprotein und ist für die Entwicklung von Ethanoltoleranz entscheidend (SCHOLZ 2005). Des Weiteren wird für die Entwicklung von rapider Ethanoltoleranz das *slowpoke* Gen benötigt, welches für einen Kaliumkanal kodiert (COWMEADOW et al. 2005; COWMEADOW et al. 2006). Allein die Induktion der *Slowpoke* -Expression führt zu einem Verhalten, das der Entwicklung von Ethanoltoleranz entspricht (COWMEADOW et al. 2006). Ein weiteres Gen, das für die Entwicklung von Ethanoltoleranz unabkömmlich ist, ist das *Tyramin- β -Hydroxylase (T β H)* Gen. Die T β H katalysiert die Synthese des biogenen Amins Oktopamin, welches wiederum benötigt wird, um eine wildtypische Ethanoltoleranz zu entwickeln (SCHOLZ et al. 2000). Weitere Gene mit Einfluss auf das ethanolinduzierte Verhalten sind zum Beispiel das Gen

für die regulatorische Untereinheit der Proteinkinase A (PARK *et al.* 2000), sowie das Gen *amnesiac*, welches für ein aktivierendes Neuropeptid des zyklischen Adenosin-Mono-Phosphat (cAMP) Signaltransduktionsweges kodiert. Das Gen *DCO*, das für die haupt-katalytische Untereinheit der cAMP abhängigen Proteinkinase (PKA-C1) kodiert, hat wie die zwei zuvor genannten Gene Einfluss auf die Entwicklung von Ethanol sensitivität (MOORE *et al.* 1998). Eine Nullmutante für das *homer* Gen entwickelt ebenfalls eine erhöhte Ethanol sensitivität und eine reduzierte Ethanol toleranz. Postuliert wird, dass das *homer* Gen verantwortlich für die Regulation und Erhaltung synaptischer Strukturen und synaptischer Plastizität ist (URIZAR *et al.* 2007). Drei weitere Gene die mit Ethanol sensitivität in Verbindung gebracht werden, sind *rutabaga*, ein Gen, das für eine Kalzium- Kalmodulinabhängige Adenylatzyklase kodiert (Cho *et al.* 2004), *fasciclin II* (*fasII*), ein Rezeptor für axonale Migration und Zelladhäsion (CHENG *et al.* 2001) sowie das Gen, welches für den GABA_B Rezeptor kodiert (DZITOYEVA *et al.* 2003a).

Bei Untersuchungen mittels Microarrays mit *Drosophila* RNA nach akuter Ethanolgabe, wurden zum Beispiel veränderte Transkriptionsraten von für den Geruchssinn wichtigen Genen festgestellt. Einige solcher Gene kodieren für Duftbindungsproteine, wie *lush*, *Obp19a*, *Pbprp1-5*, oder ein anderes für den Duftrezeptor *Or67d*. Andere veränderte Transkriptionsraten wurden bei Genen detektiert, die für Enzyme und Komponenten von Signaltransduktionskaskaden, wie die Proteinkinase C oder die γ -Untereinheit des trimeren G-Proteins, und Transkriptionsfaktoren kodieren, wie *Cabut*, *Aly*, und *Drop*, die in die Ubiquitinylierung von Proteinen involviert sind (MOROZOVA *et al.* 2006).

Wie man sehen kann, wurde für eine Vielzahl von Genen die Beteiligung bei ethanolinduzierten Prozessen nachgewiesen. In der vorliegenden Arbeit wurde der Einfluss der Tyramin- β -Hydroxylase auf das ethanolinduzierte Verhalten untersucht. Es sollte überprüft werden, ob damit verbundene putative Komponenten des oktopaminergen Systems in *Drosophila* die Ethanol sensitivität und Toleranz beeinflussen. Darum wird im Folgenden zunächst die Synthese von Oktopamin und darauf folgend das oktopaminerge System von *Drosophila* näher beschrieben.

1.4 Oktopamin und Noradrenalin - zwei homologe Moleküle

Oktopamin wurde von dem italienischen Wissenschaftler Vittorio Erspamer 1948 in den Speicheldrüsen des Tintenfisch (*Octopus vulgaris*) entdeckt (ERSPAMER 1952; ERSPAMER and BORETTI 1951). Es gilt als ein wichtiges neuroaktives Molekül, hauptsächlich bei Invertebraten und ist in viele Prozesse involviert (AXELROD and SAAVEDRA 1977; ROEDER 1999; ROEDER and NATHANSON 1994). In Invertebraten besitzt Oktopamin ähnliche Funktionen wie Noradrenalin bei Vertebraten. Daher wird Oktopamin als Homolog von Noradrenalin betrachtet (ROEDER 2005). Oktopamin und Noradrenalin gehören ebenso wie Dopamin, Serotonin und Adrenalin zur Gruppe der biogenen Amine. Diese sind metabolische Derivate von Aminosäuren, die Stickstoff enthalten (MONASTIRIOTI 1999; ROEDER 2005). Oktopamin und Noradrenalin konnten in verschiedenen Geweben von Vertebraten und Invertebraten detektiert werden (AXELROD 1977; BLAKELY et al. 1994; DAVID and COULON 1985; MCCAMAN et al. 1972; MONASTIRIOTI 1999; ROEDER 1999) (Evans,1980; Orchard,1982; Molinoff,1972). Der Biosyntheseweg von Oktopamin und Noradrenalin ist in Abbildung 2 dargestellt.

Als erster Schritt der Oktopaminsynthese erfolgt die Decarboxylierung von Tyrosin zu Tyramin mittels Tyrosin-Decarboxylase (Tdc). In *Drosophila melanogaster* kodieren zwei Gene für die Tyrosin-Decarboxylase. Das *Tdc1* Gen ist in nicht-neuronalen Geweben aktiv, das *Tdc2* Gen hingegen wird in neuronalem Gewebe (ZNS) exprimiert (COLE et al. 2005). Im zweiten Schritt der Oktopamin-Biosynthese wird am β -Kohlenstoff der Seitenkette von Tyramin durch die Tyramin- β -Hydroxylase (*T β H*) eine Hydroxylgruppe angehängt. Es entsteht Oktopamin (ROEDER 2005). Im Invertebraten Gehirn erfolgt die Signaltransduktion von Oktopamin über G-Protein-gekoppelte Rezeptoren (BLENAU and BAUMANN 2001).

Ebenfalls in Abbildung 2 dargestellt, ist die Biosynthese von Noradrenalin. Tyrosin wird durch die Tyrosin-Hydroxylase (TH) zu 3,4-dihydroxyphenylalanin (Levodopa=L-Dopa) hydroxyliert. Dopamin, welches ebenfalls in die Gruppe der Katecholamine fällt, kann mittels der Dopa-Decarboxylase aus L-Dopa synthetisiert werden. Im letzten Schritt der Synthese entsteht durch

Hydroxylierung mithilfe der Dopamin- β -Hydroxylase/Monooxygenase Noradrenalin. Dabei wird eine Hydroxylgruppe an die Kohlenstoffkette gebunden (KAMACHI *et al.* 2005). Oktopamin und Noradrenalin unterscheiden sich in nur einer Hydroxylgruppe an Position 3 des Phenolrings (Abbildung 2) (ROEDER 1999). Die Signaltransduktion für Noradrenalin erfolgt in Vertebratengehirnen über α_2 -adrenerge Rezeptoren, die ebenfalls wie die Oktopaminrezeptoren bei Invertebraten G-Protein gekoppelt sind (AXELROD and SAAVEDRA 1977; ROEDER 2005).

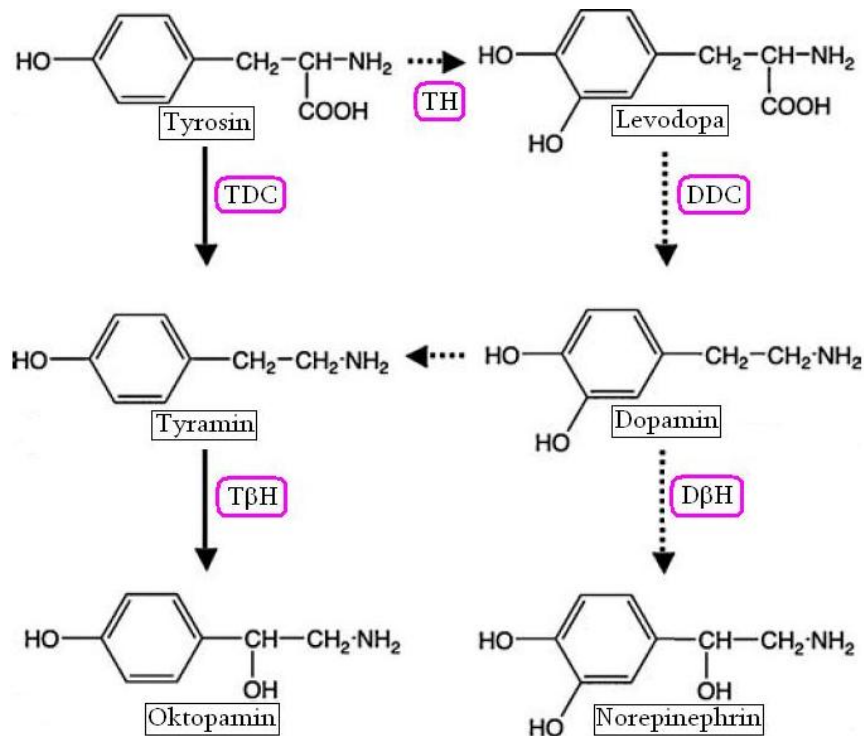


Abbildung 2: Biosynthese von Oktopamin und Noradrenalin.

Aus der Aminosäure Tyrosin werden Tyramin und L-Dopa katalysiert. Oktopamin wird mittels der Tyramin- β -Hydroxylase ($T\beta H$) aus Tyramin hergestellt. Ein alternativer Syntheseweg von Tyramin, ohne Notwendigkeit der Tdc ist ebenfalls gezeigt (gepunktete Pfeile). Zudem kann mittels der Dopamin-beta-Hydroxylase ($D\beta H$) Noradrenalin aus Dopamin synthetisiert werden (modifiziert nach (ROEDER 2005)).

Oktopamin wird als das Homolog von Noradrenalin in Insekten angesehen (Roeder 1999; Roeder 2005). Paradoxerweise konnten Vorkommen von Oktopamin in Vertebraten und auf der anderen Seite Noradrenalin in Invertebraten festgestellt werden (Axelrod 1977; David and Coulon 1985; Masuoka *et al.* 1964; McCaman *et al.* 1972; Redouane and Fuzeau-Braesch 1984). Die jeweilige Funktion beider Moleküle ist dabei jedoch nicht bekannt. Das Enzym, welches die Synthese von

Oktopamin in Invertebraten gewährleistet ist die Tyramin-beta-Hydroxylase (T β H) und das Enzym, welches die Synthese von Noradrenalin in Vertebraten bereitstellt, die Dopamin- β -Hydroxylase (D β H) (Kamachi et al. 2005; Monastirioti 1999). Beide Enzyme besitzen eine DOMON-Domäne und einen C- bzw. N-Terminus für eine Monooxygenase-Domäne (Ponting 2001) (Abbildung 12). Die beiden Proteine sind in 39% ihrer Sequenz homolog zueinander. In *Drosophila melanogaster* wurde bisher kein Gen als Dopamin- β -Hydroxylase identifiziert. Jedoch wird bei der Tyramin- β -Hydroxylase eine Dopamine- β -Monooxygenase-Aktivität verzeichnet, bzw. eine Ähnlichkeit der konservierten Domänen, (<http://flybase.bio.indiana.edu/reports/FBgn0010329.html>). Es ist demzufolge denkbar, dass auch Noradrenalin in Invertebraten mittels der T β H synthetisiert wird.

1.5 Das oktopaminerge System in *Drosophila melanogaster*

Anhand von physiologischen Studien des Hummers *Homarus americanus*, der Honigbiene *Apis mellifera* und der Fruchtfliege *Drosophila melanogaster* wurde die Rolle von Oktopamin als Neurotransmitter, Neuromodulator und als Neurohormon beschrieben (DAVID and COULON 1985; EVANS 1985; HAMMER and MENZEL 1998; KRAVITZ et al. 1976).

Oktopamin ist an der Prozessierung von sensorischer Information beteiligt. Die Funktion einiger peripherer Organe - wie die Ovarien oder die Flugmuskulatur - und zahlreicher Strukturen im zentralen Nervensystem, wird von Oktopamin moduliert (BATTELLE and EVANS 1984; FISCHER and FLOREY 1987; FUSSNECKER et al. 2006; KINNAMON et al. 1984; KREISSL et al. 1994; MONASTIRIOTI 2003; ROEDER 1999; SINAKEVITCH and STRAUSFELD 2006; SPORHASE-EICHMANN et al. 1992; STEVENSON et al. 1992). Oktopamin spielt zudem eine wichtige Rolle bei der Modulation vieler weiterer physiologischer Prozesse, wie zum Beispiel bei der Phototaxis und dem Lernen und Gedächtnis in Bienen und Fruchtfliegen (DELACOUR et al. 1983; DUDAI 1988; HAMMER and MENZEL 1998; HILDEBRANDT and MULLER 1995), speziell dem Zucker Belohnungslernen (SCHWAERZEL et al. 2003), oder bei der Ethanoltoleranz (SCHOLZ et al. 2000). Ebenfalls moduliert Oktopamin die Reproduktionsorgane (CLARK and LANGE 2003; LEE et al. 2003; MIDDLETON et al. 2006;

MONASTIRIOTI 2003). Als Neurohormon stimuliert Oktopamin zum Beispiel den Energiemetabolismus während der Stressantwort (DAVID and COULON 1985), die endokrine Sekretion, die cardiovasculäre Kontrolle und die zirkardiane Rhythmik (BLENAU and BAUMANN 2001).

Funktionelle Ähnlichkeiten zeigen sich zwischen Oktopamin und Noradrenalin unter anderem auch im peripheren Nervensystem, in dem beide als Stresshormone agieren (ENNACEUR *et al.* 1986; MOBIUS and PENZLIN 1993; ROEDER 1999). Bei Invertebraten wird bei Stress Oktopamin freigesetzt, zum Beispiel bei der Startle-Response (SCHOLZ 2005) Die Kontraktionseigenschaften der meisten Muskeln werden durch dieses neuroaktive Molekül modifiziert, wie auch die Aktivierung des Metabolismus des Fettkörpers nach Oktopaminapplikation induziert wird (FISCHER and FLOREY 1987; FONTANA *et al.* 2000; NAKANO *et al.* 1969). Dies befähigt das Insekt stark energieverbrauchende Aktivitäten, zum Beispiel den Langzeitflug durchzuführen.

Bei Insekten wurde gezeigt, dass eine kleine Anzahl an oktopamin-enthaltenden Neuronen die meisten Neuropile des Gehirns, wie die Pilzkörper, die optischen Loben oder das Zentralgehirn mit einem dichten Maschenwerk an Verästelungen innerviert (DACKS *et al.* 2005; KREISSL *et al.* 1994; MONASTIRIOTI 1999; SINAKEVITCH and STRAUSFELD 2006). Unter den ungefähr 100 oktopaminergen Neuronen bei der Honigbiene (KREISSL *et al.* 1994; SINAKEVITCH *et al.* 2005), den 86 beim Hummer (SCHNEIDER *et al.* 1996; SCHNEIDER *et al.* 1993) und den ca. 100 der Fruchtfliege (MONASTIRIOTI 1999; SINAKEVITCH and STRAUSFELD 2006), gibt es so genannte VUM (ventral unpaired median) Neurone. Diese haben ihre Somata ventral des subösophagealen Ganglion und projizieren in große Neuropil-Bereiche des Gehirns (HAMMER and MENZEL 1998).

Eines der subösophagealen VUM-Neurone (VUMmx1), das den Pilzkörper der Honigbiene innerviert, spielt eine essentielle Rolle beim olfaktorischen Lernen in der Honigbiene (HAMMER and MENZEL 1998). Oktopamin enthaltende VUM-Neurone setzen lokal Oktopamin in definierten Bereichen des Insektennervensystems frei und sind auf diese Weise in die Generierung von spezifischen Verhaltensmustern involviert (SOMBATI and HOYLE 1984). Es wird vermutet, dass

Noradrenalin bei Vertebraten und Oktopamin bei Invertebraten an der Regulation der generellen neuronalen Aktivität teilhaben und mit der 'Motivation' der Organismen in Zusammenhang stehen (GRUNTENKO et al. 2007; HIRASHIMA et al. 1999; SIEGMUND and KORGE 2001; THOMPSON et al. 1990)

Oktopamin ist in Invertebraten in neuronalen sowie nicht-neuronalen Geweben enthalten (ERSPAMER and BORETTI 1951; HAN *et al.* 1998; ROEDER and NATHANSON 1994). Die Verteilung von Oktopamin in spezifischen Neuronen und Neuropilen bei *Drosophila* wurde immunohistochemisch mithilfe von Antikörpern gegen Oktopamin untersucht (MONASTIRIOTI 1999; SINAKEVITCH and STRAUSFELD 2006). Frühere Studien zeigen, dass oktopaminerge Zellkörper caudal, frontal, ventral, dorsal und lateral des adulten Zentralgehirns identifiziert werden können (Abbildung 3). Die relativ geringe Anzahl von ungefähr 100 oktopaminergen Zellkörpern im Gehirn von *Drosophila melanogaster*, resultiert in einem weit reichenden dichten Maschenwerk an Arborisationen und Projektionen in nahezu alle Bereiche des Gehirns (SINAKEVITCH and STRAUSFELD 2006). Unter anderem können die Areale der Calyces des Pilzkörpers, die optischen Loben, die Antennalloben der Subösophagialganglion-Bereich (SOG) und der Zentralkomplex (Abbildung 4) als stark innerviert von oktopaminergen Projektionen gezeigt werden (Abbildung 3) (Nomenklatur, siehe Ergebnisse Tabelle2).

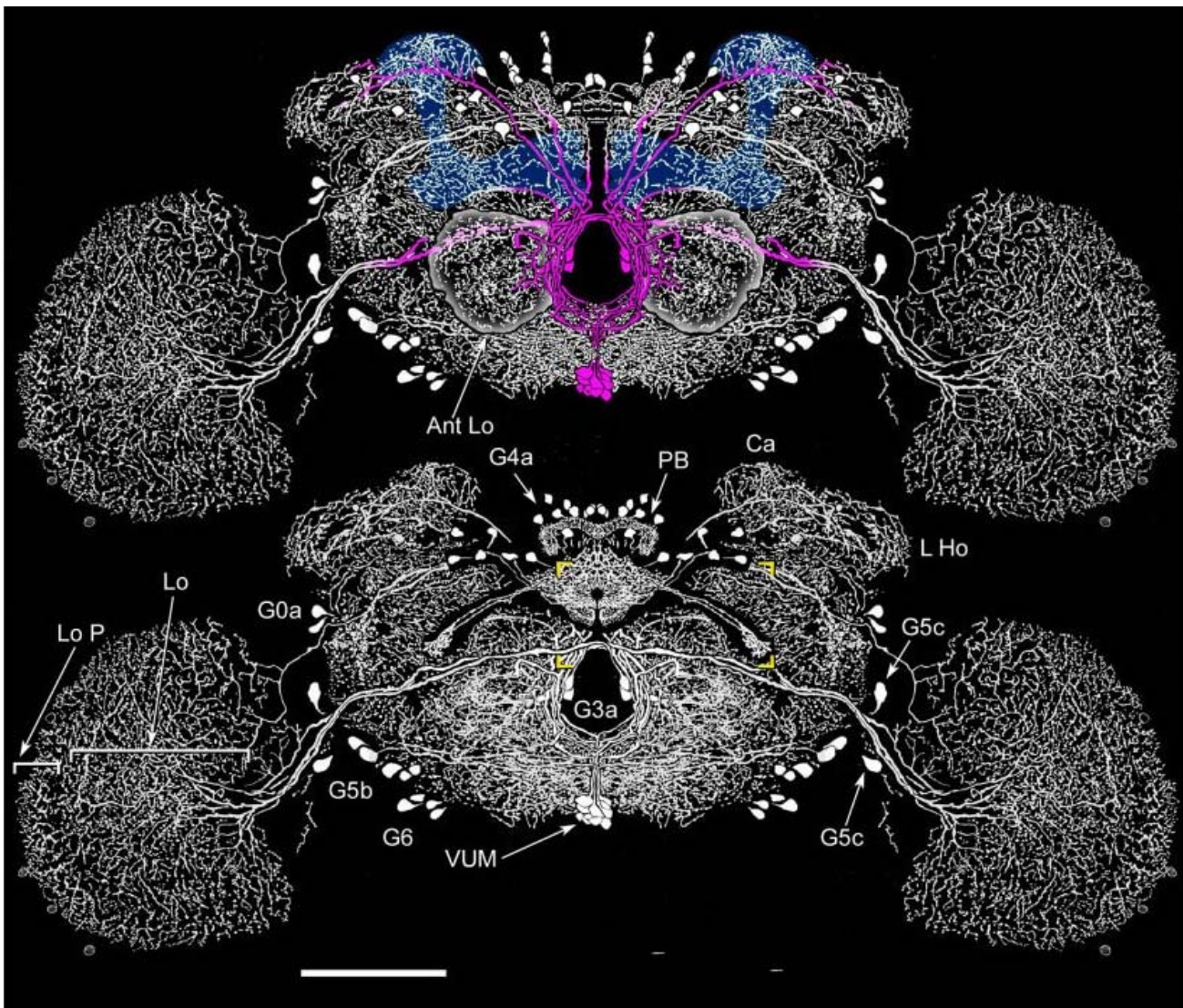


Abbildung 3: Rekonstruktion der Oktopamin Immunreaktivität im Gehirn von *Drosophila melanogaster* (SINAKEVITCH and STRAUSFELD 2006).

Das obere Bild zeigt die Frontalansicht auf das transparent dargestellte Gehirn und das untere die Caudalansicht. Die Pilzkörper Calyces, Peduncel und der mediale Lobus sind blau unterlegt. Nur die Calyces empfangen scheinbar immunoreaktive Projektionen von oktopaminergen Zellen. Die VUM Cluster projizieren bilateral in die subösophagealen Neuromere, sowie zu supraösophagealen Neuropilen (magenta). Von diesen Projektionen innerviert die am weitesten laterale die Antennalloben (Ant Lo), das Tritocerebrum, den Calyces (Ca) und das laterale Horn (L Ho). Die optischen Loben sind ebenfalls stark innerviert von oktopaminergen Aborisationen. Der Zentralkomplex wird in den Bereichen der protocerebralen Brücke (pb), dem Fächerförmigen Körper (fb) sowie dem Ellipsoid Körper (eb) von oktopaminergen Projektionen innerviert, wobei die Zellkörper ebenfalls in das Protocerebrum Aborisationen senden. Größenbalken 50 µm

In der vorliegenden Arbeit spielt der Zentralkomplex (cx) eine besondere Rolle, da die zu untersuchende Entwicklung von Ethanol sensitivität und Toleranz unter anderem von Teilen des cx moduliert werden (RODAN et al. 2002; SCHOLZ et al. 2000; URIZAR et al. 2007). Zudem ist der Zentralkomplex an der Koordination der Lokomotion der Fliegen beteiligt (STRAUSS and HEISENBERG 1993). Der Zentralkomplex setzt sich aus vier Strukturen zusammen: der Protocerebralen Brücke (pb), dem Fächerförmigen Körper (fb), dem Ellipsoid Körper (eb) und den Noduli (no) (Abbildung 4)(HANESCH 1989).

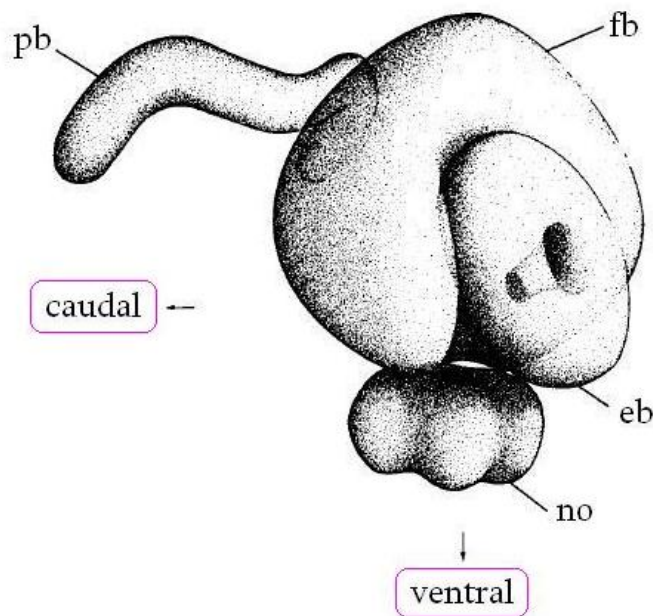


Abbildung 4: Schematische Darstellung des Zentralkomplexes (Cx) (HANESCH 1989).

Am weitesten caudal befindet sich die Protocerebrale Brücke (pb), weiter frontal liegt erst der Fächerförmige Körper (fb) und noch weiter frontal der Ellipsoid Körper (eb). Die Noduli liegen ventral des fb und eb.

Bei Inhibition von bestimmten Klein- und Großfeld-Neuronen, die den cx innervieren, bzw. einzelne seiner Komponenten miteinander verbinden, können veränderte ethanolinduzierte Verhaltensweisen verzeichnet werden (HANESCH 1989; RODAN et al. 2002; SCHOLZ et al. 2000; URIZAR et al. 2007). Zur Analyse, welche Bereiche des Zentralgehirns eine Rolle bei der Entwicklung von Ethanol sensitivität und Toleranz spielen, wurde das GAL4/UAS System genutzt (BRAND and PERRIMON 1993), um eine zielgerichtete Expression von Tetanustoxin (TNT) in bestimmten Gehirnarealen zu gewährleisten. Tetanustoxin schneidet neuronales Synaptobrevin und unterbindet somit die Fusion der Neurotransmittervesikel mit der Membran, so dass keine Synaptobrevin-abhängige Neurotransmitterausschüttung stattfinden kann (SWEENEY et al. 1995).

Unter anderem wurde der Einfluss der Expression des *UAS-TNT* Transgens in Neuronen, die den Cx innervieren auf die Entwicklung von Ethanol sensitivität und Toleranz getestet (SCHOLZ et al. 2000).

Bei früheren Studien, in denen ein PKA-Inhibitor mittels verschiedener GAL4-Linien in speziellen Neuronengruppen exprimiert wurde, konnte bei Verwendung der Linien c107 und c522 eine erhöhte Ethanolresistenz festgestellt werden (RODAN et al. 2002). Die Expressionsmuster dieser GAL4-Linien umfassen dabei ebenfalls Strukturen des Cx, wie etwa Kleinfeld-Neurone bei der c107-GAL4-Linie, die zum Ellipsoid Körper und zum Fächerförmigen Körper projizieren (RODAN et al. 2002).

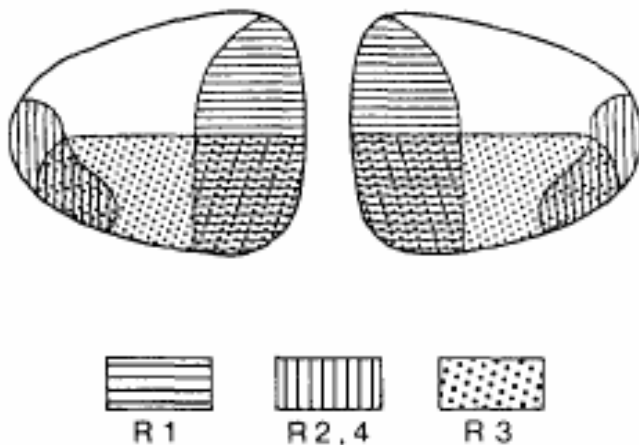


Abbildung 5: Übersichtszeichnung von den vier verschiedenen Ringneuronentypen (R1-R4) innervierten Strukturen des Ellipsoidkörpers (EB) (Querschnitt) (HANESCH 1989).

Die R1 Neurone innervieren den inneren Ring des EB, die R2 + R4 Neurone den äußeren Ring und R3 Neurone zeigen Innervationen im Bereich der Ellipsoid Körper-Ringe.

Strukturen des Zentralkomplex werden von oktopaminergen Neuronen innerviert (SINAKEVITCH and STRAUSFELD 2006), welche den sensorischen Input über Neurotransmission auf G-Protein gekoppelte Rezeptoren der Prä- und/oder Postsynapsen übertragen (EVANS and MAQUEIRA 2005; HAN *et al.* 1998; ROEDER 2005). Auf diese Art und Weise werden Signaltransduktionskaskaden aktiviert, welche die Grundlagen für neuronale Plastizität und somit für Prozesse des Lernens und Gedächtnisses darstellen (BERKE and HYMAN 2000; CUNNINGHAM *et al.* 1983; FADDA and ROSSETTI 1998; KALANT *et al.* 1971; ROEDER 2005; TABAKOFF *et al.* 1986).

1.6 Fragestellung

Untersuchungen der *TβH^{M18}* Mutante haben eine starke Reduktion der Oktopamin-Konzentration im Fliegengehirn ergeben (MONASTIRIOTI et al. 1996). Zudem können diese *TβH^{M18}* Mutanten nur eine reduzierte Toleranz gegenüber Ethanol entwickeln (SCHOLZ et al. 2000). Die Tyramin-β-Hydroxylase (*TβH*) ist das Enzym, welches Oktopamin aus Tyramin synthetisiert. Zunächst sollte deshalb das *TβH*-Gen der *TβH^{M18}* Mutante analysiert werden, um zu zeigen, dass der Phänotyp tatsächlich auf den Verlust der Tyramin-β-Hydroxylase zurückzuführen ist. Zudem stellt sich die Frage, welche oktopaminergen Neurone bei der Entwicklung von ethanolinduziertem Verhalten eine Rolle spielen. Es sollten dazu regulatorische Bereiche der Promoterregion des *TβH* Gens mit dem *GAL4* Gen ligiert und als Transgen in die Fliege gebracht werden. In dieser Arbeit sollten somit verschiedene *TβH-GAL4* Treiberlinien hergestellt werden, die GAL4 in putativ oktopaminergen Neuronen exprimieren. Die Neurotransmission der GAL4 exprimierenden Neuronen dieser Fliegenlinien sollte inhibiert, bzw. die Zellen inaktiviert und dessen Effekt auf die Entwicklung von Ethanolsensitivität und Toleranz untersucht werden. Zudem sollten die Expressionsmuster der verwendeten GAL4-Linien neuroanatomisch untersucht werden.

2 Material und Methoden

2.1 Verwendete Materialien

2.1.1 Bakterienstämme

Bakterien	Firma
<i>E.coli</i> XL1-blue	Stratagene

2.1.2 Fliegenstämme

Linie	Genotyp	Referenz
<i>TβH^{M18}</i>	<i>TβH</i> Deletionsmutante X-Chromosom	Scholz unveröffentlicht
<i>w¹¹¹⁸/TβH^{MF372}</i>	<i>white</i> , P-Element-Insertion im <i>TβH</i> Gen enthält Wildtyp <i>white</i> -cDNA X-Chromosom	(MONASTIRIOTI <i>et al.</i> 1996)
<i>w¹¹¹⁸/TβH^{M18}, UAS-TβH</i>	<i>white</i> , P-Element enthält Wildtyp <i>white</i> -cDNA und Wildtyp <i>TβH</i> -cDNA X-Chromosom	Scholz unveröffentlicht
<i>w¹¹¹⁸</i>	<i>white</i> Mutante	Scholz
<i>w¹¹¹⁸; 6.2 TβH_2-GAL4</i> (angegeben als 6.2 <i>TβH</i> -GAL4)	<i>white</i> , P-Element enthält Wildtyp <i>white</i> DNA 2.Chromosom	S. Hampel (nicht publiziert)
<i>w¹¹¹⁸; + ; 650 TβH_40-GAL4</i> (angegeben als 650 <i>TβH</i> -GAL4)	<i>white</i> , P-Element enthält Wildtyp <i>white</i> DNA 3. Chromosom	S. Hampel (nicht publiziert)
<i>w¹¹¹⁸; Tdc2-GAL4</i>	<i>white</i> , P-Element enthält Wildtyp genomische DNA 2.Chromosom	(COLE <i>et al.</i> 2005)
<i>w¹¹¹⁸; 1.3 TβH_C-GAL4</i> (angegeben als 1.3 <i>TβH</i> -GAL4)	<i>white</i> , P-Element enthält Wildtyp <i>white</i> DNA 2. Chromosom	S. Hampel (nicht publiziert)

Linie	Genotyp	Referenz
<i>w¹¹⁸; 4.6TβH_6.5E-GAL4</i> (angegeben als 4.6 <i>TβH-GAL4</i>)	<i>white</i> , 2 P-Element enthält Wildtyp <i>white</i> DNA 2. Chromosom	S. Hampel (nicht publiziert)
<i>w¹¹⁸; 6.6TβH_1-GAL4</i> (angegeben als 6.6 <i>TβH-GAL4</i>)	<i>white</i> , P-Element enthält Wildtyp <i>white</i> DNA 2. Chromosom	S. Hampel (nicht publiziert)
<i>w¹¹⁸; UAS-TNT (pin7-2)</i>	<i>white</i> , P-Element enthält Wildtyp <i>white</i> cDNA 2. Chromosom	(SCHOLZ <i>et al.</i> 2000)
<i>w¹¹⁸; UAS-EGFP-kir2.1</i>	<i>white</i> , P-Element enthält Wildtyp <i>white</i> -cDNA 2. Chromosom	(BAINES <i>et al.</i> 2001)
<i>w¹¹⁸; UAS-mCD8-GFP</i>	<i>white</i> , P-Element enthält Wildtyp <i>white</i> -cDNA 2. Chromosom	(LEE and LUO 1999)
<i>w¹¹⁸; + ; Appl-GAL4</i>	<i>white</i> , 3. Chromosom	(GUNAWARDENA and GOLDSTEIN 2001)
<i>w¹¹⁸; + ; UAS-PKA-inh</i>	<i>white</i> , 3. Chromosom	(RODAN <i>et al.</i> 2002)
<i>TβH^{M18}; hsp70-TβH</i>	<i>white⁺</i> , 2. Chromosom	(SCHWAERZEL <i>et al.</i> 2003)

Es wurden 40 verschiedene Insertionslinien der *w¹¹⁸; +; 650TβH-GAL4* Linie hergestellt aber nicht dokumentiert, da diese Insertionslinien nicht zur anatomischen Analyse und für Verhaltensversuche verwendet wurden. Es wurde lediglich eine immunohistochemische Stichprobe von 5 dieser Linien durchgeführt, wovon eine (*w¹¹⁸; +; 650TβH_40-GAL4*) zur weiteren Analyse verwendet wurde. Die anderen 4 Linien sind:

(1) *w¹¹⁸; +; 650TβH_4-GAL4*

(2) *w¹¹⁸; +; 650TβH_11-GAL4*

(3) *w¹¹⁸; +; 650TβH_26-GAL4*

(4) *w¹¹⁸; +; 650TβH_38-GAL4*

2.1.3 DNA- Material

Primer (b=β)	Sequenz	Position
TbHpromF4	5' -GTT TAG GAC TGT GGC TTT GC - 3'	+18.208
TbHpromR4	5' -TGC CAT AAC TCG AAG CCA AG- 3'	+19173
Unnamed sense	5' -ATT CCG CTG CAG CTG AGC AGT- 3'	+3685
Unnamed anti	5' -GGA CTG ACA CTC ACG GAG ACA- 3'	+4422
TbH-SacI-anti	5' -TTA TCA AAT GGA AGA GCT CAA CC- 3'	+1285
TbH-Del-Ex1	5' -CCA AGC TAA CGG GAC AAA AGT C- 3'	+5
TbH Del R3	5' -TAC GTA TAA ATC AAC GGC AGC TGC- 3'	+9147
P rosy 2	5' -CTT GCC GAC GGG ACC ACC TTA TGT TAT T- 3'	+8280 (3' Inverted Repeat, P-Element)
TbH-R1 Henrike	5' -TGA ACG ATA TGA TGG CGA CG- 3'	+27.451
TbH-F1 Henrike	5' -CTT GCA GAA TGC TTT CAA CG- 3'	+26.816
TbH prom 2F	5' -TGG CAC ACA CTT ACG GGT TA- 3'	-877
TbH-2,5-B	5' -TAG TTG TGA ACG CCA CTT GAT T- 3'	+5794
TbH-F1	5' -GCT GTG CGA CCA ATT TTA ACG- 3'	-5750
TbH-B1 weit	5' -CCA AGA TGC TAA CGG TAA TGG- 3'	+360
TbetaH-Prom R	5' -GGT GGT GAT GGA GTC GCC- 3'	+3718
TbH Prom Fklein	5' -ATC AAA CGC CAC CCA TTA CC- 3'	+3120

Vektoren	Größe	Firma
p221-4 GAL4 Vektor	12 kb	E. Knust
pBlueskript II KS (+/-)	3.0 kb	Stratagene
TopoII-Vektor	4.0 kb	Invitrogen

Nukleotide	Firma
ATP, dCTP, dGTP, dTTP	PEQLAB

2.1.4 Puffer und Lösungen

Puffer für Plasmid- Midi- und Maxipräparationen des QIAgenprotokolls wurden nach Angaben des Herstellers verwendet Die Zusammensetzung der weiteren verwendeten Puffern und Lösungen wurde Sambrook et. al., 1989 entnommen oder entspricht den Angaben in den jeweiligen Reaktionskit-Protokollen bzw. den angegebenen Referenzen. Lösungen, die dort nicht angegeben sind oder zur Optimierung verändert wurden, sind unten angegeben:

2.1.4.1 Puffer für Plasmidminipräparationen

Puffer	Chemikalien
Puffer 1	25 mM Tris/HCl pH 8.0 10 mM EDTA → steril filtrieren
Alkalischer Lyse- Puffer	0,2 N NaOH 1 % SDS → vor Gebrauch immer frisch ansetzen
Acetatlösung	5 M Kac mit 5M Eisessig auf pH 4.8 einstellen

2.1.4.2 Puffer und Lösungen für ELISA

Lösung	Chemikalien
Homogenisierungspuffer (1xPBS +1mM EDTA +1mM EGDA)	130 mM NaCl 0,35 mM Na ₂ HPO ₄ 0,74 mM KH ₂ PO ₄ 4,7 mM KCL 1,8 mM MgCl pH 7,4 +1mM EDTA +1mM EGTA
Blocklösung	1xPBS + 1% BSA
Detektionspuffer	100mM Tris-HCl 1mM MgCl ₂ pH 9,5

2.1.4.3 Puffer und Lösungen für Antikörperfärbungen

Lösung	Chemikalien
<i>Drosophila</i> Ringer	46 mM NaCl 182 mM KCl 3 mM CaCl ₂ 10 mM Tris HCl pH 7,2
1xPBS	130 mM NaCl 0,35 mM Na ₂ HPO ₄ 0,74 mM KH ₂ PO ₄ 4,7 mM KCl 1,8 mM MgCl pH 7,4
PBT	0,3 % Triton X-100 in PBS
PAT	PBS plus : 1g/100 ml Rinder-Albumin 0,5 % Triton X 100
Fixierlösung	2-4 % Formaldehyd in PBS
Blocklösung	3 % Normal Goat Serum/Normal Horse Serum in PBT
Antikörper-Inkubationslösung	Antikörper verdünnt in PAT

2.1.4.4 Spezielle Puffer und Lösungen für Oktopamin-Antikörperfärbung

Puffer/Lösung	Chemikalien
Fixierlösung Oktopamin	1,07g Cacodylate 0,5g Natrium-meta-bisulfit 50 ml dd H ₂ O → Ansatz + Glutaraldehyd pH 7,5
TrisHCl + SMB Oktopamin	50mM Tris (50ml 1M Tris) 4,5g NaCl 4,5g Natrium-meta-bisulfit 950 ml H ₂ O pH 7,4 → 250µl TritonX100 in 50ml TrisHCl + SMB
TrisHCl Oktopamin	50mM Tris (50ml 1M Tris) 9g NaCl 950ml H ₂ O pH 7,4 → 250µl TritonX100 in 50ml TrisHCl

2.1.4.5 Sonstige Puffer und Lösungen

Puffer/Lösung	Chemikalien
TE	100 mM Tris/HCl pH 8,0 10 mM EDTA pH 8,0 ad 1 l dH ₂ O, einstellen auf pH 8,0
TBE (10x)	500 mM Tris/HCl pH 8,0 500 mM Borsäure 25 mM EDTA pH 8,0
DNA/RNA- Beladungs- Puffer (5x)	15 % Ficoll 5 % SDS 0,1 % Bromphenolblau 0,1 % Xylencyanol
Homogenisierungspuffer	0,1 M Tris/HCl pH 8,0 0,1 M EDTA 1 % SDS
Injektionspuffer	5 mM KCl 0,1 mM Na- Phosphat → pH 6,8 einstellen

2.1.5 Stammlösungen

Lösung	Konzentration
Ampicillin	80 mg/ml
Kanamycin	40 mg/ml
Ethidiumbromid	1mg/ml
RNase A	10 mg/ml
	→ alle Chemikalien in H ₂ O gelöst

2.1.6 Chemikalien und Enzyme

Alle Chemikalien wurden von Sigma, Roth, Hartenstein, Merck, Pharmacia, Gibco BRL, Applichem, BD Biosciences, ICN Biomedicals, Invitrogen und Boehringer bezogen. Weiterhin wurden alle Enzyme von den Herstellern MBI, Gibco BRL Roche, Roth, Sigma, Stratagene, New England BioLabs, PEQLAB und Amersham Biosciences benutzt und nach Angaben der Hersteller mit den entsprechenden Puffern verwendet.

2.1.7 Antikörper

Antikörper	Firma	Verdünnung
MAK Oktopamin	Agricola (Jena Bioscience)	1/1000
α -GFP (rabbit polyklonal)	Molecular Probes	1/1000
MAK nc82 (mouse)	Hofbauer; 1991	1/10
Goat α -rabbit Alexa 488	Molecular Probes	1/200
Goat α -mouse Alexa 488	Molecular Probes	1/200
Goat α -mouse Cy3	Molecular Probes	1/250
MAK synapsin (3C11 mouse)	Hofbauer; 1991	1/10
α -GFP (mouse polyklonal)	Molecular Probes	1/200
Goat α -rabbit Cy3	Molecular Probes	1/250
α -T β H (rabbit polyclonal)	Cibic	1/500

2.1.8 DNA Größenmarker

Marker	Firma
1 kb Leiter	NEB
2-Log DNA Ladder (0,1-10,0 kb)	NEB

2.1.9 Reaktionskits

Kit	Firma
QIAprep Mini/Midi/Maxiprep Kit	QIAGEN
QIAquick Gelextraction Kit	QIAGEN
Quick Prep mRNA Purification Kit	Pharmacia
VECTASTAIN ABC-Kit	Vector Laboratories
RNeasy	QIAGEN
VectaShield	LINARIS

2.1.10 Programme

Zur Zusammenstellung dieser Arbeit wurden folgende Programme benutzt:

Microsoft® Excel

Microsoft® Word 2002

Adobe Photoshop 7.0

CorelDRAW X3

Software und Datenbank des NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)

Software und Datenbank des NEBcutter V2.0

(<http://tools.neb.com/NEBcutter2/index.php>)

Microsoft® PowerPoint 2000

AMIRA

2.2 Angewendete Methoden

2.2.1 Bakterienkulturen

Die Vorgehensweise bei der Arbeit mit Bakterien (*E. coli*) sowie die Zusammensetzung der Medien und Antibiotika-Stocklösungen wurden Sambrook et. al., 1989 entnommen.

2.2.2 Molekularbiologische Methoden

Allgemeine molekularbiologische Methoden (DNA-Verdau, DNA-Fällung, DNA-Gelelektrophorese, Ligation, PCR usw.) wurden aus Sambrook et. al., 1989 übernommen. Bei Verwendung von Enzymen und Reaktionskits wurden die Angaben der jeweiligen Protokolle befolgt.

2.2.3 DNA-Präparative Methoden

Alkalische Plasmid-DNA Minipräparation aus *E. coli* wurde nach der Methode von Birnboim und Doly, 1979 durchgeführt. Plasmid-DNA Großpräparationen erfolgten nach dem Protokoll für QIAGEN Plasmid Midi bzw. QIAGEN Plasmid Maxi Kits.

Bei der Gewinnung der DNA-Fragmente aus Agarose Gelen wurde das Protokoll für den QIAquick Gelextraction Kit von QIAGEN befolgt.

Für die Aufreinigung von PCR-Produkten verwendete man das Protokoll für den QIAquick PCR Purification Kit von QIAGEN.

Genomische DNA aus *Drosophila melanogaster* wurde mit Hilfe der Kaliumacetat-Methode wie folgt isoliert:

- 50 gefrorene Fliegen werden in 500µl eiskaltem Homogenisierungspuffer homogenisiert
- anschließend erfolgt 30 min Inkubation bei 68°C
- danach Zugabe von 75µl 8M KAc, invertieren und für 30 min auf Eis stellen
- 30 min Zentrifugation bei 4°C
- Überstand in neues Eppendorf-Gefäß, Zugabe von 1ml 100%igen EtOH und Fällung der DNA für 15 min bei -80°C
- 30 min zentrifugieren und Überstand verwerfen
- Pellet mit 500µl 70%igen EtOH versetzen und 10 min zentrifugieren
- Überstand entfernen und anschließend Pellet 10 min trocknen bei RT
- durch Zugabe von 100µl ddH₂O/TE Pellet auf Schüttler resuspendieren

2.2.4 Sequenzierung

Die Sequenzierung erfolgte nach der modifizierten Didesoxynukleotid- Strangabbruchmethode (Sanger, 1977). Zur Durchführung der Sequenzierung wurde die zu überprüfende DNA mit einem dazugehörigen Primer zu MWG versandt. Nach wenigen Tagen bekam man die so ermittelte Sequenz im Internet zur Verfügung gestellt.

2.2.5 Klonierungsstrategie der verschiedenen *TβH*-GAL4-Linien

Für die Klonierung von *TβH*-GAL4 Konstrukten, wurden ein 650 bp; 1.3 kb; 4.6 kb; 6.2 kb; und ein 6.6 kb langes DNA-Fragment mittels PCR aus dem Wildtyp *Drosophila* Genom von *w¹¹¹⁸* amplifiziert (Abbildung 6).

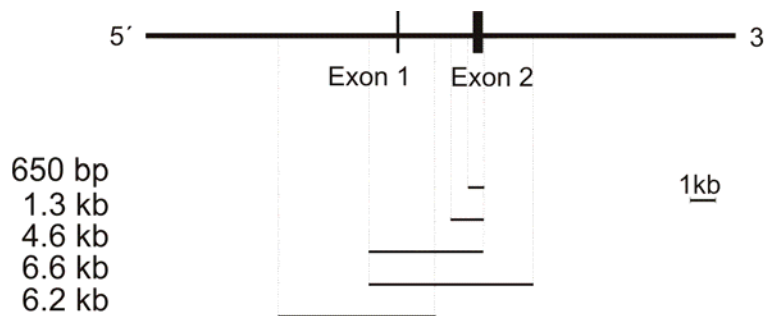


Abbildung 6: Schematische Darstellung der Promoterregion des *TβH* Gens.

Es werden die verschiedenen verwendeten Fragmente gezeigt, die für die Klonierung der GAL4-Konstrukte benötigt werden. Links neben den Fragmenten ist jeweils die Größe der amplifizierten Sequenz angegeben.

Für die Amplifikation wurden folgende Primer verwendet (siehe 1.3 DNA-Material)

- TbetaH-Prom R und TbH Prom Fklein für das 650 bp große Fragment
- TbH-Prom F und TbH-Prom R für das 1.3 kb große Fragment
- TbH-SacI-sense; TbH-SacI-anti; TbH prom 2F und TbH prom 2B für das 4.6 kb große Fragment
- TbH prom 2F und TbH-2,5-B für das 6.6 kb Fragment
- TbH-F1 und TbH-B1 weit für das 6.2 kb Fragment

Die PCR-Produkte konnten direkt über einzelne Adenin-Überhänge, welche die DNA-Polymerase an das Produkt heftet, mittels Topoisomerase in den TOPO II-Vektor ligiert werden (Abbildung 7).

Das 1.3 kb Fragment der Promoterregion des *TβH* Gens wurde mit dem Restriktionsenzym EcoRI aus der MCS (multiple cloning site) des TOPO-Vektors wieder herausgeschnitten, das 650 bp, das 4.6 kb und das 6.6 kb Fragment mit den Enzymen BamHI und NotI, und das 6.2 kb Fragment mit den Enzymen KpnI und XbaI. Diese Fragmente mit cohäsiven Enden konnten anschließend in die MCS des, mit den jeweiligen Restriktionsenzymen verdauten, GAL4-Vektors p221-4 ligiert werden. Durch Keimbahntransformation wurden die Konstrukte in das Genom von *Drosophila melanogaster* inseriert.

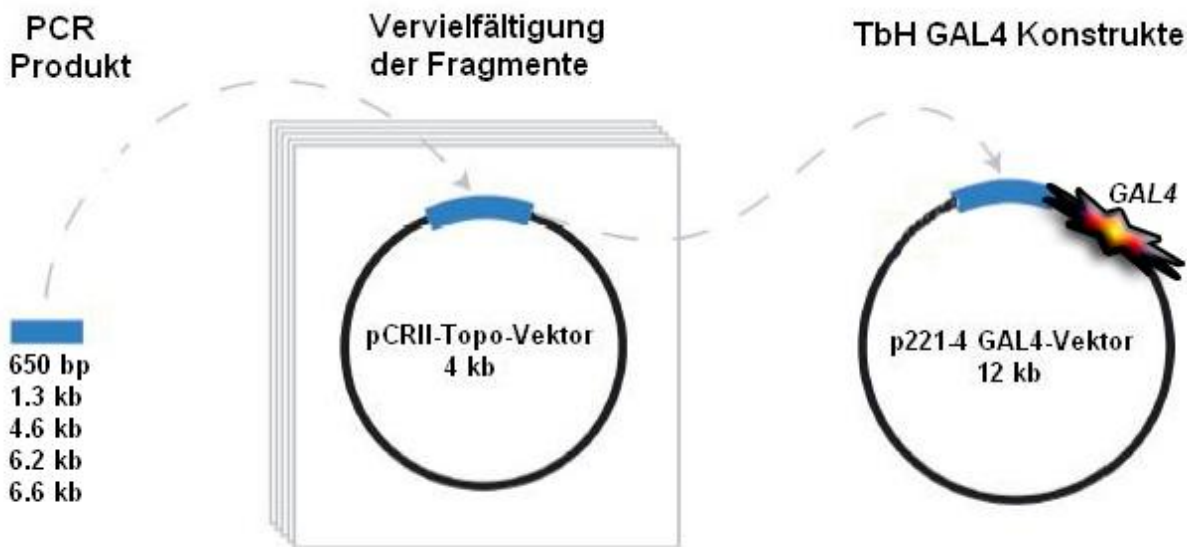


Abbildung 7: Schematischer Überblick der Klonierung von *TβH*-GAL4 Linien.

Die fünf mittels PCR amplifizierte *TβH* Fragmente wurden direkt in den TOPO II-Vektor kloniert, um sie mit definierten Enzymen wieder herauszuschneiden und in einen anderen Vektor klonieren zu können (Bild modifiziert nach Ritze, Doktorarbeit 2008).

2.2.6 Injektion von DNA-Vektorkonstrukten in die Keimbahn von *Drosophila melanogaster*

Die Keimbahntransformation von *Drosophila melanogaster* wurde, leicht abgewandelt, nach dem Protokoll durchgeführt, das erstmals von Twardzik (1993) beschrieben wurde. Dies ist die Standardtechnik um fremde, klonierte Plasmid-DNA in die Keimbahn der Fliegen zu injizieren. Dazu verwendet man Fliegen, die eine Mutation im *white*⁺-Gen tragen und darum weiße Augen besitzen. Die Plasmide tragen das *white*⁺ Gen als Marker. Als Bestandteil des Helferplasmids wird ein für die Transposition benötigtes Enzym, die Transposase, mitinjiziert. Wenn ein Insertionsereignis auftritt und die injizierte DNA zu einem stabilen Bestandteil der Keimbahn wird, kann dies festgestellt werden, indem man die behandelten Fliegen gegen *white*¹¹⁸-Fliegen zurückkreuzt. Die F1-Generation, die nun das Konstrukt trägt, besitzt orange bis rote Augen, was wiederum vom Insertionsort und den damit umgebenden regulatorischen Elementen abhängt. Der Injektionspuffer wurde wie im Materialteil beschrieben, hergestellt. Um Kristalle zu entfernen, die eventuell später die Kapillaren verstopfen, wurde die Lösung 10 min bei maximaler

Geschwindigkeit zentrifugiert. 25 µg Transformationsvektor plus 10 µg Helferplasmid wurden mit ddH₂O zu einem Endvolumen von 300µl angesetzt. Nach Zugabe von 30 µl 3 M NaOAc und 750 µl 100 % EtOH wurde die DNA über Nacht bei -20°C gefällt. Die Lösung musste anschließend am nächsp70-Ten Tag bei 12.000rpm 30 min zentrifugiert werden. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 70%-igem EtOH gewaschen, daraufhin getrocknet und in 50 µl Injektionspuffer gelöst. Zur Resuspension des Pellets schüttelte dieses noch 20 min auf einem Schüttler. Das nun gelöste Pellet musste anschließend noch einmal 10 min abzentrifugiert werden, um noch letzte Verschmutzungen aus der Lösung zu entfernen. Für die Eiablage der Fliegen wurden Apfelsaftplatten gegossen, um auf diese die *white*¹¹⁸ Fliegen zum Abeiern zu setzen. Alle 30 min sammelte man die Embryonen ab, dechorionisierte sie 50 sec in 7 %-iger Natriumhypochloridlösung und wusch sie kurz mit Wasser. Anschließend wurden die Eier mit dem posterioren Ende nach vorne auf einen Objektträger aufgereiht, mit N- Heptankleber fixiert und 30 min auf Silikagel getrocknet. Nachdem ein leichter Ölfilm (Votalef 10S) darüber gelegt wurde, wurde die DNA mit einer ausgezogenen Glaskapillare injiziert, deren Spitze zuvor mit einem Skalpel unter dem Mikroskop auf die optimale Größe gebracht wurde. Die Embryonen schlüpften nach 2 Tagen bei 18°C und wurden dann in mittelgroße Futtergläser transferiert, die sich dann bei 25°C weiter entwickelten. Um Transformanten unter den geschlüpften Fliegen zu erkennen, kreuzte man diese gegen den *white*¹¹⁸ Stamm zurück, da man so Transformanten von Nicht-Transformanten an einer gelben bis roten Augenfarbe unterscheiden konnte. Nach dem Screening nach rotäugigen Fliegen, wurden alle Fliegen mit roten Augen gegen einen Balancerstamm gekreuzt, um das Chromosom der P- Element Insertion zu ermitteln.

2.2.7 Methoden auf RNA-Ebene

2.2.7.1 Isolierung von RNA aus *Drosophila melanogaster*

Die Isolierung der RNA Fliegen erfolgte nach dem RNeasy Kit Protokoll nach Angaben des Herstellers.

2.2.7.2 cDNA- Synthese

Die Reverse Transkriptase wurde bei der Amplifikation von Nukleotidsequenzen mit mRNA als Matrize benötigt. Nach der RNA- Isolierung wurde die mRNA in cDNA umgeschrieben. Für den Ansatz mußten folgende Substanzen zusammen pipettiert werden:

Oligo dT Primer (0,5 µg/µl)	2 µl
dNTPs (10 mM)	2 µl
RNA (400 ng/µl)	22 µl
--> 5 min bei 65°C	

5x Puffer	8 µl
DTT (0,1 M)	4 µl
--> 2 min bei 42°C	

Superskript Polymerase (200 U/µl)	1 µl
--> 1 h bei 42°C	

RNase	1 µl
--> 30 min bei 37°C	
--> cDNA bei -20°C wegfrieren	

2.2.8 ELISA (Enzyme-linked Immunosorbent Assay)

Der ELISA wurde nach folgendem Protokoll durchgeführt:

- Zwei Fliegenköpfe in PBS (+1mM EDTA, 1mM EGTA) homogenisieren und auf Elisaplatte pipettieren.
- Verdünnungsreihe (5 Stufen) mit PBS auf 200µl auffüllen; 2h bei RT zum binden auf Schüttler.
- 3x mit PBS spülen, dann 2h mit 1% BSA in PBS blocken bei RT.
- 3x mit PBS spülen, dann 1.AK (TβH Antiserum: 1/1000 und Sap47: 1/50 in Blocklösung

- über Nacht bei 4°C.
- 4x mit PBS spülen.
- 2. AK in Blocklösung für 2h bei RT (Biotin gekoppelt).
- 3x mit PBS spülen.
- Avidin-Phosphatase in Blocklösung (1:10000) bei RT für 2h.
- 3x spülen mit PBS.
- 1x10 min Detektionspuffer (100mM Tris-HCl, 1mM MgCl₂; pH= 9,5).
- 50µl Färbelösung zugeben, warten bis es gelblich wird, dann messen.

2.2.9 Immunohistochemie

2.2.9.1 Standard-Färbungen nach dem VIB Protokoll

Die Antikörperfärbung an adulten Gehirnen von *Drosophila melanogaster* wurde nach dem Virtual Insect Brain (VIB) Protokoll durchgeführt: (<http://www.neurofly.de>)

1.Tag

- Präparation der adulten Gehirne in Ringer
- Fixierung für 1 h bei RT in 2% Formaldehyd
- waschen der Gehirne 3 mal 20 min in PAT bei RT
- Inkubation in 3% NGS für 1 h bei RT
- Inkubation der 1. Antikörper über Nacht bei 4°C

2.Tag

- waschen der Gehirne 3 mal 20 min in PAT bei RT
- Inkubation des 2. Antikörpers in PAT über Nacht
- ab diesem Schritt Gehirne im Dunkeln behandeln

3.Tag

- waschen der Gehirne 3 mal 20 min in PAT bei RT
- Inkubation des zweiten 2. Antikörpers über Nacht bei 4°C

4.Tag

- waschen der Gehirne 3 mal 20 min in PAT bei RT
- einbetten der Gehirne in Vectashield (Vector Labs)

Die in Vectashield eingebetteten Gehirne wurden daraufhin mit dem Konfokalmikroskop Leica SP1 gescannt. Dazu verwendete man ein 20 x Wasser-Objektiv. Die Konfokalen „Bilderstapel“ konnten anschließend mit der Software AMIRA bearbeitet und ausgewertet werden.

2.2.9.2

Oktopamin-Antikörperfärbung

- Fliegen vor der Präparation mindestens 1,5 h auf Eis herunterkühlen
- Rüssel herauspräparieren und 5 min vorfixieren
- Gehirn aus der Kopfkapsel heraus präparieren
- 2h bei RT fixieren (Fixierlösung Oktopamin)
- 4 mal 20 min mit TrisHCl + SMB bei RT waschen
- 30 min in NaBH₄ 0,3% bei RT (0,03g in 10ml TrisHCl + SMB)
- 4 mal 10 min TrisHCl + SMB bei RT
- 2 mal 30 min TrisHCl + SMB + TritonX100 bei RT
- Blocken mit 10% Normal Goat 1,5h bei RT
- Inkubation 1. Antikörper zwei Nächte bei 4°C in
Normal Goat 10%
TrisHCl + SMB + TritonX100
- 5 mal 30 min mit TrisHCl + TritonX100 waschen
- eine Nacht mit 2. Antikörper inkubieren in
TrisHCl + TritonX100
- 5 mal 10 min TrisHCl + TritonX100
- 2 mal 20 min TrisHCl
- einbetten in VectaShield

2.3 Verhaltensversuche

Für alle hier beschriebenen Verhaltensversuche wurden die Fliegen auf Standard Maismehl- Futter (Guo et al.1996) im 14/10 Stunden Licht/Dunkel Zyklus bei 25°C und 60% relativer Luftfeuchtigkeit aufgezogen.

2.3.1 Inebriometer-Assay

Für jeden Inebriometer-Test verwendete man ungefähr 135 2-5 Tage alte männliche Fliegen und setzte sie in ein Glas mit frischem Futter ohne Hefe für 48 h bei 25°C bis zum Test. Während der Entwicklung und Aufzucht durften die Fliegen nicht mit Hefe oder anderen gärenden Substanzen, bzw. Alkohol in Kontakt kommen. Die Fliegen wurden anschließend in einem mit Ethanol-Dampf vorequilibrierten Inebriometer getestet (Abbildung 8)(MOORE et al. 1998). Verschiedene Ethanolkonzentrationen wurden durch Mischen von Ethanoldampf mit befeuchteter Luft erreicht, herbeigeführt mittels Diffusion von Luft durch 95%ige Ethanol-Lösung. Alle Experimente

wurden bei einer Ethanol-Dampf-Konzentration von 50/45 durchgeführt. Das entspricht einem relativen Durchfluss von 50 Einheiten Ethanoldampf und 45 Einheiten befeuchteter Luft und ergibt ungefähr eine Konzentration von 15 mM Ethanol. Nach der ersten Ethanol Exposition der Fliegen, mußten diese 3h ausnüchtern gelassen werden. Anschließend fand die zweite Begasung der Fliegen statt, wobei Wildtypfliegen Toleranz gegenüber Ethanol entwickeln. Die MET (Mean Elution Time) entspricht der Summe an Fliegen, die zu einer bestimmten Zeit (Minute) eluiert werden, multipliziert mit der Zeit der Elution, dividiert durch die totale Anzahl der Fliegen. Alle Experimente sind mehrfach durchgeführt worden (mind. 3 unabhängige Male).

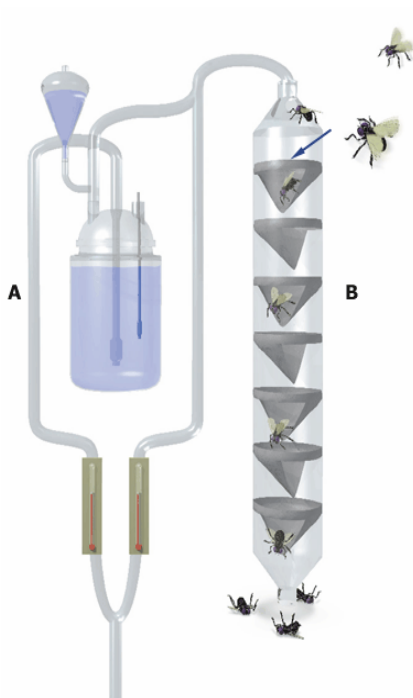


Abbildung 8: Schematische Darstellung des Inebriometers.

Fliegen werden oben in die 120 cm langen Glassäulen eingeführt, in denen ein EtOH/Luft- Gemisch von definierter Konzentration zirkuliert. Sobald die Fliegen betrunken werden, verlieren sie ihre posturale Kontrolle und fallen durch die Säulen nach unten über netzartige Filter, die innerhalb der Glassäule angebracht sind. Beim Eluieren durchqueren die Fliegen einen Laser- Strahl, womit die Anzahl an Fliegen zu einer bestimmten Zeit erfasst werden kann. Mit der so ermittelten Elutionszeit der Fliegen kann darauf folgend die MET berechnet werden (SCHOLZ *et al.* 2000)(Bild Heberlein).

2.3.2 Buridan Paradigma

Das Buridan 'sche Paradigma wurde erstmals 1980 als Objekt-Fixations-Test von Götz beschrieben (GOTZ 1980). Es bietet den Vorteil, eine hohe Laufaktivität hervorzurufen und Aufschluß über potentielle lokomotorische Defekte und Objektfixationsprobleme der Versuchstiere zu geben.

Die Testumgebung besteht aus einer leicht erhöhten kreisförmigen Laufplattform mit 8,5 cm Durchmesser. Umgeben wird diese Lauffläche von einem 4,5 cm breiten Wassergraben, der

gewährleistet, dass die Fliege mit gestutzten Flügeln die Lauffläche nicht verlassen kann. Somit sind ebenfalls die beiden sich gegenüberstehenden, vertikalen schwarzen Streifen für sie nicht erreichbar (Abbildung 9).

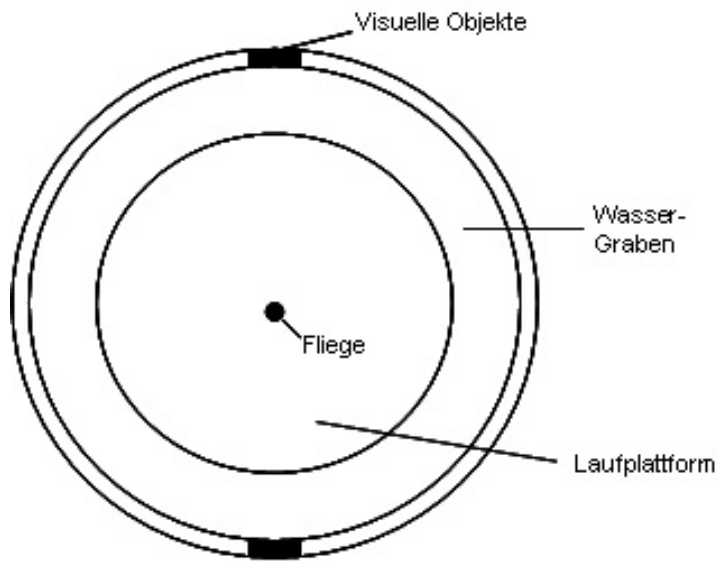


Abbildung 9: Schematische Darstellung einer Buridan Arena (GOTZ 1980).

Eine Fliege mit gestutzten Flügeln wird auf die Laufplattform gesetzt. Ihr Verhalten der Fixation bzw. Antifixation in Bezug zu den Landmarken wird mittels Videokamera aufgezeichnet und mit entsprechender Software ausgewertet.

Die beiden schwarzen Fixationsobjekte befinden sich in einer ansonsten reizarmen und homogen weiß illuminierten Umgebung. Für die Fliege haben die dunklen Streifen vom Mittelpunkt der Arenafläche aus gesehen eine räumliche Ausdehnung von horizontal 12° und vertikal 58° . Aus der Vogelperspektive wird mit Hilfe einer Kamera der Laufweg der Fliege über 15 min aufgezeichnet, indem mit einer Frequenz von 5 Hz die aktuellen Aufenthaltskoordinaten im Rechner gespeichert werden. Dies ergibt pro Aufnahme für jede Fliege 4500 Datenpunkte, die in die Auswertung der Größen Laufgeschwindigkeit, Laufweg und Laufaktivität eingehen.

Wildtypische Fliegen pendeln zielgerichtet zwischen den schwarzen Streifen hin und her. Dagegen weisen Fliegen mit struktureller Schädigung oder toxigenetischer Inaktivierung von Zentralkomplexbereichen häufig Auffälligkeiten in den betrachteten Parametern auf (STRAUSS and HEISENBERG 1993).

Erreichen die Fliegen beim Anlaufen einer Landmarke den Rand der Plattform, wird die Wahrscheinlichkeit der Umschaltung zwischen den antagonistischen Verhaltensoptionen Fixation

des Objekts“ und Antifixation des Objekts“ erhöht. Somit wird die Wahrscheinlichkeit erhöht, das fixierte Objekt zu verlassen und Richtung Mittelpunkt der Lauffläche umzukehren, um daraufhin die Landmarke der Gegenseite anzusteuern.

2.3.3 LED-Arena zur Untersuchung der Optomotorik

Die geschlossene Projektionsfläche bei dem LED-Panorama bilden 5760 Leuchtdioden (LEDs), wobei je 32 LEDs in 180 Spalten angeordnet sind. Die Höhe der zyklischen rotierenden Projektionsfläche ist 22,4 cm und hat einen Durchmesser von 40 cm. Im Innenraum zentriert befindet sich eine kreisförmige, mattierte Lauffläche aus Plexiglas, mit einem Durchmesser von 8,5 cm. Diese Fläche wird durch einen Wassergraben begrenzt. Von unten wird die ansonsten abgedunkelte Arena mit einer für Fliegen unsichtbaren roten Lichtquelle beleuchtet, damit die über der Laufplattform positionierte Kamera das Versuchstier verfolgen und die Bildinformation an einen Videomonitor weitergeben kann (STRAUSS et al. 1997).

Die Steuerung der LEDs erfolgt durch einen daran angeschlossenen Computer. Mit einem speziellen Programm können die zu generierenden Muster erstellt werden. Bei der in dieser Arbeit verwendeten Großfeldoptomotorik wurde ein rotierendes Muster mit vertikalen Hell/Dunkel-Streifen ausgewählt. Die Musterwellenlänge betrug 60° und die Streifen rotierten mit einer Frequenz von 12 Volldrehungen pro Minute.

Dabei wird die optomotorische Kompensation der Versuchstiere gemessen. Diese Größe beschreibt die Fähigkeit der Fliege, den durch das Streifenmuster erzeugten optischen Fluss über die Retina möglichst gering zu halten, indem sie sich mit dem generierten Muster mitdreht. Bei diesem Paradigma handelt es sich somit um einen Test für die Optomotorik, wobei die Fliege die Fähigkeit des Bewegungssehens, Kurvenlaufens, bzw. Rotation auf der Stelle besitzen muss, um Drehungen kompensieren zu können.

Jedes Experiment setzt sich aus zweimal 5 min Messzeit zusammen. Es wird jeweils alternierend mit einer Drehung des Musters in Richtung des Uhrzeigersinns (CW) bzw. gegen des

Uhrzeigersinns (CXW) begonnen und in der zweiten Sequenz die Drehrichtung entsprechend umgekehrt. Dadurch sollten mögliche Schwankungen der Kompensation wegen etwaig auftretenden Asymmetrien der Aktivität vorgebeugt werden.

Im Idealfall könnten im Verlauf der 10 minütigen Testphase 120 Umdrehungen kompensiert werden. Die tatsächlich erreichte optomotorische Kompensation (%) errechnet sich aus

$$\frac{(DrehungCW + DrehungCXW) * 100}{120}$$

2.4 Statistik

Nachdem die Daten nach Excel importiert wurden, konnten die Mittelwerte und Standardfehler der einzelnen Datensets kalkuliert werden. Der Grad der Signifikanz zwischen zwei Datensets wurde mit dem T-Test ermittelt. Das Signifikanzlevel wurde bei mindestens $p < 0.05$ festgesetzt. Bei der Errechnung einer Signifikanz, wird diese mit Sternchen markiert ($p < 0.05 = *$; $p < 0.01 = **$; $p < 0.001 = ***$).

3 Ergebnisse

Der Ergebnisteil ist in vier Bereiche unterteilt. Der erste Teil befasst sich mit der genomischen Organisation des *TβH* Gens in der *TβH^{M18}* Mutante und in wildtypischen Fliegen und den zugehörigen Transkripten und Proteinen. Zudem wird ein Überblick der *TβH* Promoter Fragmente gegeben, welche zur Herstellung von spezifischen *TβH*-GAL4 Treiberlinien verwendet wurden.

Im zweiten Teil der Arbeit werden verschiedene GAL4-Linien mit histologischen Methoden anatomisch analysiert. Hierbei wird die GFP-Expression in Zellen, getrieben durch die *TβH*-GAL4-Linien, auf Kolo-kalisation mit dem TβH-Protein bzw. dem Oktopamin-Expressionsmuster untersucht. Dies sollte Aufschluss über die spezifische regulatorische Rolle der verwendeten *TβH*-Fragmente geben.

Der dritte Teil umfasst Verhaltensstudien mit gentechnisch veränderten Organismen in Bezug auf Ethanol-sensitivität und Toleranz. In den Verhaltensstudien wurde der Einfluss der Expression von Effektortransgenen (*UAS-Tetanustoxin* (SWEENEY et al. 1995); *UAS-Kir2.1* (BAINES et al. 2001)), getrieben mittels der *TβH*-GAL4 Treiberlinien, auf ethanolinduziertes Verhalten untersucht.

Und letztendlich im vierten Teil der Arbeit wird in einem Exkurs in die Thematik der visuellen Laufsteuerung getestet, welchen Einfluss die Inhibierung zentralkomplex-innervierender Neurone auf das Laufverhalten zeigt. Dazu wurde die hergestellte 1.3*TβH*-GAL4 Treiberlinie verwendet.

3.1 Organisation des Tyramin-beta-Hydroxylase(*TβH*) Gens

Das *TβH* Gen (*CG1543*) ist in der Region 7D2 auf dem X-Chromosom lokalisiert. Es besteht aus acht Exons und sieben Introns, wobei sich die Sequenz ATG für den Translationsstart im Exon 2 befindet und die Sequenz TAG für das Translationsende im Exon 8 (Vergleich *CG1543*, <http://flybase.bio.indiana.edu/reports/FBgn0010329.html>). Das Exon 1 ist nichtkodierend, ebenso wie die ersten 117 bp des zweiten Exons. Der untranslatierte Bereich der 3'UTR von Exon 8 umfasst zudem 685 bp. Im zweiten ≈23 kb großen Intron des *TβH* Gens befindet sich ein

zusätzliches 1,7 kb großes Gen CG15333. Dieses Gen wird in antisense Richtung relativ zum *TβH* Gen transkribiert (Abbildung 10).

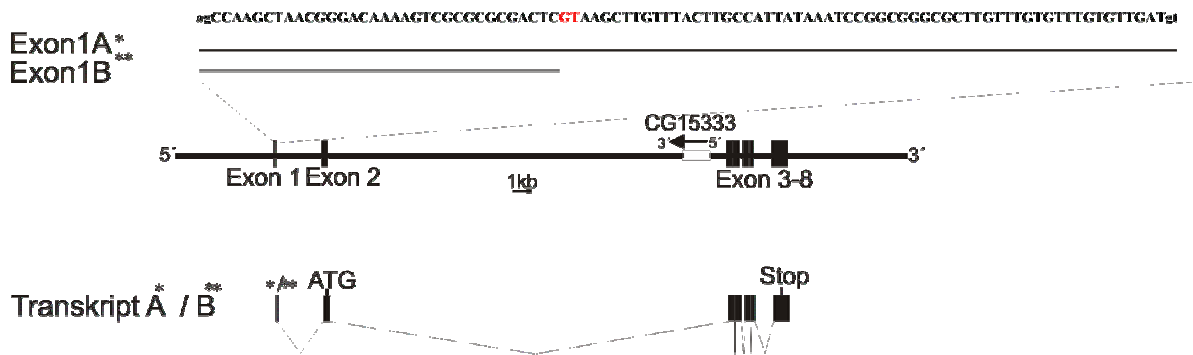


Abbildung 10: Schematische Darstellung der genomischen Organisation des *TβH* Gens.

Das *TβH* Gen besteht aus acht Exons und sieben Introns. Eine alternative Spleißstelle befindet sich an Basen-Position 36/37 des ersten Exons. Daraus resultieren zwei Transkripte des Gens mit unterschiedlichen Längen des ersten Exons. Transkript A* besitzt eine 97 bp lange Exon 1 Sequenz, Transkript B** hingegen eine 37 bp lange gespleißte Sequenz des ersten Exons. Der Translationsstart des *TβH* Gens befindet sich im Exon 2 und ist mit „ATG“ markiert, das Translationsende liegt in Exon 8 und ist mit „Stop“ markiert. Im zweiten Intron ist ein zusätzliches Gen CG15333 lokalisiert, welches in antisense Richtung relativ zum *TβH* Gen transkribiert wird.

Um festzustellen wie viele Transkripte für das *TβH* Gen vorhanden sind, wurde die *TβH*-cDNA Sequenz überprüft. Zur Analyse des *TβH*-Transkriptes wurde RT-PCR durchgeführt (Abbildung A 1 Anhang). Daraus ging hervor, dass alternatives Spleißen im ersten Exon stattfindet. Die beiden Exons unterscheiden sich in einer Sequenzlänge von 60 bp (Abbildung 10). Es existieren folglich zwei alternative Transkripte, die sich in der Größe ihrer ersten Exons unterscheiden. Das Transkript A* besitzt ein 97 bp großes erstes Exon (Abbildung 10), hingegen das Transkript B** ein 37 bp großes Exon 1 (Abbildung A 1 Anhang). Dieses Exon 1B** ist in seinen ersten 37 bp identisch zu Exon 1A*. Die weitere Sequenz ab Exon 2 bis Exon 5 beider Transkripte A* und B** ist identisch (Abbildung A 1 Anhang). Es kann jedoch keine Aussage über die Sequenz der Exons 6 bis 8 getroffen werden, da diese nicht analysiert wurde. Da das erste Exon ausschließlich aus nicht-kodierender Sequenz besteht, besitzen die unterschiedlichen untranslatierten Sequenzen beider Transkripte möglicherweise regulatorische Funktionen.

3.2 Deletionskartierung der Oktopamin-Nullmutante $T\beta H^{M18}$

Mittels P-Element Jump-out-Mutagenese wurde eine $T\beta H$ -Mutante mit dem Allel $T\beta H^{M18}$ hergestellt. Es ließ sich in dieser Mutante kein Oktopamin mittels HPLC nachweisen. (MONASTIRIOTI et al. 1996). Die $T\beta H^{M18}$ Mutanten sind u.a. weiblich steril (MONASTIRIOTI et al. 1996), entwickeln reduzierte Ethanoltoleranz (SCHOLZ et al. 2000) und weisen Defekte im Belohnungslernen (SCHWAERZEL et al. 2003) auf. Auf molekulargenetischer Ebene war dieses Allel noch nicht charakterisiert, deshalb wurde das $T\beta H$ Gen der Mutante $T\beta H^{M18}$ mit Hilfe von PCR und RT-PCR näher untersucht (Abbildung A 1 Anhang; Abbildung A 2 Anhang).



Abbildung 11: Kartierung der Deletion im $T\beta H$ Gen, verursacht durch P-Element Jump-Out-Mutagenese

Schematische Darstellung des $T\beta H$ Gens der $T\beta H^{M18}$ Mutante. Durch Exzision des P-Elements MF372 (MONASTIRIOTI et al. 1996) wurde ein Teil des ersten Introns, das zweite Exon und 4,3 kb des zweiten Introns deletiert. Das Exon 1 sowie die 3' Sequenz des P-Elements MF372 sind durch die Exzision des P-Elements nicht betroffen.

Analysen der sequenzierten $T\beta H$ -cDNA und die Kartierung mittels PCR haben ergeben, dass bei der P-Element Jump-out-Mutagenese das gesamte zweite Exon deletiert wurde, sowie 4,3 kb des zweiten Introns (Abbildung A 1 Anhang; Abbildung A 2 Anhang). Ebenso wurden Bereiche des ersten Introns deletiert, jedoch nicht die Sequenz des ersten Exons (Abbildung 11). Die genaue Begrenzung des 5' Endes der Deletion konnte nicht ermittelt werden. Der 3' Bruchpunkt der Deletion befindet sich innerhalb der P-Element Sequenz MF372. Das Transposon MF372 inserierte an Position 8485 nach dem ersten Exon in das $T\beta H$ Gen in der ursprünglichen P-Element Insertionslinie $T\beta H^{MF372}$.

3.3 Proteinstruktur und funktionelle Domänen des TβH-Proteins

Die *TβH*-cDNA hat eine Länge von 2836 bp. Nach der Translation der *TβH*-cDNA resultiert daraus eine Aminosäuresequenz von 670 Aminosäuren (AS). Der in die Aminosäuresequenz translatierte Bereich des dritten Exons kodiert für eine DOMON-Domäne (Abbildung 12 A). Die dafür kodierende Aminosäuresequenz umfasst etwa 120 AS im Bereich zwischen AS 170 bis 290. Die Aminosäuresequenzen, die aus den Exons vier bis sieben translatiert werden, enthalten sowohl spezifische Sequenzen für den N-Terminus, als auch für den C-Terminus einer Monooxygenase. Es kodieren etwa 310 Aminosäuren für die Monooxygenase Domänen im Bereich der AS 320 bis 630 (Abbildung 12 A).

In Abbildung 12 B ist ein Vergleich des TβH-Proteins mit Proteinen die ähnliche Funktionen wie TβH besitzen, dargestellt. Die Homologien von TβH zu DβH beziehen sich unter anderem auf die DOMON-Domäne (PONTING 2001). Etwa 39% Homologie sind zwischen TβH von *Drosophila* und der DβH der Säuger zu verzeichnen (MONASTIRIOTI *et al.* 1996). Beispielsweise die Dopamin-beta-Hydroxylase (DβH) des *Homo sapiens*, sowie die Monooxygenase von *Mus musculus* weisen große Homologien zur TβH auf. Demzufolge wäre es möglich, dass die TβH ebenfalls die Funktion besitzt, Noradrenalin aus Dopamin zu synthetisieren, wie die DβH im Menschen. Das intakte TβH-Protein weist ein Gewicht von 76 kDa auf. Durch die P-Element Jump-Out-Mutagenese entstand eine Deletion des zweiten Exons (Abbildung 11). Ein Teil dieses Bereiches gehört zu der kodierenden translatierten Sequenz, in dem sich das erste ATG Translationsstartkodon befindet (Abbildung 10). Somit könnte ein mutiertes TβH-Protein ein Molekulargewicht von nur etwa 68kDa besitzen, wenn das zweite ATG in Position 72 als Translationsstart dienen würde (Abbildung 12 C+D rot). Wie durch RT-PCR festgestellt wurde, gibt es in der *TβH^{M18}* Mutante ein verkürztes Transkript (Abbildung A 1 Anhang). Aufgrund dessen wäre es möglich, dass ein verkürztes TβH-Protein in der Mutante exprimiert wird. Dieses Protein wäre wahrscheinlich nicht funktionell, da 89 kodierende AS deletiert wurden.

3.4 Vergleich der TβH-Proteinkonzentration in Köpfen von $w^{1118}/TβH^{M18}$ Fliegen zu w^{1118} Fliegen

Da das $TβH^{M18}$ Allel im w^{1118} Hintergrund erzeugt wurde, diente der w^{1118} Stamm als Kontrolle zur Proteinbestimmung. Es wurde mit Hilfe von Western Blot Untersuchungen nachgewiesen, dass die $w^{1118}/TβH^{M18}$ Mutanten kein TβH-Protein exprimieren. (MONASTIRIOTI et al. 1996). Die RT-PCR Daten legen jedoch nahe, dass das $TβH$ -Transkript noch hergestellt wird (Abbildung A 1 Anhang). Möglicherweise kann demzufolge ebenfalls noch Protein hergestellt werden. Mittels eigens hergestelltem TβH-Antiserum wurden ELISAs durchgeführt, um die Konzentrationen an noch vorhandenem TβH-Protein zu detektieren (CIBIC 2007). Da die Spezifität des in unserem Labor hergestellten TβH-Antiserums zur Tyramin-beta-Hydroxylase noch nicht gezeigt werden konnte, werden bei Erwähnung dessen und dessen Antigens Anführungsstriche verwendet („TβH“-Antiserum/ Protein). Für die Bestimmung der „TβH“-Proteinmengen wurden Kopfextrakte von Männchen hergestellt.

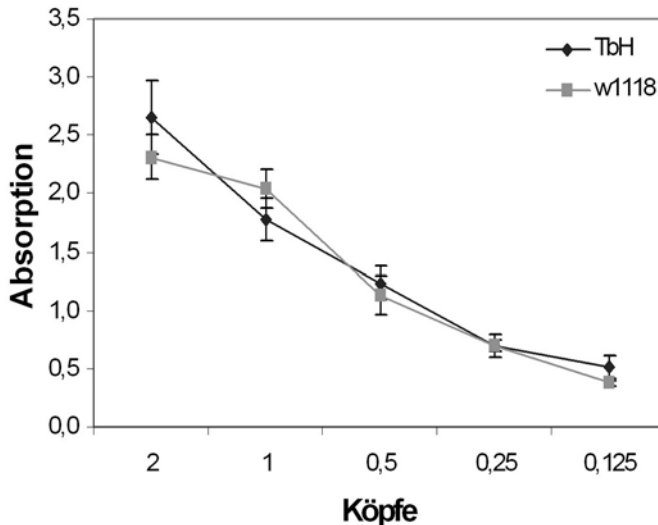


Abbildung 13: Vergleich der „TβH“-Proteinmenge in Fliegenköpfen von w^{1118} Fliegen und $w^{1118}/TβH^{M18}$ Fliegen mittels „TβH“-Antiserum.

Die „TβH“-Mengen aus Köpfen von männlichen Fliegen wurden mittels ELISA bestimmt. Die „TβH“-Konzentrationen in w^{1118} Fliegenköpfen (2 Köpfe: $2,3 \pm 0,2$; 1/8 Kopf: $0,4 \pm 0,02$) unterscheiden sich nicht signifikant von den „TβH“-Konzentrationen in $TβH^{M18}$ Fliegenköpfen (2 Köpfe: $2,7 \pm 0,3$; 1/8 Kopf: $0,5 \pm 0,1$). Als Kontrolle werden die Proteinmengen von Sap47 mittels eines spezifischen Antikörpers bestimmt. Alle „TβH“-Werte für die verschiedenen Konzentrationen wurden anschließend durch

den zugehörigen Sap47-Proteinwert der jeweiligen Konzentration geteilt. Es wurden drei unabhängige Experimente mit jeweils drei unabhängigen Fliegengruppen durchgeführt (n=9). Ebenfalls als Kontrolle wurde das Experiment ohne ersten Antikörper durchgeführt, wobei sehr niedrige Absorptions-Werte gemessen wurden.

Die gemessenen Werte des „TβH“-Proteins unterscheiden sich nicht zwischen w^{1118} Fliegen und $w^{1118}/TβH^{M18}$ Mutanten. Die Werte setzten sich entsprechend abnehmend entlang der

Verdünnungsreihe fort. Dies deutet darauf hin, dass das verwendete „TβH“-Antikörperserum entweder nicht die wildtypische Form an TβH-Protein erkennt, oder dass in der Mutante noch TβH-Protein hergestellt wird.

3.5 Herstellung verschiedener *TβH* Promoter-GAL4 Treiberlinien

Es sollten Werkzeuge hergestellt werden, die es ermöglichen unterschiedliche oktopaminerge Neurone mit Hilfe des GAL4/*UAS* Systems zu manipulieren. Dazu wurden verschiedene Promoterfragmente des *TβH* Gens zur Herstellung spezifischer GAL4-Linien verwendet. In der Abbildung 14 sind die Promoterelemente bezeichnet, die zur Herstellung folgender GAL4-Linien verwendet wurden. Da die einzelnen verwendeten Fragmente jeweils Sequenzen der anderen verwendeten Fragmente enthalten (Abbildung 14), könnten eventuell einzelne Regulatoren des *TβH* Gens identifiziert werden.

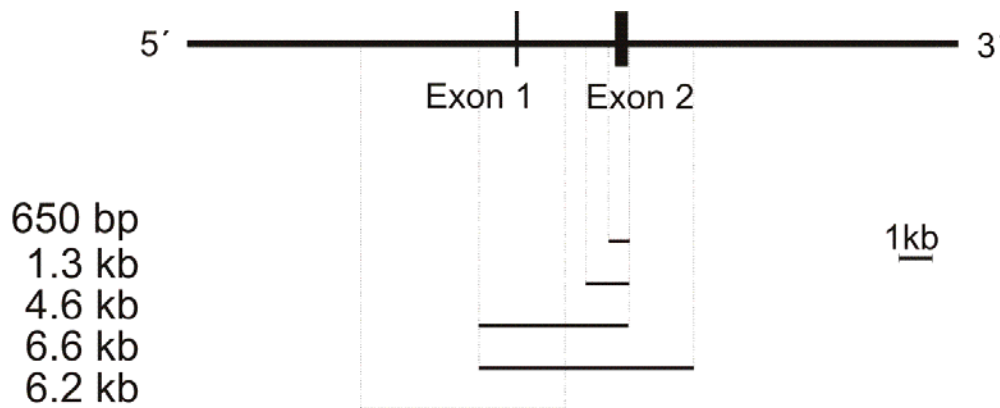


Abbildung 14: Darstellung der verwendeten *TβH*-Fragmente für die Herstellung von transgenen *TβH*-Promoter-GAL4 Linien

Es sind ~10 kb der 5' upstream Region des *TβH* Gens und 14 kb des *TβH* Gens gezeigt. Die verwendeten Sequenzen für die *TβH* Promoter-GAL4-Linien enthalten u.a. die Bereiche für Exon 1 und 2, Intron 1 und 1,7 kb von Intron 2 des *TβH* Gens. Zur Herstellung von transgenen Fliegenlinien wurden fünf unterschiedlich große DNA-Fragmente aus dem Bereich des Translationsstarts des *TβH* Gens verwendet. Die Bezeichnung/Größe ist unterhalb der schematischen *TβH*-Promoterregion gezeigt.

Das kleinste 650 bp lange Fragment, welches das gesamte Exon 2 mit Translationsstart beinhaltet, enthält die geringste regulatorische Information des *TβH* Gens (Abbildung 14). Die ansteigenden Größen, der zur Klonierung verwendeten weiteren DNA-Fragmente enthalten wahrscheinlich

eine größere Anzahl an regulatorischen Elementen (SOSINSKY *et al.* 2007). Demzufolge sollte die GAL4-Expression von Promoterlinien mit größeren verwendeten *TβH*-Fragmenten mehr Zellen des TβH-Expressionsmusters widerspiegeln.

3.6 Charakterisierung von putativ TβH-positiven und eventuell oktopaminergen *TβH*-Promoter-GAL4 Treiberlinien

Die fünf verschiedenen *TβH*-GAL4-Linien (die hergestellten Linien sind in Material und Methoden 2.1.2 aufgeführt) wurden jeweils mit der Effektor-Linie *UAS-mCD8-GFP* (LEE and LUO 1999) gekreuzt und anschließend die *Drosophila* Männchen der Nachfolgeneration zur anatomischen Charakterisierung verwendet. Weiterhin werden zusätzliche putative oktopaminerge GAL4-Linien, wie die NP938-GAL4 (Datenbank des NP-Konsortiums) und die *Tdc2*-GAL4-Linie (COLE *et al.* 2005) analysiert. Die Auswertung aller Expressions- und Kolokalisationsstudien sind an Whole-mount Gehirnen durchgeführt worden. Bei den Kolokalisationsanalysen werden dabei die Expressionsmuster der verwendeten GAL4-Linien sowohl mit dem oktopaminergen Neurotransmittersystem, als auch mit dem Expressionsmuster von „TβH“, mithilfe von AMIRA ausgewertet und verglichen.

3.6.1 Bestimmung der „TβH“-positiven und oktopaminergen Neurone im adulten Gehirn von *Drosophila melanogaster*

3.6.1.1 Charakterisierung der Anzahl von „TβH“-positiven Neuronen im adulten Gehirn von *Drosophila melanogaster* unter Verwendung des „TβH“-Antiserums

Das Expressionsmuster von TβH wurde 1996 von Monastirioti *et al.* im larvalen Gehirn beschrieben und mit dem oktopaminergen Expressionsmuster verglichen (MONASTIRIOTI 1999; MONASTIRIOTI *et al.* 1996). Es ist jedoch nicht bekannt, wie viele Zellen im adulten Gehirn von *Drosophila* TβH-positiv sind. Es sollte nun mittels des eigens hergestellten „TβH“-Antiserums (CIBIC 2007) die Anzahl an „TβH“-positiven Zellen bestimmt und mit dem Expressionsmuster von

Oktopamin verglichen werden. Die Nomenklatur des „*TβH*“-Expressionsmusters wurde von Straußfeld et al 2006 übernommen.

In Abbildung 15 A-C sind Projektionsansichten von jeweils 50 zusammen gefassten konfokalen Schichten eines adulten Gehirns der Fruchtfliege zu sehen. Zudem wurde eine schematische Übersichtszeichnung des „*TβH*“-Expressionsmusters von fünf Gehirnen angefertigt (Abbildung 15 D), da aufgrund der schlechten Färbequalität des Antikörpers die Zellen schwer detektierbar sind. Die größte Anzahl (≈ 54) an „*TβH*“-positiven Zellen ist caudal im Gehirn zu detektieren (Abbildung 15 A). Diese Zellen können jedoch keinem publizierten Zellcluster von oktopaminergen Zellen zugeordnet werden (im Vergleich mit Abbildung 17). Zwei dieser Zellen könnten von der Größe und Form neurosekretorischer Art sein (Abbildung 15 A, gelbe Pfeile). Gruppen von acht Zellen befinden sich zudem lateral entlang der Eingänge der optischen Loben (Abbildung 15 C, weiße Pfeile). Beim Vergleich mit dem publizierten schematischen oktopaminergen Expressionsmuster in Abbildung 17, könnten diese zwei dorsalen Zellen eventuell in das oktopaminerge G0a und die sechs ventraleren Zellen in das G5b/c Zellcluster zugeordnet werden.

Ferner ist im Bereich der Pars intercerebralis (PI) eine Gruppe von 4-6 Zellen gezeigt (Abbildung 15 B, weißer Pfeil). Bei diesen Zellen wäre möglich, dass sie in die Neuronengruppe der G1 Zellen (Abbildung 17) des oktopaminergen Expressionsmusters eingeordnet werden könnten. Im Bereich, ventral des SOG werden drei „*TβH*“-positive Zellen detektiert (Abbildung 15 A, grüner Pfeil). Diese könnten aufgrund der Lage im Gehirn zu den VUM-Clustern gehören. In der Darstellung der konfokalen Projektionsansicht in Abbildung 15 A ist lediglich eine der drei Zellen sichtbar. Hingegen in der Übersichtszeichnung werden alle drei Zellen dargestellt. In den konfokalen Aufnahmen ist es nicht möglich die Projektionen der einzelnen Neurone zu verfolgen. Anhand Abbildung 15 B können jedoch dichte Innervationen in der ersten Bande des Fächerförmigen Körpers (gelber Pfeil), Strukturen um den Ösophagus (blaue Pfeile), im Bereich des dorso-lateralen Protocerebrums (roter Pfeil) und in der Medulla (orangener Pfeil) verzeichnet werden.

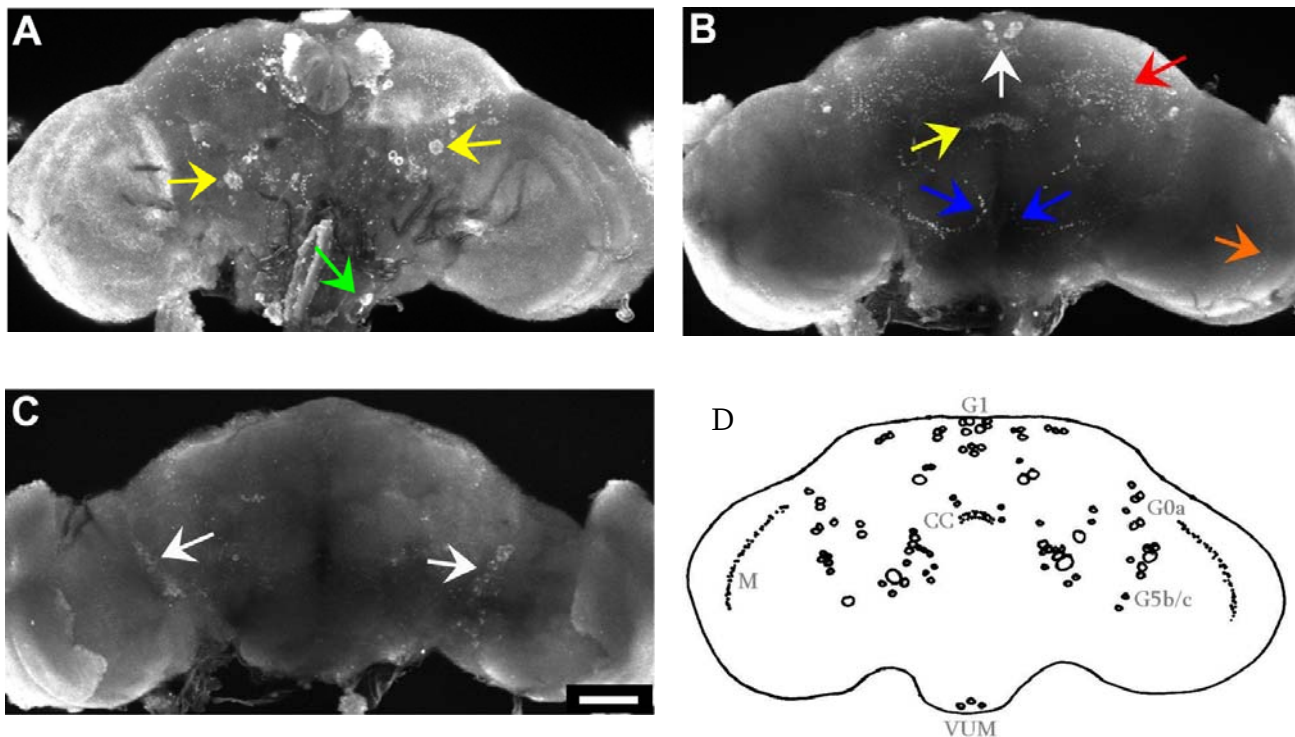


Abbildung 15: Übersicht des (A-C) „TβH“-Expressionsmusters eines *Whole mount* Präparates und (D) eine schematische Darstellung der „TβH“ Immunoreaktivität.

(A-C) Es sind konfokale Schnitte in Form von Projektionsansichten abgebildet. Die Schnitte wurden zu 50µm dicken Schichten zusammengefasst. (A) Der caudale Bereich des Gehirns ist gezeigt. Etwa 54 Zellen sind in diesem Areal des Gehirns detektierbar. Unter diesen Zellen befinden sich drei Zellen im ventralen Bereich des Gehirns (grüner Pfeil), die VUM Neuronen entsprechen könnten. (B) Im Pars intercerebralis sind 4 Zellen in diesem Präparat sichtbar (weißer Pfeil). Innervationen von Neuronen können um den Ösophagus (blaue Pfeile), im Fächerförmigen Körper (gelber Pfeil), in der Medulla (orangener Pfeil), und im dorso-lateralen Protocerebrum (roter Pfeil) dargestellt werden. Der Balken repräsentiert 50µm. (C) Ein Zellcluster aus ≈8 Zellen direkt vor den optischen Loben ist „TβH“-positiv (weiße Pfeile). (D) Eine schematische Zeichnung des Expressionsmusters des verwendeten „TβH“-Antiserums ist dargestellt. Diese Zeichnung wurde aus dem „TβH“-Expressionsmuster von fünf Gehirnen zusammengefasst. Die Bezeichnung der Zellgruppen (G1, CC, M, G0a, G5b/c, VUM) wurde von Sinakevitch und Straußfeld 2006 übernommen (Abbildung 17).

Schlußfolgernd kann man sagen, dass das Expressionsmuster, welches mit dem „TβH“-Serum erzielt werden kann, aus ≈80 Zellen besteht. Der Hauptteil der Zellen kann wahrscheinlich nicht in Zellgruppen des publizierten oktopaminergen Expressionsmusters (Abbildung 17) eingeordnet werden. Es wäre aber aufgrund der relativen Lage möglich, dass die 4-6 „TβH“-positiven Zellen in der Pars intercerebralis (PI), dem oktopaminergen G1-Zellcluster zugeordnet werden könnten (Abbildung 15). Ebenfalls aufgrund der Lage, könnten drei ventral gelegene Zellen

oktopaminergen VUM Neuronen entsprechen. Die Lokalisation der „TβH“-positiven Zellen entlang der optischen Loben hat zudem große Ähnlichkeit mit den G0a und G5b/c Zellclustern des publizierten Sinakevitch und Straußfeld 2006 Oktopamin-Expressionsmusters.

3.6.1.2 Bestimmung von oktopaminergen Neuronen im adulten Gehirn von *Drosophila melanogaster* unter Verwendung des Oktopamin-Antikörpers

Verschiedene Angaben zum Umfang des oktopaminergen Expressionsmusters sind bisher publiziert worden. Anfängliche Beobachtungen zeigten eine ungefähre Anzahl von 70 oktopamin-immunoreaktiven Zellen im adulten Gehirn von *Drosophila melanogaster* (MONASTIRIOTI 1999). Die Anzahl der Oktopamin-positiven Zellen konnte jedoch auf ungefähr 100 Zellen korrigiert werden (SINAKEVITCH and STRAUSFELD 2006).

Zunächst sollte in dieser Arbeit das oktopaminerge Expressionsmuster mithilfe des Oktopamin-Antikörpers (DACKS et al. 2005) auf Anzahl der oktopaminergen Zellen in Fliegengehirnen analysiert werden. Es wird bei der Bezeichnung der gefärbten Zellgruppen ebenfalls die Nomenklatur von Sinakevitch und Straußfeld 2006 verwendet. In Abbildung 16 sind Projektionsansichten von konfokalen Schnitten dargestellt. Es werden jeweils 70 Schnittebenen zu 70µm dicken Schichten verarbeitet. Zudem ist eine schematische Übersichtszeichnung des oktopaminergen Expressionsmusters aus mindestens fünf adulten *Drosophila* Gehirnen zusammen gefasst (Abbildung 16 C).

In Abbildung 16 sind oktopaminerge Zellkörper deutlich sichtbar, die im ventralen Bereich des Gehirns lokalisiert sind. Beim Vergleich der Oktopaminfärbung der Abbildung 16 mit der publizierten Oktopamin-Expression in Abbildung 17 ist offensichtlich, dass diese Zellen zu den VUM Clustern caudal gehören (Abbildung 16 A+B, weißer Pfeil). Die Anzahl an Oktopamin-positiven VUM Neuronen variiert zwischen 16 und 26. Ferner sind 18 Oktopamin-positive Zellen caudal im Gehirn detektierbar (Abbildung 16 B, gelbe Pfeile), die vergleichbar der G4a Neurone in der Abbildung 17 sind. Anterior im Gehirn, ventral der Antennalloben kann beidseitig ein Zellcluster von ≈6 Neuronen detektiert werden (Abbildung 16 A, gelbe Pfeile). Diese Zellen

könnten den G3a Neuronen der Straußfeld Nomenklatur in Abbildung 17 entsprechen. Zwei weitere Zellcluster (je 3 Zellen) sind anterior beidseitig im Gehirn zu erkennen (Abbildung 16 A, blaue Pfeile). Diese Zellen sind wahrscheinlich nicht oktopaminerg, da sie nicht in Zellcluster eingeordnet werden können, die in Abbildung 17 gezeigt sind. Da der Oktopamin-Antikörper eine 30%ige Kreuzreaktivität gegen Tyramin aufweist, wäre möglich, dass diese sechs Zellen tyraminerg sind.

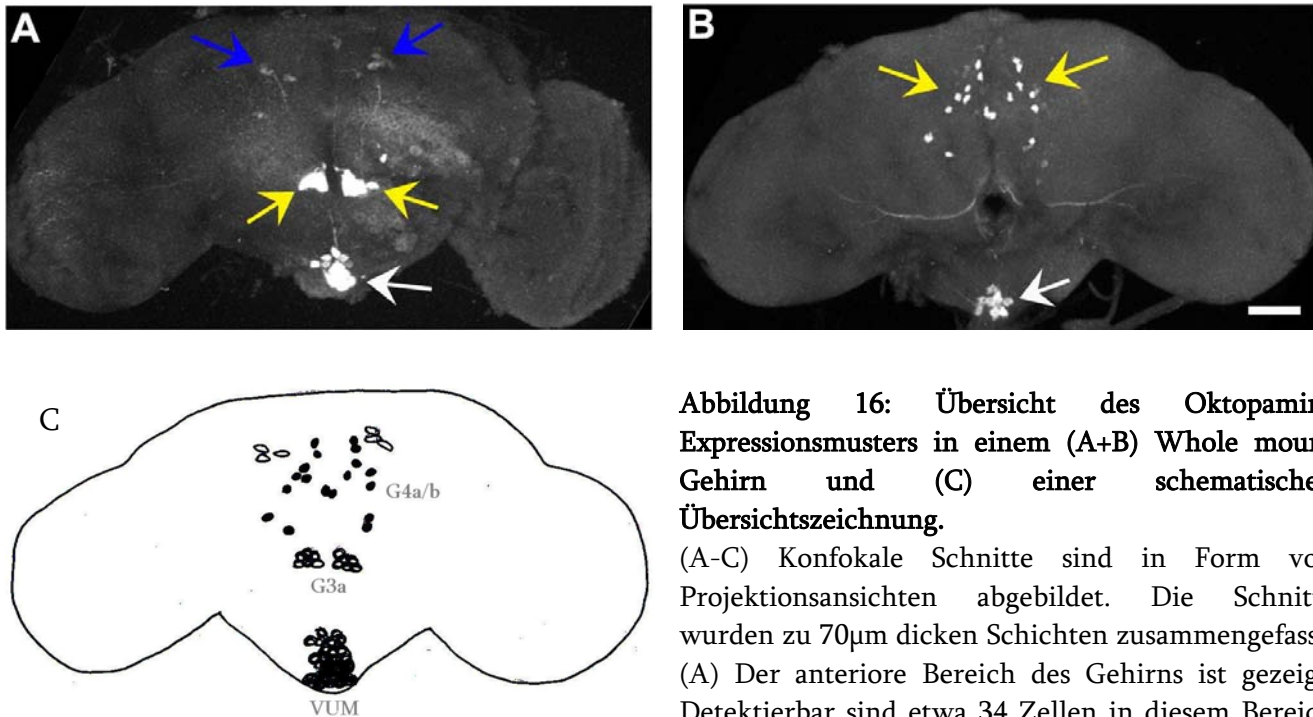


Abbildung 16: Übersicht des Oktopamin-Expressionsmusters in einem (A+B) Whole mount Gehirn und (C) einer schematischen Übersichtszeichnung.

(A-C) Konfokale Schnitte sind in Form von Projektionsansichten abgebildet. Die Schnitte wurden zu 70µm dicken Schichten zusammengefasst. (A) Der anteriore Bereich des Gehirns ist gezeigt. Detektierbar sind etwa 34 Zellen in diesem Bereich des Gehirns. Unter diesen Zellen befinden sich beidseitig drei Zellen im dorsalen Bereich des Gehirns (blaue Pfeile). Im Ventralen Areal sind ungefähr 16 Zellen unterhalb des SOG gefärbt (weißer Pfeil). Zudem befinden sich unterhalb der Antennalloben beidseitig 6 oktopaminerge Zellen (gelbe Pfeile). (B) Im caudalen Bereich des Gehirns sind 18 Zellen in diesem Präparat sichtbar (gelbe Pfeile). Caudal im Gehirn werden 10 Zellen ebenfalls ventral des SOG detektiert (weißer Pfeil). Der Balken repräsentiert 50µm. (C) Eine schematische Zeichnung des Expressionsmusters des anti-Oktopamin-Antikörpers ist dargestellt. Die verwendete Nomenklatur der Zellen (VUM, G3a, G4a/b) wurde von Sinakevitch und Straußfeld 2006 übernommen (Abbildung 17). Diese Zeichnung wurde aus dem Oktopamin-Expressionsmuster von 5 Gehirnen zusammengefasst.

Die Oktopamin Immunreaktivität, die mittels des Oktopamin-Antikörpers gezeigt werden kann, zeigt zusammenfassend ≈62 Oktopamin-positive Zellen (Abbildung 16 A+B). Projektionen der Neurone können mit Hilfe der Oktopamin-Antikörperfärbungen nicht detektiert werden, nur

Zellkörper.

Vergleicht man nun zusammenfassend das gefärbte oktopaminerge Expressionsmuster, mit dem publizierten Oktopamin-Expressionsmuster der Abbildung 17, so könnten aufgrund der relativen Lage im Gehirn ≈ 56 Zellen kolokalisieren. Das vollständige Oktopamin-Expressionsmuster von Sinakevitch und Straußfeld 2006 umfasst jedoch etwa 100-positive Zellen. Demzufolge ist die Oktopamin immunoreaktivität, detektiert mit Hilfe des Oktopamin-Antikörpers nicht vollständig. Oktopaminerge Zellen der G0a/b, G1, G2a/b, G3b, G5a/b und G6 Cluster von Sinakevitch und Straußfeld 2006 werden nicht mit dem verwendeten Oktopamin-Antikörper gefärbt. Hingegen Zellen zugehörig der G3a, G4a/b und der VUM Cluster können detektiert werden.

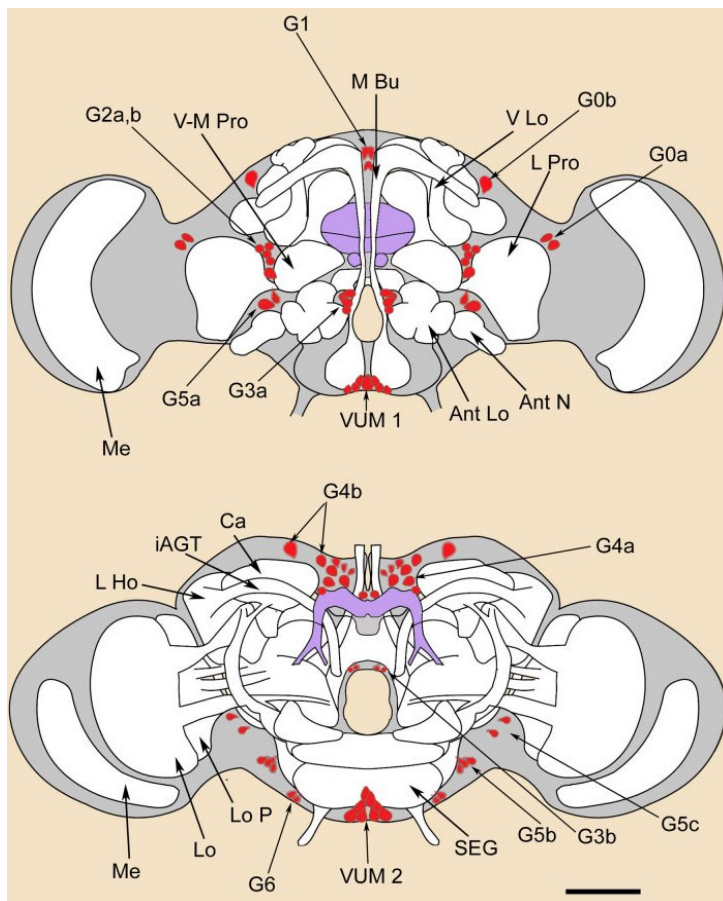


Abbildung 17: Schematische Übersicht der Lage der oktopamin-immunoreaktiven Zellkörper im Gehirn von *Drosophila melanogaster* (SINAKEVITCH and STRAUSFELD 2006).

Im oberen Bild ist der Blick von anterior auf das Gehirn gerichtet, im unteren Bild von caudal. Die Übersicht über die Nomenklatur befindet sich in Tabelle 1 und die genaue Zuordnung der Zellzahlen zu den Gehirnarealen in Tabelle 2.

Zum Überblick der verschiedenen Expressionsmuster und deren Überlappungspunkte ist in Tabelle 1 eine Darstellung über die „TβH“- und Oktopamin-Expressionsmuster erstellt worden. Alle verwendeten Abkürzungen werden dazu in Tabelle2 genauer erklärt.

Tabelle 1: Anzahl und Lokalisation von oktopaminergen Zellen im ZNS von adulten *Drosophila m.* Männchen, verglichen mit „TβH“-positiven Zellen.

Bezeichnung Sinakevitch und Straußfeld 2006	Zellanzahl Sinakevitch und Straußfeld 2006	Agicola Oktopamin- Antikörper	„TβH“-Antiserum
*G2a/b	7		
G1	4		4-6
*G4a/b	10	8-9	-
*G0b	1		-
*G3a	6	4-6	-
VUM	26	≈26	3
*G0a	2		2
*G3b	2		-
*G5a	2		-
*G5b/c	5		6
*G6	2		-

*Es ist jeweils die Anzahl der Zellen pro Gehirnhälfte angegeben.

Beim Anblick der Tabelle1 ist offensichtlich, dass die zwei Oktopamin-Färbungen mit der „TβH“-Färbung nicht in allen Zellen kolokalisieren. Das Oktopaminexpressionsmuster von Sinakevitch und Straußfeld 2006 enthält die größte Anzahl an oktopaminergen Zellen (≈100). Das Oktopaminexpressionsmuster, gefärbt mit dem verwendeten Oktopamin-Antikörper, scheint jedoch nur mit ≈56 der Zellen (G3a, G4a/b, VUM) zu kolokalisieren. Hingegen die „TβH“-Immunoreaktivität überlappt in nur ≈16 Zellen (G0a, G1, G5b/c, VUM) mit dem Straußfeld Oktopamin-Expressionsmuster und in höchstens 3 VUM Zellen mit dem Expressionsmuster des verwendeten Oktopamin-Antikörpers.

Die Vergleichsstudien der drei verschiedenen Expressionsmuster wurden nicht in demselben Präparat durchgeführt. Es konnten folglich lediglich die separat erhaltenen Oktopamin und „TβH“-Immunoreaktivitäten anhand der Lokalisation der Zellen relativ im Gehirn, miteinander

verglichen werden. Demzufolge müsste ein Protokoll etabliert werden, in dem eine Doppelfärbung mit dem „TβH“-Antiserum und einem Oktopamin-Antikörper durchgeführt werden könnte. Auf diese Weise würde man eine eindeutige Aussage über kolokalisierende Zellen treffen können.

Tabelle 2: Verwendete Nomenklatur der verschiedenen Gehirnareale bei *Drosophila melanogaster*

Abkürzung	Bezeichnung ausgeschrieben
DAC	Dorsal anteriores Cluster
DMC	Dorsal mediales Cluster
DPC	Dorsal posteriores Cluster
LP	laterale protocerebrale Zelle
AL	Antennalloben-Cluster
SM	Subösophagial medial
AntLo	Antennalloben
PB	Protocerebrale Brücke
Ca	Calyx
Lo	Lobula
LoP	Lobula Platte
LHo	Laterales Horn
FB	Fächerförmiger Körper
PI	Pars intercerebralis
EB	Ellipsoid Körper
(d)CSC	(dorsale) Caudale kleine Zellen
CBC	Caudale große Zellen
SSh	Umgebende Hülle

3.7 Strukturbeschreibung und Kolokalisationsstudien der untersuchten GAL4-Expressionsmuster

Die Anatomie der Expressionsmuster der in dieser Arbeit hergestellten Transformanten wurde immunohistochemisch untersucht (alle hergestellten Linien sind in Material und Methoden 2.1.2 aufgeführt). Dazu wurden die Expressionsmuster standardmäßig mithilfe des Effektorgens *UAS-mCD8-GFP* visualisiert und zur Signalverstärkung mit einem GFP Antikörper gegengefärbt. Zur Analyse der innervierten Neuropilareale wurde in den Gehirnen die Expression des ubiquitären Synapsenproteins Synapsin immunohistochemisch als Referenz sichtbar gemacht.

3.7.1 Das Expressionsmuster von 650*TβH*-GAL4 überlappt mit dem von „TβH“ - aber nicht mit dem von Oktopamin.

3.7.1.1 Struktur des 650*TβH*-GAL4 Expressionsmusters

Es wurden 40 P-Element Insertionslinien für das 650*TβH*-GAL4 Promoter-Konstrukt hergestellt. Von diesen 40 GAL4-Linien wurde eine Stichprobe von fünf auf ihre GFP exprimierenden Zellen hin untersucht (siehe Material und Methoden 2.1.2). Die Linie 650*TβH*_40-GAL4 wurde letztendlich für die anatomischen und Verhaltensanalysen verwendet.

In Abbildung 18 sind Projektionen konfokaler Datensätze des Expressionsmusters der Linie 650*TβH*_40-GAL4 dargestellt. Es wurden fünf Gehirne für die Auswertung verwendet. Die Gehirne wurden mit einem konfokalen Mikroskop als optische Schnitte aufgenommen. Wie in Abbildung 18 A-C zu erkennen ist, umgibt das Gehirn eine grün fluoreszierende Hülle (gelbe Pfeile). Bei dieser Hülle könnte es sich um die Blut-Hirn-Schranke von *Drosophila* handeln. Diese wird aus Gliazellen gebildet und umschließt das Neuropil (Daneman and Barres 2005). Zusätzlich wird GFP-Expression in fünf Zellen der Pars intercerebralis (PI) detektiert (Abbildung 18 C; weißer Pfeil), deren Projektionen jedoch auch bei einer höheren Vergrößerung in keinem der Präparate zu verfolgen sind. Demzufolge exprimiert die 650*TβH*-GAL4-Linie GFP in nur 5 Zellen der Pars intercerebralis (PI) und vermutlich in einer Vielzahl von Gliazellen.

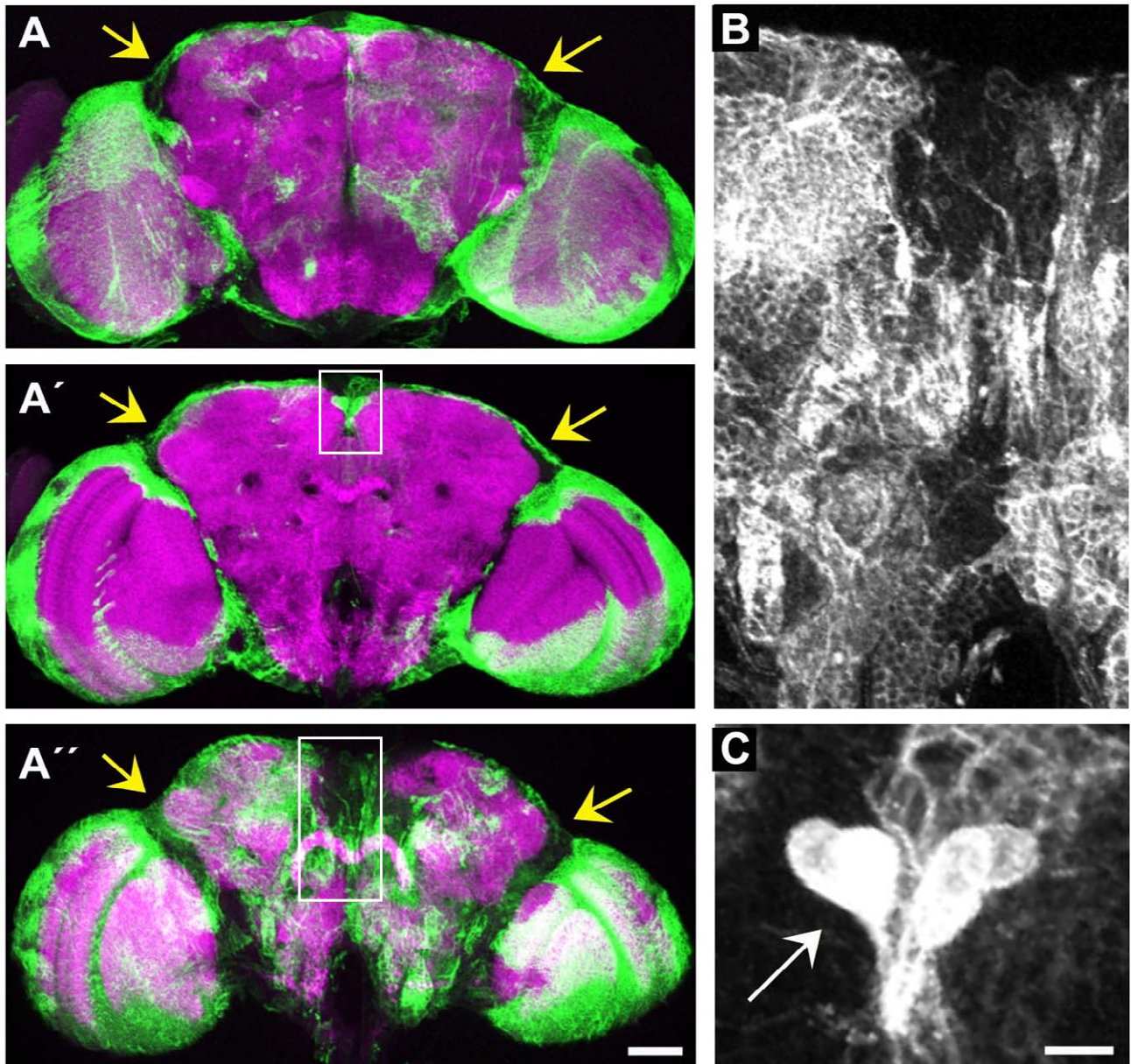


Abbildung 18: Die GAL4-Expression der *650TβH-GAL4* Linie wurde mit Hilfe eines *UAS-mCD8-GFP* Effektorgens und anschließender Antikörperfärbung sichtbar gemacht.

Das Effektor-Konstrukt *UAS-mCD8-GFP* wurde mit der *650TβH-GAL4*-Linie getrieben und das Expressionsmuster im adulten Gehirn untersucht. (A-A''+B) Konfokale Bilderstapel von 40µm Schichten und einer (C) 20µm Schicht sind in dieser Abbildung als Projektion gezeigt. (A-A'') Die Bilderstapel sind von anterior nach caudal zusammengefasst. Es ist eine spezifische grün fluoreszierende Schicht (weiße Pfeile) um das Gehirn zu erkennen und ein sehr kleines Cluster an Zellen im Pars intercerebralis (A') (weißes Kästchen). Eine Vergrößerung der Zellen im PI ist in (C) und der umgebenden Hülle in (B) gezeigt. Weiße Kästchen in A'+A'' repräsentieren die vergrößerten Areale in B bzw. C. Die Whole-mount-Präparate wurden mit GFP Antikörper (grün) und Synapsin Antikörper (magenta) gefärbt. Die Größenbalken sind equivalent zu 50µm in A-A'' und 20µm in B+C.

3.7.1.2 Vergleich des 650*TβH*-GAL4 Expressionsmusters mit dem von „TβH“

Ferner wurde nun untersucht, ob die Zellen der 650*TβH*-GAL4-Linie „TβH“-positiv sind. Dafür wurden Whole-mount Präparate in Schnitten gescannt. Obwohl in der Abbildung 19 nur zwei Zellen in der PI Immunoreaktivität für beide Epitope aufweisen (Abbildung 19 B-B''), konnte in anderen Präparaten gezeigt werden, dass wahrscheinlich der gesamte „TβH“-positive Cluster der PI auch im Expressionsmuster der 650*TβH*-GAL4-Linie liegt (Vergleiche dazu GFP-Expression der Abbildung 18). Die grün fluoreszierende Hülle der Blut-Hirn-Schranke zeigt keine Überlappung mit dem „TβH“-Expressionsmuster (Abbildung 19 A-A'').

3.7.1.3 Vergleich des 650*TβH*-GAL4-Expressionsmusters mit der Immunoreaktivität von Oktopamin

Das Expressionsmuster der 650*TβH*-GAL4-Linie wurde zudem in einer Kollokalisationsstudie mit dem Oktopamin-Antikörper analysiert. Die grün fluoreszierende Hülle zeigt dabei keine Kollokalisierung mit Oktopamin-positiven Zellen, was auch nicht zu erwarten war (Abbildung 20 C-C''). Im PI zeigen fünf Zellen GFP-Expression, jedoch keine Immunoreaktivität mit dem verwendeten Oktopamin-Antikörper (Abbildung 20 B-B''). Im Vergleich mit dem veröffentlichten oktopaminergen Expressionsmuster wurden vier Zellkörper (G1 Zellen) im Bereich des PI beschrieben (Abbildung 17)(Sinakevitch and Strausfeld 2006). Demzufolge zeigt der verwendete Antikörper gegen Oktopamin nicht das vollständige Expressionsmuster, da wahrscheinlich die Penetration des Antikörpers in Whole-mount Präparaten nicht optimal ist.

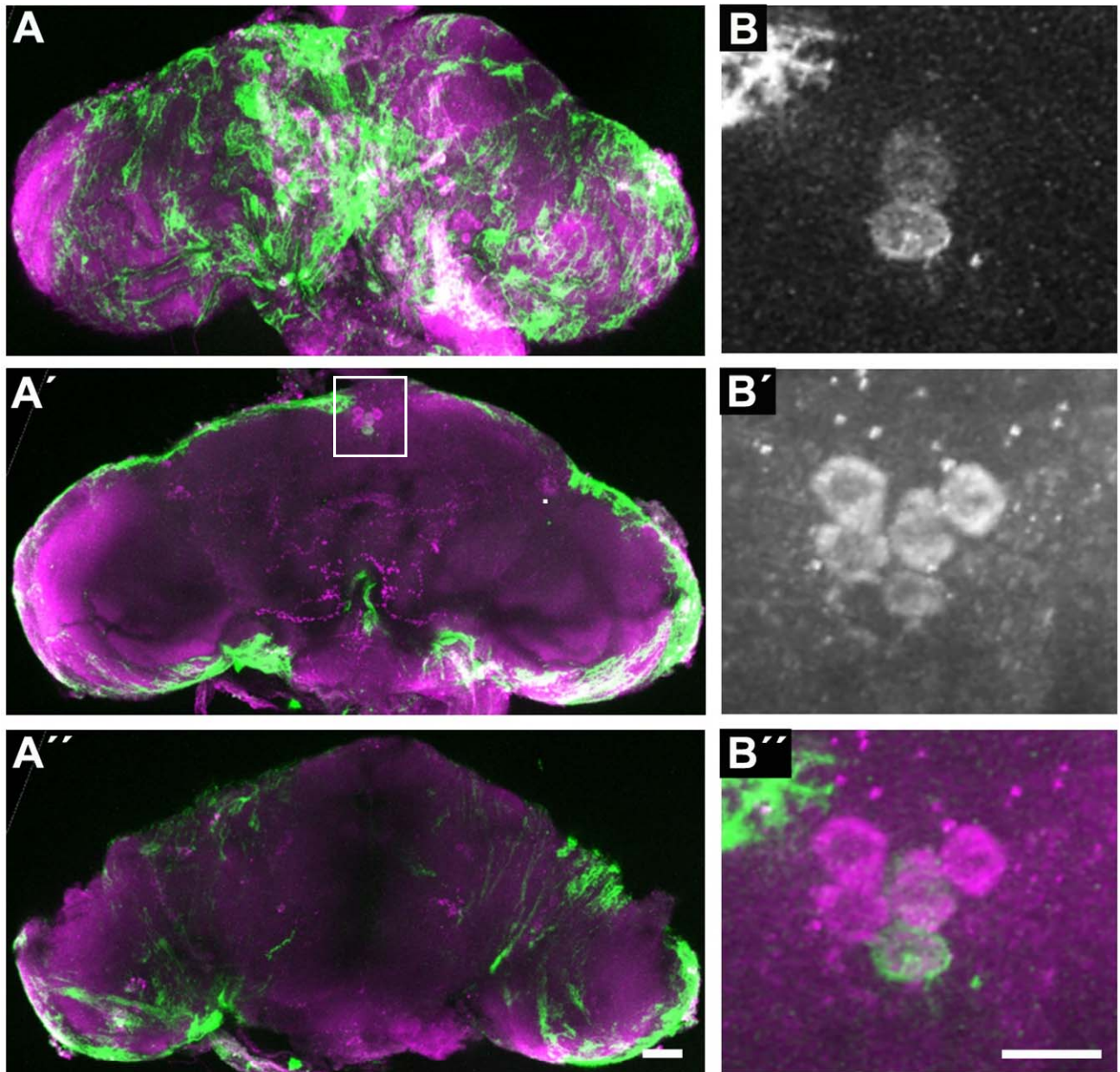


Abbildung 19: Die *650TβH-GAL4* Linie exprimiert GFP in zwei „TβH“-positiven Neuronen in der Pars intercerebralis.

(A-C) Konfokale Bilderstapel von 50µm Schichten und (B-B'') 20µm Schichten sind in dieser Abbildung als Projektion dargestellt. (B-B'') Die transgenen *UAS-mCD8-GFP*; *650TβH-GAL4* Fliegen zeigen im Bereich des PI Kolokalisation mit „TβH“ in zwei GFP-positiven Neuronen. Abbildung B ist die Vergrößerungsansicht des weißen Kästchens in A'. Abbildung (B) zeigt die GFP-Färbung, (B') die „TβH“-Färbung und (B'') den Overlap aus GFP- und „TβH“-Färbung. Die grüne Hülle, die das Gehirn umgibt, zeigt keine Kolokalisation mit „TβH“-positiven Zellen. Whole-mount-Gehirne wurden mit GFP Antikörper (grün) und „TβH“-Antiserum (magenta) gefärbt. Der Größenbalken repräsentiert in (A'') 50µm und (B'') 20µm.

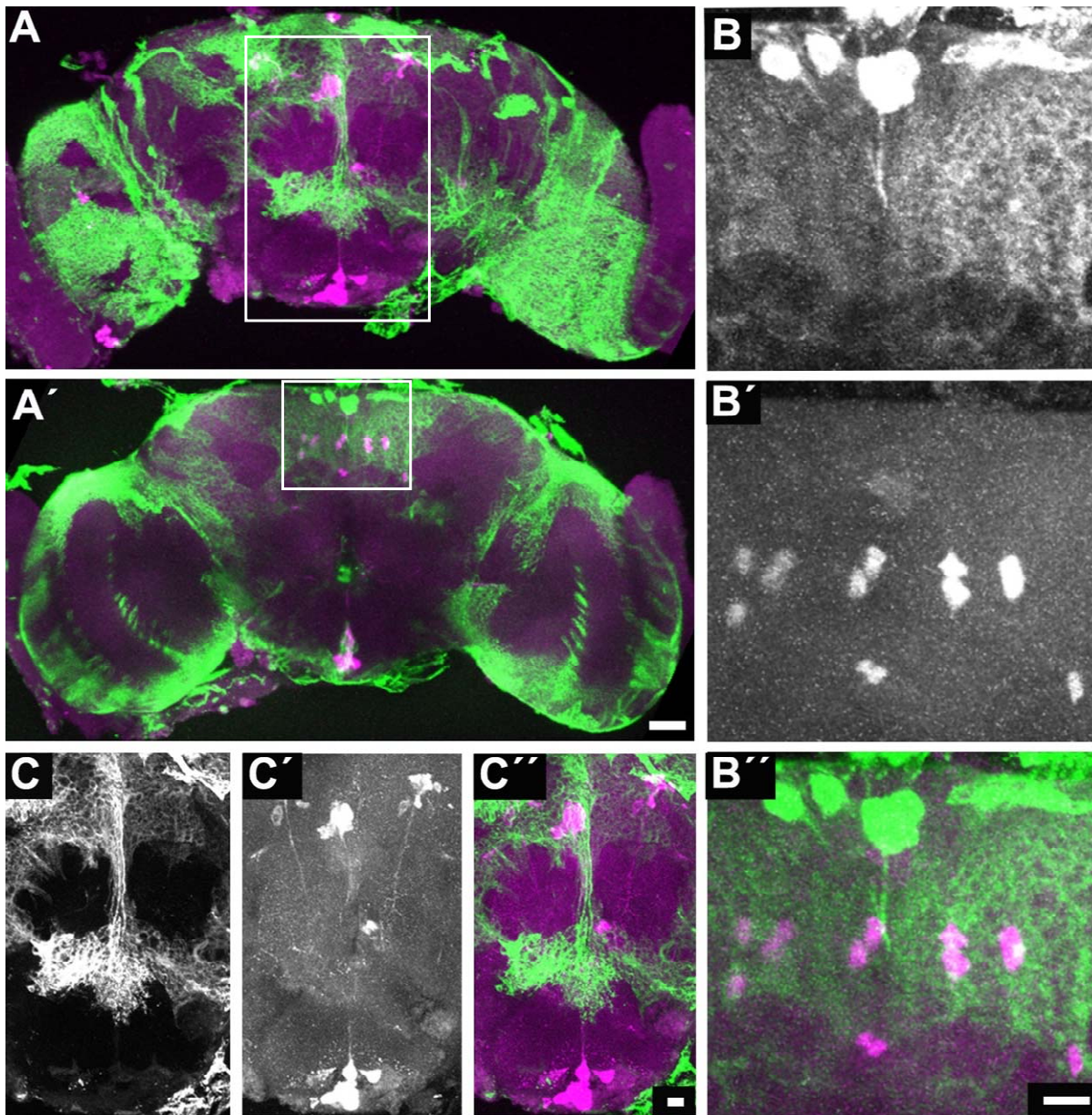


Abbildung 20: GFP-positive Zellen im Pars intercerebralis von *UAS-mCD8-GFP*, *650TβH-GAL4* Fliegen kolokalisieren nicht mit Oktopamin.

Konfokale Bilderstapel von 80µm Schichten (A+A', B-B'', C-C'') sind in dieser Abbildung als Projektionsansicht gezeigt. Transgene *UAS-mCD8-GFP*, *650TβH-GAL4* Fliegengehirne zeigen keine Kolokalisation zwischen den durch die GAL4-Linie getriebenen GFP-positiven Neuronen und dem gefärbten oktopaminergen Expressionsmuster. Die Vergrößerungsansichten der Abbildungen B-B'' repräsentieren das weiße Kästchen in A', sowie die Vergrößerungsansicht von C-C'' das weiße Kästchen in Abbildung A wiedergibt. Abbildungen (A+A', B+B'', C+C'') zeigen GFP-Färbung, (A+A', B'+B'', C'+C'') Oktopamin-Färbung und (A+A', B''+C'') den Overlap aus GFP- und Oktopamin-Färbung. Die Whole-mount Präparate wurden mit GFP Antikörper (grün) und Oktopamin-Antikörper (magenta) gefärbt. Der Größenbalken repräsentiert in (A-A'') 50µm und in (B-B''+C-C'') 20µm.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass sich das Expressionsmuster der 650*TβH*-GAL4-Linie auf fünf Zellen in der Pars intercerebralis und einer das Hirn umgebenden Gliaschicht beschränkt. Dieses Expressionsmuster kolokalisieren im Bereich der Pars intercerebralis mit dem „TβH“-Expressionsmuster. Wider Erwarten kolokalisiert es hingegen nicht mit dem hier dargestellten oktopaminergen Expressionsmuster.

3.7.2 Die 1.3*TβH*-GAL4-Linie exprimiert GFP in ≈10 Neuronen, die weder „TβH“ noch Oktopamin exprimieren.

3.7.2.1 Struktur des 1.3*TβH*-GAL4-Expressionsmusters

Es wurden acht P-Element Insertionslinien für das 1.3*TβH*-GAL4 Promoter-Konstrukt generiert. Alle dieser acht GAL4-Linien konnten auf ihre GFP-exprimierenden Zellen hin untersucht werden. Dabei erhielten wir allerdings nur eine transformante GAL4-Linie mit sichtbarer GFP-Expression.

Für die Analyse des mittels dieser 1.3*TβH*-GAL4-Linie getriebenen GFP-Musters wurden drei Gehirne verwendet. Abbildung 21 und Abbildung 22 zeigen Beispiele des Expressionsmusters der 1.3*TβH* GAL4-Linie, die mit der Standardmethode visualisiert wurden. In der Abbildung 21 A+B ist zu erkennen, dass nur 10 Zellen GFP-positiv sind. Die Vergrößerung der Ausschnitte mit den GFP-markierten Zellen des Gehirns zeigt zwei caudal gelegene Zellen, die wahrscheinlich in die erste und vierte Bande des Fächerförmigen Körpers projizieren (Abbildung 21 A'+B'; weiße Pfeile). Sechs Zellen sind ebenfalls caudal im Bereich des Ösophagusdurchgangs gefärbt (Abbildung 21 A'; gelbe Pfeile). Deren Projektionen sind jedoch nicht zu verfolgen, da sie nach caudal in Richtung corpora allata projizieren. Lateral des SOGs ist ein Paar großvolumiger Zellen erkennbar (asymmetrisch in Abbildung 21 A', grüner langer Pfeil), die ebenfalls ins SOG projizieren (Abbildung 21 A', grüner kurzer Pfeil). Das symmetrische Pendant dieser Zelle in Abbildung 21 wurde bei der Präparation abgerissen, ist aber in anderen Präparaten deutlich erkennbar.

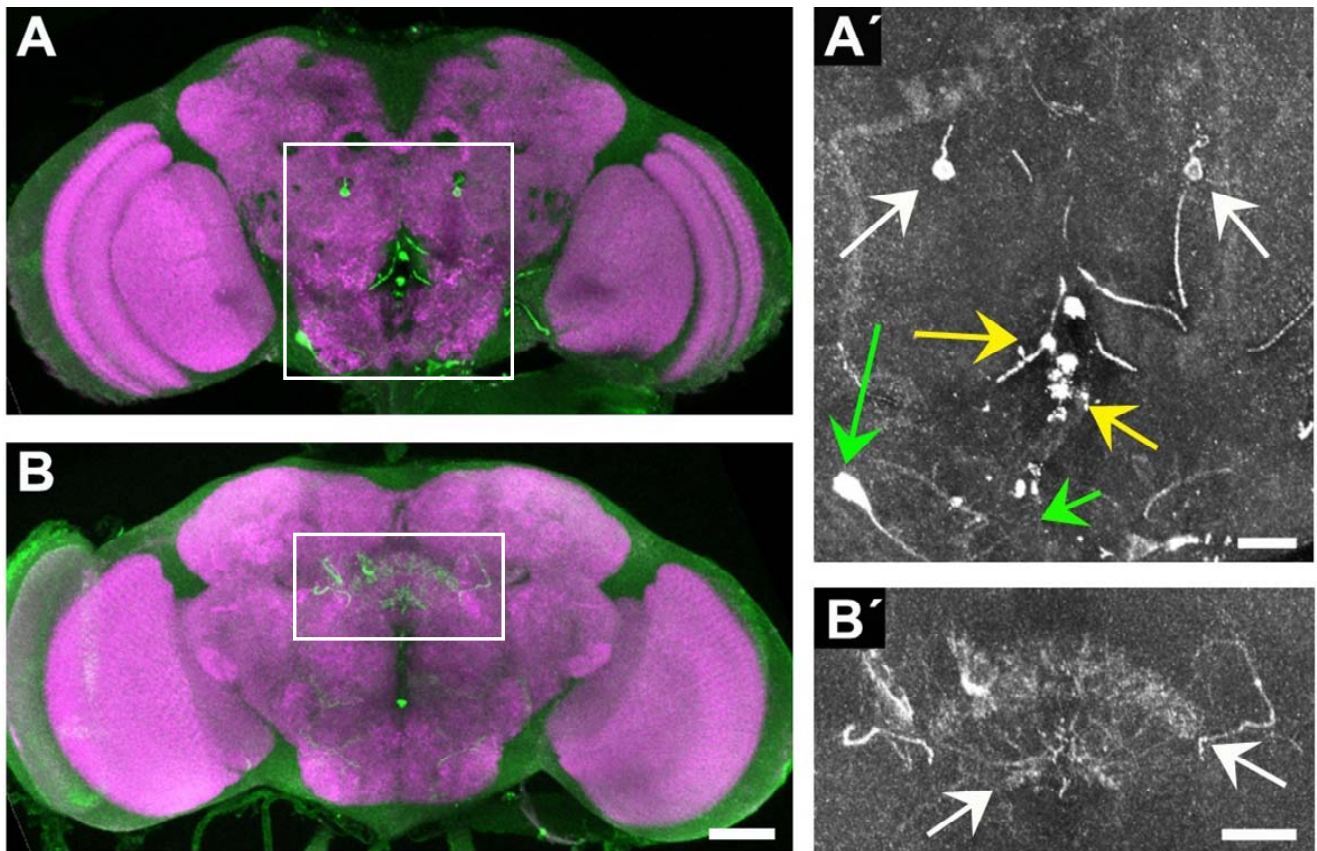


Abbildung 21: GFP- und Synapsin-Expression in adulten Gehirnen von *1.3TβH-GAL4/UAS-mCD8-GFP* Fliegen.

Konfokale Bilderstapel von 80µm Schichten (A+A'; B+B') werden in dieser Abbildung gezeigt. Es sind zwei spezifische Somata caudal des Gehirns zu erkennen ((A'); weiße Pfeile), die in den Fächerförmigen Körper (FB) ((B'); weiße Pfeile) projizieren und ein sehr kleines Cluster von sechs Zellen caudal im subösophagealen Bereich (SOG) ((A'); gelbe Pfeile). Im lateralen SOG ist eine Zelle in der rechten caudalen Hirnhälfte gefärbt, die in das SOG projiziert ((A'); grüne Pfeile). Deren symmetrisches Pendant fehlt in diesem Präparat. Die Expression von GFP und Synapsin in *1.3TβH-GAL4, UAS-mCD8-GFP* wurde mit Hilfe von Antikörper Färbung sichtbar gemacht. (A+B). Die Whole-mount Präparate wurden mit GFP Antikörper (grün) und Synapsin Antikörper (magenta) gefärbt. Der Größenbalken ist equivalent zu (A+B) 50µm und (A'+B') 20µm.

3.7.2.2 Vergleich des *1.3TβH-GAL4*-Expressionsmusters mit dem des oktopaminergen Expressionsmusters

Die GFP-Expression in adulten Fliegengehirnen von *1.3TβH-GAL4, UAS-mCD8-GFP* Fliegen weist in der gezeigten Antikörperfärbung keine Überlappung mit Oktopamin-positiven Zellen auf (Abbildung 22). Die caudal gelegenen Zellen im *1.3TβH*-Expressionsmuster kolokalisieren nicht mit dem immunohistochemisch visualisierten Expressionsmuster von Oktopamin. Ebenso tauchen

die Zellen lateral des SOG nicht in der α -Oktopaminfärbung auf. Es kann demzufolge gezeigt werden, dass das gefärbte 1.3*TβH*-GAL4-Expressionsmuster nicht Oktopamin-positiv ist.

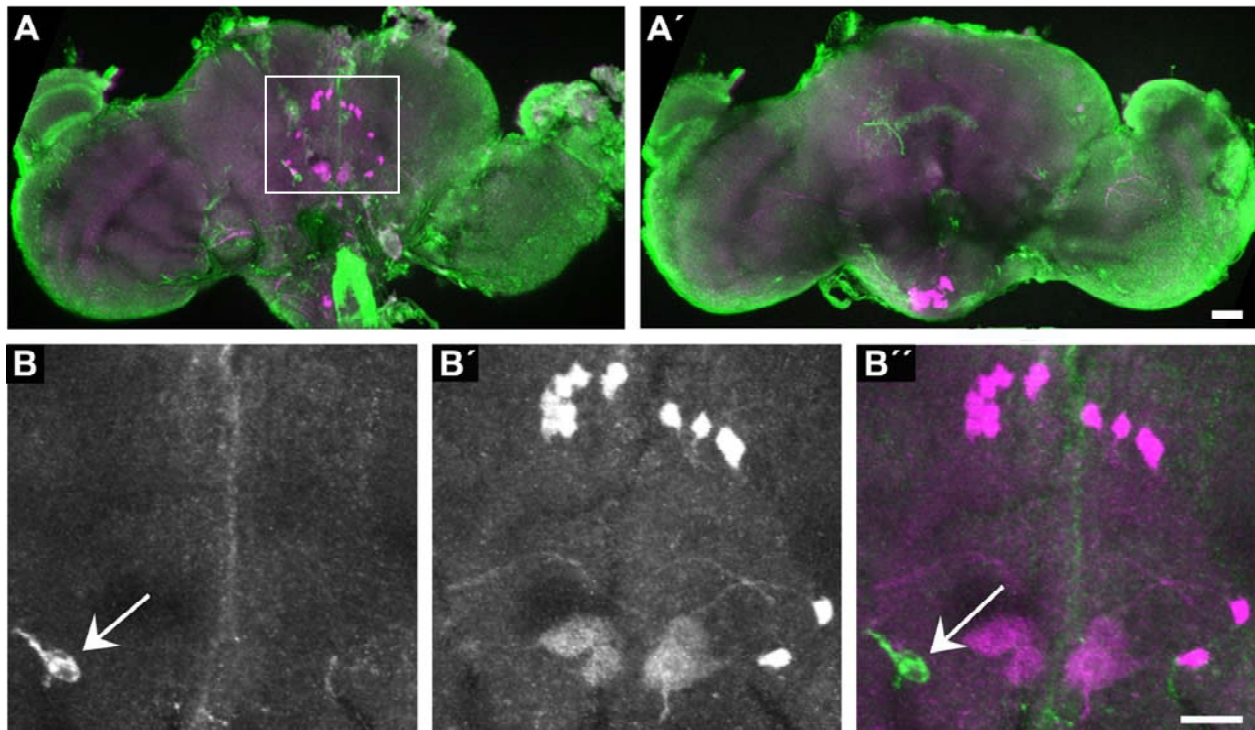


Abbildung 22: Die GFP-Expression von 1.3*TβH*-GAL4/*UAS-mCD8-GFP* Fliegen kolokalisiert nicht mit der Oktopamin Expression.

Konfokale Bilderstapel von 80µm Schichten (A+A') und 40µm Schichten (B-B'') sind in dieser Abbildung zu sehen. Transgene 1.3*TβH*-GAL4/*UAS-mCD8-GFP* Fliegen zeigen keine Kolokalisation zwischen den durch die GAL4-Linie getriebenen GFP-positiven Neuronen (grün) und dem oktopaminergen Expressionsmuster (magenta) ((B+B''), weißer Pfeil). Das GFP-Muster ist in diesem Whole-mount Präparat nicht vollständig, da nur eine Zelle, die in den FB projiziert, detektiert werden kann. Die Vergrößerungsansicht in Abbildung B-B'' ist equivalent zu dem weißen Kästchen in A. Die Whole-mount-Präparate wurden mit einem GFP Antikörper (A, A', B, B'') und Oktopamin-Antikörper (A, A', B', B'') gefärbt. Der Größenbalken repräsentiert (A+A') 50µm und (B-B'') 20µm.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass die 1.3*TβH*-GAL4-Linie in einem sehr spezifischen Subset von Neuronen GAL4 exprimiert. Insgesamt werden 10 Zellen detektiert, von denen zwei caudale Neurone wahrscheinlich in die Region der ersten und vierten Schicht des Fächerförmigen Körpers projizieren. Weitere kleine Ansammlungen von acht Zellen können um den Ösophagus und im Bereich des SOGs verzeichnet werden. Die mit GFP markierten Neurone exprimieren wahrscheinlich kein Oktopamin.

3.7.3 Die 4.6*TβH*-GAL4-Linie exprimiert GFP in einigen „TβH“-positiven Zellen, aber in keiner Oktopamin-immunoreaktiven Zelle.

3.7.3.1 Struktur des Expressionsmusters der 4.6*TβH*-GAL4 Linie

Es wurden 16 P-Element Insertionslinien für das 4.6*TβH*-GAL4 Promoter-Konstrukt hergestellt. Diese GAL4-Linien wurden auf ihre GFP-exprimierenden Zellen hin untersucht. Dabei erhielten wir allerdings nur eine transformante GAL4-Linie mit sichtbarer GFP-Expression.

Die Analyse des mittels dieser 4.6*TβH*-GAL4-Linie getriebenen GFP-Musters wurde an drei Gehirnen durchgeführt. Abbildung 23 zeigt die Projektion eines Beispiels des Expressionsmusters der 4.6*TβH*-GAL4-Linie in grün (GFP) vor der standardmässigen Referenzfärbung (Synapsin) in magenta. Das GFP-Expressionsmuster ist auf ≈ 67 Zellen beschränkt. Dorso-lateral über den Antennalloben (AL) sind anterior Ansammlungen von Zellen (jeweils ≈ 18) zu erkennen (Abbildung 23 A', grüne Pfeile), Diese projizieren in die Antennalloben (AL). Aufgrund der Lage der Zellen, ist es möglich, dass diese GABAerge Interneurone der Antennalloben darstellen (persönliche Kommunikation mit H. Tanimoto).

Der Ellipsoid Körper (EB) als Teil des Zentralkomplexes ist stark von lateralen Zellclustern bestehend aus ≈ 11 Zellen, die anterior liegen innerviert (Abb.:14 B', gelbe und blaue Pfeile). Bei diesen Neuronen könnte es sich der Lage und Verzweigungsmuster nach, um Ringneurone der R1- und R4-Gruppen handeln (Hanesch 1989; Renn et al. 1999). Im caudalen Bereich des Gehirns sind 6-8 Zellen GFP-positiv (Abbildung 23 C). Wie in Abbildung 23 C+C' zu erkennen, liegen drei Somata als Cluster bilateralsymmetrisch des Ösophagus (grüne Pfeile in C') Von diesen Zellclustern ausgehende Projektionen zu anderen Gehirnarealen konnten jedoch nicht beschrieben werden. Eine weitere Zelle befindet sich in der PI und projiziert in Richtung Ösophagus (Abbildung 23 C, gelber Pfeil). Frühere Arbeiten beschreiben Zellen mit dieser Anatomie als neurosekretorisch (Nassel 1993; Shiga et al. 2000; Thomsen 1969). Daher liegt es nahe, dass diese Zelle neurosekretorische Funktionen besitzt.

Starke GFP-Expression kann des Weiteren im antenno-mechanosensorischen und motor Zentrum (AMMC) beobachtet werden (Abbildung 23 B', grüne Pfeile). Das AMMC besteht aus mechanosensorischen Zellen der Antenne, deren Zellkörper nahe der Antenne liegen. Daher können diese im $4.6T\beta H$ -GAL4-Expressionsmuster nicht detektiert werden.

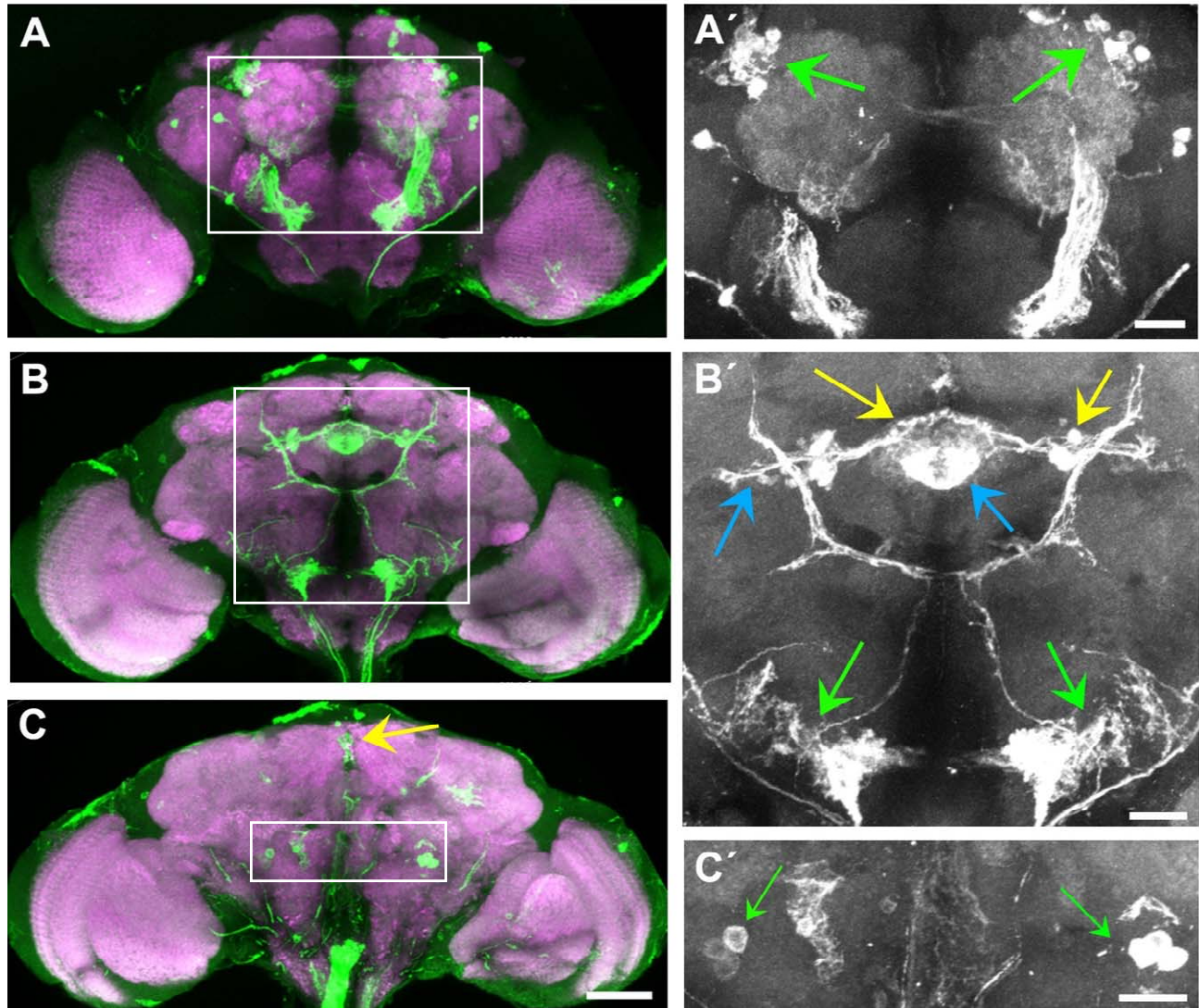


Abbildung 23: Die GAL4-Expression der $4.6T\beta H$ -GAL4 Linie wurde mittels eines UAS - $mCD8$ -GFP Effektorgens und anschließender Antikörperfärbung sichtbar gemacht.

(A-C, A'+B') Konfokale Bilderstapel von $60\mu m$ Schichten und einer (C') $20\mu m$ Schicht sind in dieser Abbildung gezeigt. (A+A') Im anterioren Teil des Gehirns sind dorso-lateral über den Antennalloben (AL) Ansammlungen von Zellen (jeweils ≈ 18) zu erkennen (grüne Pfeile in A'). (B+B') Ebenso kann das antenno-mechanosensorische und motorische Zentrum gezeigt werden (B' Vergrößerung, grüne Pfeile). (C+C') Es sind caudal jeweils 3 Zellen beidseitig lateral der Mittellinie zu erkennen (C' Vergrößerung, grüne Pfeile). Ebenso kann die Expression einer Zelle im Pars intercerebralis gezeigt werden (gelber Pfeil). Weiße Kästchen in A-C repräsentieren die vergrößerten Areale in A'-C'. Mit der $4.6T\beta H$ -GAL4-Linie wurde

das Effektor-Konstrukt *UAS-mCD8-GFP* getrieben und das Expressionsmuster im ZNS in adulten *Drosophila melanogaster* Männchen untersucht. Die Whole-mount Präparate wurden mit GFP Antikörper (grün) und α -Synapsin Antikörper (magenta) gefärbt. Die Größenbalken sind equivalent zu 50 μ m in A-C und 20 μ m in A'-C'.

3.7.3.2 Vergleich des 4.6*TβH*-GAL4-Expressionsmusters mit der Immunoreaktivität von „TβH“

Ferner wurde untersucht, welche GFP-positiven Neurone der 4.6*TβH*-GAL4-Linie mit dem „TβH“-Antiserum zu detektieren sind. (Abbildung 24 A-C). Im caudalen Bereich exprimieren 6-8 Neurone des Gehirns GFP und erscheinen ebenfalls in der α -„TβH“-Färbung (Abbildung 24 C-C', weiße Pfeile). In den restlichen 61 Zellen des 4.6*TβH*-Expressionsmusters wird nur GFP exprimiert, aber kein „TβH“. Zusätzlich gibt es Zellen, die „TβH“-positiv, aber GFP negativ sind. Die GFP-positiven Zellen, die in den Ellipsoid Körper projizieren, kolokalisieren nicht mit der „TβH“-Expression (Abbildung 24 B-B', weiße Pfeile). Aufgrund der Überlappung in den caudalen Zellen wäre es möglich, dass das verwendete TβH-Fragment spezifische regulatorische Information für diese „TβH“-positiven Zellen beinhaltet. Die Analyse des getriebenen GFP Musters mittels der 4.6*TβH*-GAL4-Linie wurde an drei Gehirnen durchgeführt.

3.7.3.3 Vergleich des 4.6*TβH*-GAL4-Expressionsmusters mit dem von Oktopamin

Bei der Analyse der Doppelfärbung des mit der 4.6*TβH*-GAL4-Linie getriebenen GFP-Expressionsmusters (grün) und der Oktopamin-Antikörperfärbung (magenta), kann man erkennen, dass keinerlei Kolokalisationen zu verzeichnen sind (Abbildung 25 A-D). Keines der GFP-positiven Neurone zeigt mit dem verwendeten polyklonalen Oktopamin-Antiserum Immunoreaktivität. Aufgrund der speziellen Bedingungen des Färbeprotokolls für Oktopamin, konnte die GFP-Färbung nicht optimal durchgeführt werden. Demzufolge wäre möglich, dass das GFP-Expressionsmuster nicht vollständig gefärbt wurde, wie am Beispiel der in der PI lokalisierten Zellen erkennbar ist. Im Vergleich zu den von Sinakevitch und Straußfeld 2006 publizierten Daten färbt der in dieser Arbeit verwendete Oktopamin-Antikörper nicht das gesamte oktopaminerge Expressionsmuster. Demzufolge kann nicht eindeutig gezeigt werden, dass keine GFP-positive Zelle ebenfalls oktopaminerg ist. Die Analyse des getriebenen GFP Musters mittels der 4.6*TβH*-GAL4-Linie wurde an drei Gehirnen durchgeführt.

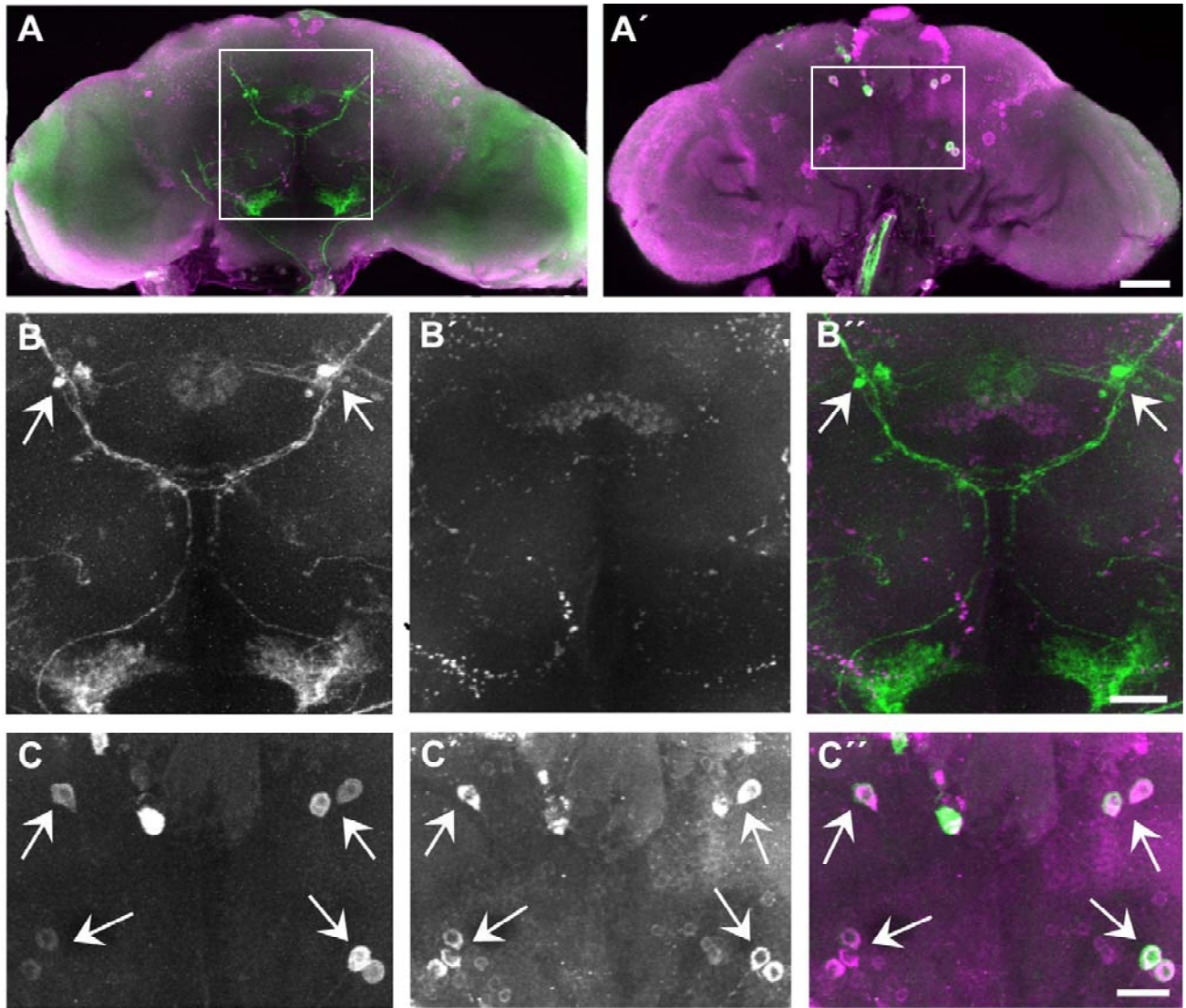


Abbildung 24: Die 4.6*TβH*-GAL4Linie exprimiert in acht TβH-positiven Neuronen GFP.

In dieser Abbildung sind Konfokale Bilderstapel von 80µm Schichten als Projektion dargestellt (A+A'). (B-B'') Zellen, die den Ellipsoid Körper innervieren zeigen keine Kolo­kalisation mit der „TβH“-Expression (weiße Pfeile). (C-C'') Transgene 4.6*TβH*-GAL4/*UAS-mCD8-GFP* Fliegen zeigen caudal Kolo­kalisation mit „TβH“ in sieben GFP-positiven Neuronen (weiße Pfeile). Die Whole-mount-Präparate wurden mit GFP Antikörper (grün) in den Abbildungen A,A',B,B'',C und C'', und „TβH“-Antiserum (magenta) in den Abbildungen A,A',B',B'',C' und C'' gefärbt. Die weißen Kästchen in A+A' repräsentieren die vergrößerten Bereiche in B-B'' und C-C''. Der Größenbalken entspricht (A+A') 50µm und (B-B''; C-C'') 20µm.

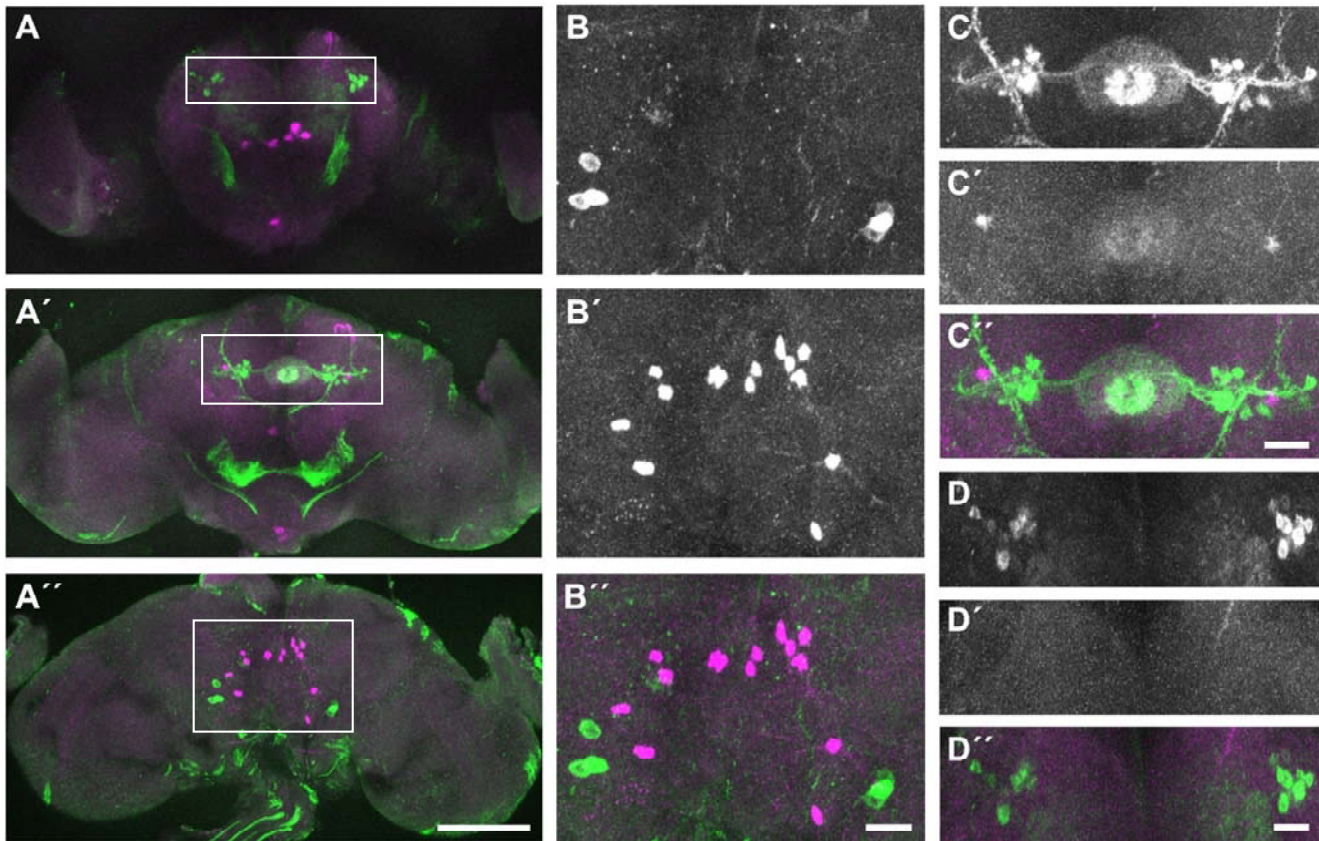


Abbildung 25: Die GFP-Expression der 4.6*TβH*-GAL4/*UAS-mCD8-GFP* Fliegen kolokalisiert nicht mit der Oktopamin-Expression.

In dieser Abbildung sind konfokale Bilderstapel von 60µm Schichten als Projektionsansicht dargestellt (A-A''). Transgene 4.6*TβH*-GAL4/*UAS-mCD8-GFP* Fliegen zeigen keine Kolokalisation der getriebenen GFP-positiven Neurone (grün) mit Oktopamin (magenta). Die Abbildungen B-D stellen jeweils die Vergrößerungsansichten der weißen Kästchen in A-A'' dar. Die Whole-mount Präparate wurden mit GFP Antikörper (A-A'', B+B'', C+C'', D+D'') und α-Oktopamin-Antikörper (A-A'', B'+B'', C'+C'', D'+D'') gefärbt. Der Größenbalken entspricht in Abbildung (A-A'') 50µm und in (B-D) 20µm.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass durch die 4.6*TβH*-GAL4 Treiberlinie die Expression von *UAS*-Effektorgenen in ≈67 Neuronen des adulten Gehirns ermöglicht wird. Folgende Strukturen werden mittels dieser GAL4-Linie innerviert. Caudal im Gehirn werden sieben Zellen detektiert, bei denen der Innervationsort nicht bekannt ist. Ungefähr 11 Zellen bilateralsymmetrisch des Ellipsoid Körpers (EB) projizieren in den ersten und dritten Ring des EB. Diese Zellen gehören zu den Ringneuronen (HANESCH 1989; RENN *et al.* 1999). Jeder Antennallobus wird von ≈18 Neuronen innerviert. Das AMMC zeigt eine starke GFP-Immunoreaktivität, weist aber wie die meisten Neuropilstrukturen weder Immunoreaktivität für „TβH“ noch für Oktopamin

auf. Sieben der caudalen GFP-positiven Neurone exprimieren nachweisbar „T β H“, jedoch Oktopamin exprimiert keine der detektierten Zellen.

3.7.4 Die 6.2*T β H*-GAL4-Linie exprimiert GFP in Oktopamin-positiven Zellen.

Es wurden sechs P-Element Insertionslinien mit dem 6.2*T β H*-GAL4 Promoter-Konstrukt hergestellt. Vier dieser sechs GAL4-Linien wurden auf ihre GFP-exprimierenden Zellen hin untersucht. Das GFP-Expressionsmuster der vier verschiedenen GAL4-Linien war nahezu identisch. Somit kann die Aussage getroffen werden, dass das verwendete 6.2 kb Promoter-Fragment des *T β H*-Gens eine hohe Anzahl an regulatorischen Elementen besitzt, die ein stabiles GAL4-Expressionsmuster zur Folge haben. Der Insertionsort des GAL4-Konstruktes scheint somit keine Rolle zu spielen, so dass umliegende regulatorische Elemente die Expression des GAL4 Proteins nicht beeinflussen. Für die immunohistochemischen Analysen und Verhaltensversuche wurde die Linie 6.2*T β H*_2-GAL4 verwendet.

3.7.4.1 Struktur des Expressionsmusters der 6.2*T β H*-GAL4 Linie

Die Analyse des mittels der 6.2*T β H*-GAL4-Linie getriebenen GFP-Expressionsmusters wurde an drei Gehirnen durchgeführt. Abbildung 26 A-C zeigt partielle Projektionen der konfokalen Bildstapel als ein Beispiel des Expressionsmusters der 6.2*T β H*-GAL4-Linie.

Das GFP-Expressionsmuster ist auf 65-70 Zellen begrenzt, wie in Abbildung 26 A-D erkennbar ist. Anterior ist die GFP-Expression in \approx 13 Neuronen zu finden. Davon ist ein unpaariges Neuron ventral des SOGs lokalisiert (Abbildung 26 B', weißer Pfeil). Dieses Neuron projiziert bilateralsymmetrisch um den Ösophagus, zum lateralen Protocerebrum (B', blaue Pfeile), und zum dorso-lateralen Protocerebrum (B'', blauer Pfeil). Diese Zelle weist beträchtliche Ähnlichkeiten mit einem oktopaminergen Neuron auf, das in der Honigbiene beschrieben wurde (Hammer and Menzel 1998). Dabei handelt es sich um das ventral unpaired median Neuron (VUMmx1). Da die Projektionen und das vorliegende biogene Amin ähnlich sind, könnte es sich bei der im 6.2*T β H*-GAL4-Expressionsmuster gefundenen Zelle um ein VUM Neuron von *Drosophila* handeln. Ein

weitere unpaarige Neuron liegt weiter anterior im SOG (Abbildung 26 C''', dunkelgrüner Pfeil), und projiziert in Bereiche des SOG (C''', hellgrüner Pfeil), Richtung Ösophagus (C''', gelber Pfeil) und laterales Protocerebrum (C''', blauer Pfeil).

Die anderen 12 Somata sind paarig angelegt. Lateral des SOGs liegen drei Neurone, die in den ventralen Bereich des SOGs projizieren (Abbildung 26 C''', rote Pfeile). Ebenso gelangen Innervationen von zwei dorsolateral der Antennalloben gelegenen Zellen in den Bereich des Ösophagus und SOG (Abbildung 26 C'''). Ferner befinden sich frontal 2-3 Somata je Gehirnhälfte, die contralateral in den benachbarten Antennalloben projizieren (Abbildung 26 C''', hellblaue Pfeile). Sie bilden eine kleine Kommissur.

Ein GFP-positives Zellcluster im PI (Abbildung 26 B weißes kleines Kästchen, B''', grüner Pfeil), besteht aus fünf Zellen. Diese Neurone projizieren entlang des medianen Bündels ventral und innervieren Bereiche des SOGs und Ösophagus (Abbildung 26 C''', weißer Pfeil). Ein weiteres Zellcluster von 10 Zellen befindet sich lateral zum EB und innerviert diesen (Abbildung 26 C''). Der EB als Teil des Zentralkomplexes ist in der Abbildung 26 C' nur schwach gefärbt. Aus diesem Grund wurde zusätzlich eine Abbildung des Ellipsoid Körpers aus einer stärkeren Färbung in Abbildung 26 C'' gezeigt. Die 10 lateralen Zellkörper deuten auf die Zugehörigkeit zu den Ringneuronen der R1-, R2- und R3- Neuronenclustern hin (Renn et al. 1999). Auf der caudalen Seite des Gehirns sind zwei große Zellen gefärbt, die aufgrund der Größe und Form neurosekretorischer Art sein könnten (Abbildung 26 A', weiße Pfeile). Die Projektionen dieser Zellen sind jedoch nicht detektierbar. Ebenfalls caudal sind ≈ 20 kleinere Zellen dorsal zu erkennen, deren Projektionen anscheinend das dorso-laterale Protocerebrum innervieren (Abbildung 26 A', grüne Pfeile). Die Pars intercerebralis weist in 6-8 Zellen eine starke Expression auf, die sich auch durch den Mittellinientrakt bis in den ventralen Bereich des SOGs verfolgen lässt.

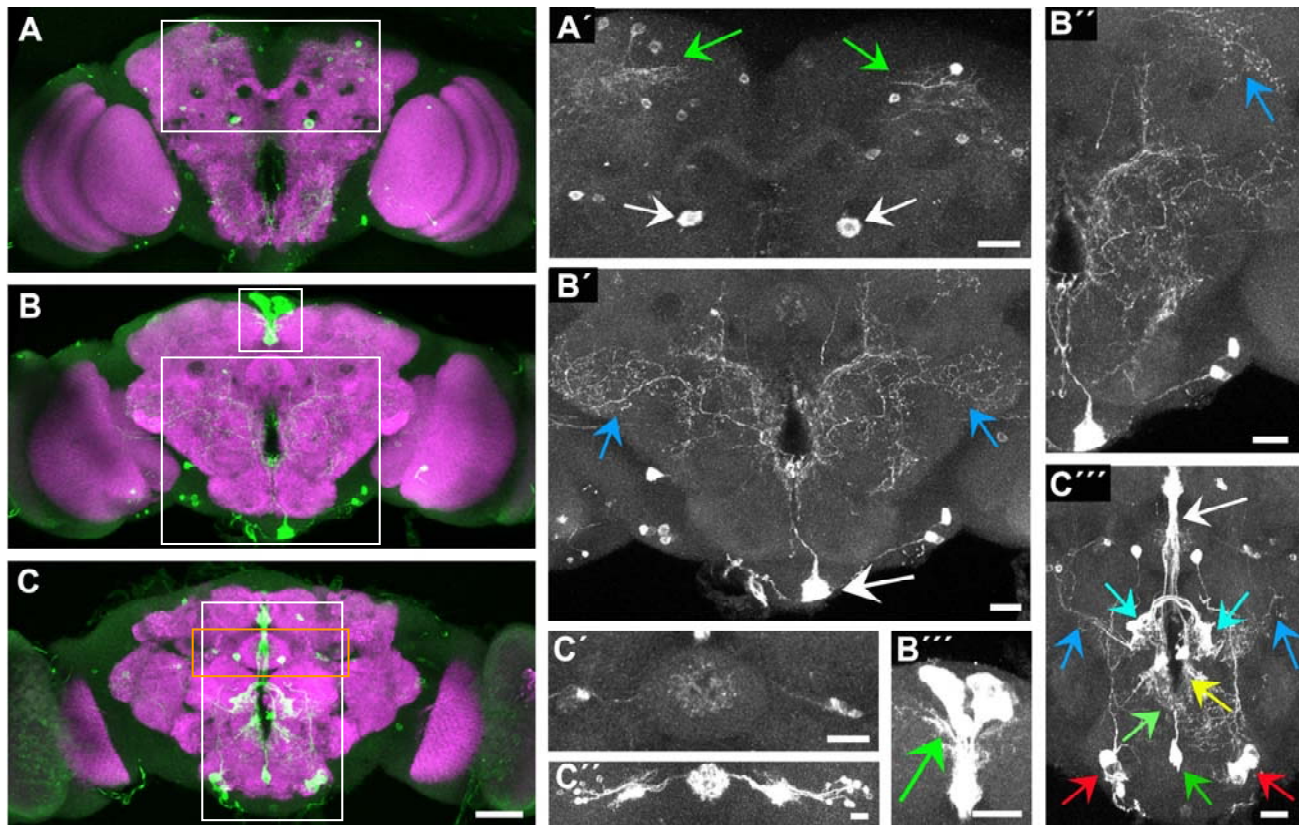


Abbildung 26: Das GAL4-Expressionsmuster der 6.2TβH-GAL4 Linie wurde mit Hilfe eines *UAS-mCD8-GFP* Effektorgens und nachfolgender Antikörperfärbung visualisiert.

Von den gescannten Präparaten wurden je 80 Schnitte zu 80µm dicken Schichten von caudal nach anterior zusammengefasst, die vergrößerten Projektion B-B'' sind 20µm und in C-C'' 10µm dicke Schichten gezeigt. Mit der 6.2TβH-GAL4-Linie wurde das Effektor-Konstrukt *UAS-mCD8-GFP* Fliegengehirnen getrieben und das Expressionsmuster im adulten Gehirn von *Drosophila* analysiert. (A-C). Konfokale Bilderstapel von 60µm Schichten und (C', C'', B''') von 20µm Schichten sind in dieser Abbildung gezeigt. (A+A') Zwei große Zellen sind zu sehen (A', weiße Pfeile). Im dorsalen Bereich des caudalen Gehirns können weitere kleinere Zellkörper (≈20) sichtbar gemacht werden (A', grüne Pfeile). Das weiße Kästchen in Abbildung A zeigt die Vergrößerung in A'. (B-B'') Der große weiße Kasten in Abbildung B ist in B' und B'' vergrößert abgebildet. Ventral ist eine große Zelle gefärbt, die zum Ösophagus, in Bereiche des lateralen Protocerebrums (B', blaue Pfeile) und des dorso-lateralen Protocerebrums (B'', blauer Pfeil) projiziert. (C+C'') Anterior sind 13 Zellen GFP-positiv. Von den sechs ventralen symmetrischen Zellen lateral der subösophagialen Mittellinie (rote Pfeile) und der einzelnen Zelle auf der ventralen Mittellinie (dunkelgrüner Pfeil), innervieren Projektionen das subösophagiale Ganglion (C''', hellgrüner Pfeil). (C''') Dorsal des Ösophagus wird eine Kommissur von beidseitig zwei Zellen gebildet (blauer Pfeil), die contralateral in die jeweils andere Gehirnhälfte projizieren (hellblaue Pfeile). (B'''+C''') Projektionen von Zellkörpern, die im Pars intercerebralis lokalisiert sind innervieren ebenfalls das SOG und projizieren in den Ösophagus (B''', grüner Pfeil; C''', weißer Pfeil). Dieser Bereich ist eine Vergrößerung des kleinen weißen Kästchens in Abbildung B. (C'+C'') Ein kleines Zellcluster beidseitig lateral des Ellipsoid Körpers (EB) projiziert in den EB. Die Vergrößerungsansicht des orangenen Kästchens in Abbildung C ist in Abbildung C' dargestellt. Aufgrund der schwachen Färbung des Ellipsoid Körpers im gezeigten Präparat (C'), wurde zudem eine Vergrößerung des Bereiches aus einem anderen Präparat mit stärkerer Färbung

eingefügt (C''). Die Whole-mount-Präparate wurden mit GFP Antikörper (grün) und Synapsin Antikörper (magenta) gefärbt. Die Größenbalken sind in den Abbildungen (A-C) equivalent zu 50µm und in den Abbildungen (A', B'-B''', C'-C''') 20µm.

3.7.4.2 Vergleich des 6.2TβH-GAL4-Expressionsmusters mit der Immunreaktivität von Oktopamin

Bei der Analyse der Doppelfärbung des mit der 6.2TβH-GAL4-Linie getriebenen GFP-Musters (grün) und der Oktopamin-Antikörperfärbung (magenta) kann man feststellen, dass fünf Zellen kolokalisieren (Abbildung 27 B-B'', C-C'', weiße Pfeile). Fünf von den ≈70 Neuronen exprimieren somit Oktopamin und GFP. Die Analyse des getriebenen GFP-Musters mittels der 6.2TβH-GAL4-Linie wurde an drei Gehirnen durchgeführt.

Das unpaare Neuron in Abbildung 26 B' (weißer Pfeil) kolokalisiert mit der Färbung des oktopaminergen Expressionsmusters (Abbildung 27 C-C''). Dies unterstützt die Hypothese, dass es sich bei dieser Zelle um ein *Drosophila*-Pendant zu dem von Hammer und Menzel beschriebenen VUMmx1-Neuron handelt. Die andere, weiter anterior gelegene, unpaare Zelle im 6.2TβH Expressionsmuster kolokalisiert hingegen nicht mit der α-Oktopaminfärbung. Somit ist die Wahrscheinlichkeit gering, dass es sich bei diesem Neuron um eines aus der VUM-Familie handelt.

Stattdessen kolokalisieren vier große GFP-positive Zellen caudal mit der oktopaminergen Expression. Diese Zellen tauchen weder bei Verwendung des üblichen immunohistochemischen Protokolls für GFP auf, noch sind sie bisher weder von Sinakevitch und Strausfeld 2006 noch von Monastirioti 1999 beschrieben worden. Dass bei dieser Färbung vier große caudale Zellen zu verzeichnen sind, kann eventuell auf die Art der Fixierung zurückzuführen sein. Es können teilweise mehr oder andere Zellen bei der Durchführung des Protokolls mit Glutharaldehyd-Fixierung als mit Formaldehyd-Fixierung detektiert werden. Jedoch ist die Varianz zwischen den unterschiedlichen Fixierungen nur in wenigen Zellen detektierbar.

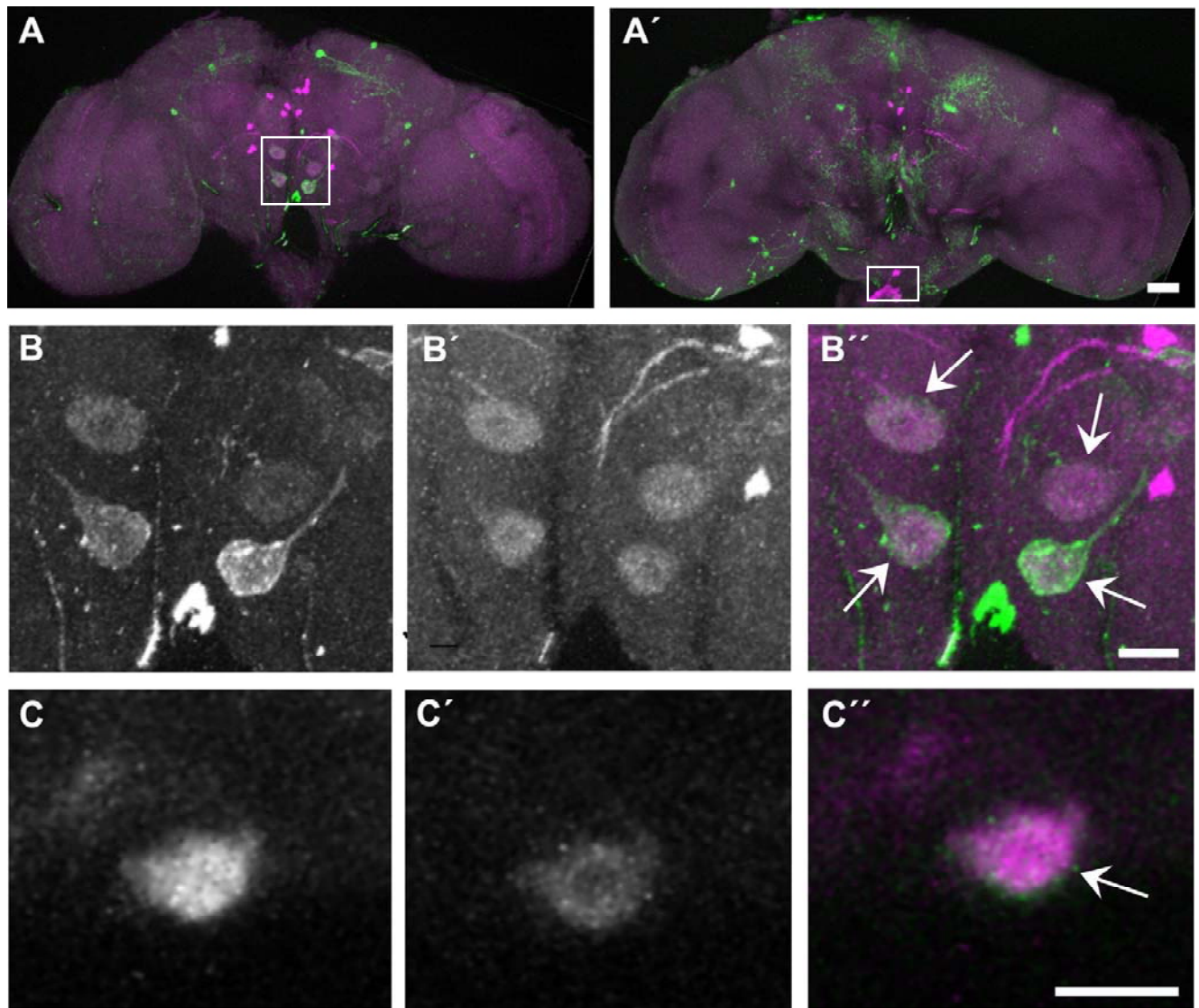


Abbildung 27: Die 6.2*TβH*-GAL4 Linie exprimiert in fünf oktopaminergen Neuronen GFP.

Die Kolokalisationsstudien von Oktopamin und GFP mit 6.2*TβH*-GAL4/*UAS-mCD8-GFP* transgenen Fliegen sind in Abbildung A+A' gezeigt. Vergrößerungsansichten der weißen Kästchen in Abbildung A+A' sind in den Abbildungen B-B'' und C-C'' dargestellt. (B+C) Transgene 6.2*TβH*-GAL4/*UAS-mCD8-GFP* Fliegen zeigen Kolokalisation in fünf GFP-positiven Neuronen (grün) mit Oktopamin (magenta). (B-B'') Caudal sind 4 große eventuell neurosekretorische Zellen zu erkennen, die sowohl oktopaminerg als auch GFP-positiv sind (weiße Pfeile). (C-C'') Die Kolokalisation von GFP und Oktopamin kann in einem VUM-Neuron verzeichnet werden (weißer Pfeil). Die Whole-mount Präparate wurden mit GFP Antikörper (A+A', B+B'', C+C'') und Oktopamin-Antikörper (A+A', B'+B'', C'+C'') gefärbt. Der Größenbalken entspricht in Abbildung (A+A') 50µm und in (B-B'', C-C'') 20µm.

Zusammenfassend ermöglicht die 6.2*TβH*-GAL4 Treiberlinie Transgen-Expression in 65-70 Neuronen. Diese innervieren das SOG, den Ösophagus, den Ellipsoid Körper, das laterale und das

dorso-laterale Protocerebrum. Ein putatives VUM-Neuron und vier große caudale Zellen exprimieren Oktopamin. Demzufolge kolokalisieren fünf von ≈ 70 GFP-positiven Zellen mit Oktopamin exprimierenden Zellen.

3.7.5 Die 6.6 *TβH*-GAL4-Linie exprimiert GFP in acht „TβH“-positiven Zellen, aber in keiner Oktopamin-positiven Zelle.

3.7.5.1 Struktur des 6.6 *TβH*-GAL4 Expressionsmusters

Es wurden 12 P-Element Insertionslinien für das 6.6 *TβH*-GAL4 Promoter-Konstrukt hergestellt. Diese 12 GAL4-Linien wurden auf ihr GFP-Expressionsmuster untersucht. Dabei erhielten wir zwei transformante GAL4-Linien mit sichtbarer GFP-Expression. Beide GFP-Expressionsmuster scheinen identisch zu sein. Die Positionsinformation der P-Element Insertion hat vermutlich in sofern Einfluss auf das Expressionsmuster der GAL4-Linie, was die Stärke der Expression betrifft. Somit kann in nur zwei transformanten GAL4-Linien GFP Expression visualisiert werden. Die Positionsinformation scheint jedoch keinen Einfluss auf die Anzahl der getriebenen Zellen zu haben.

Die folgende Analyse des getriebenen GFP Musters mittels der verwendeten 6.6_1 *TβH*-GAL4-Linie wurde an drei Gehirnen durchgeführt. Abbildung 28 A-C zeigt Projektionen konfokaler Daten als Beispiel des Expressionsmusters der 6.6 *TβH*-GAL4-Linie. Eine grün fuoreszierende Hülle umgibt das Gehirn (Abbildung 28 A+A', weiße Pfeile). Diese ist mit dem Expressionmuster der Line 650 *TβH*-GAL4 vergleichbar. Wie schon bei jener Linie beschrieben nehmen wir auch bei dieser Linie an, dass es sich bei dieser Hülle ebenfalls um die Blut-Hirn-Schranke von *Drosophila* handelt (Daneman and Barres 2005). Zudem wird GFP-Expression in acht Zellen im caudalen Bereich des Gehirns detektiert (Abbildung 28 B; weiße Pfeile). Die primären Neuriten dieser Zellen weisen nach ventral, in Richtung des SOG, der weitere Verlauf dieser Projektionen lässt sich jedoch auch bei einer höheren Vergrößerung nicht verfolgen.

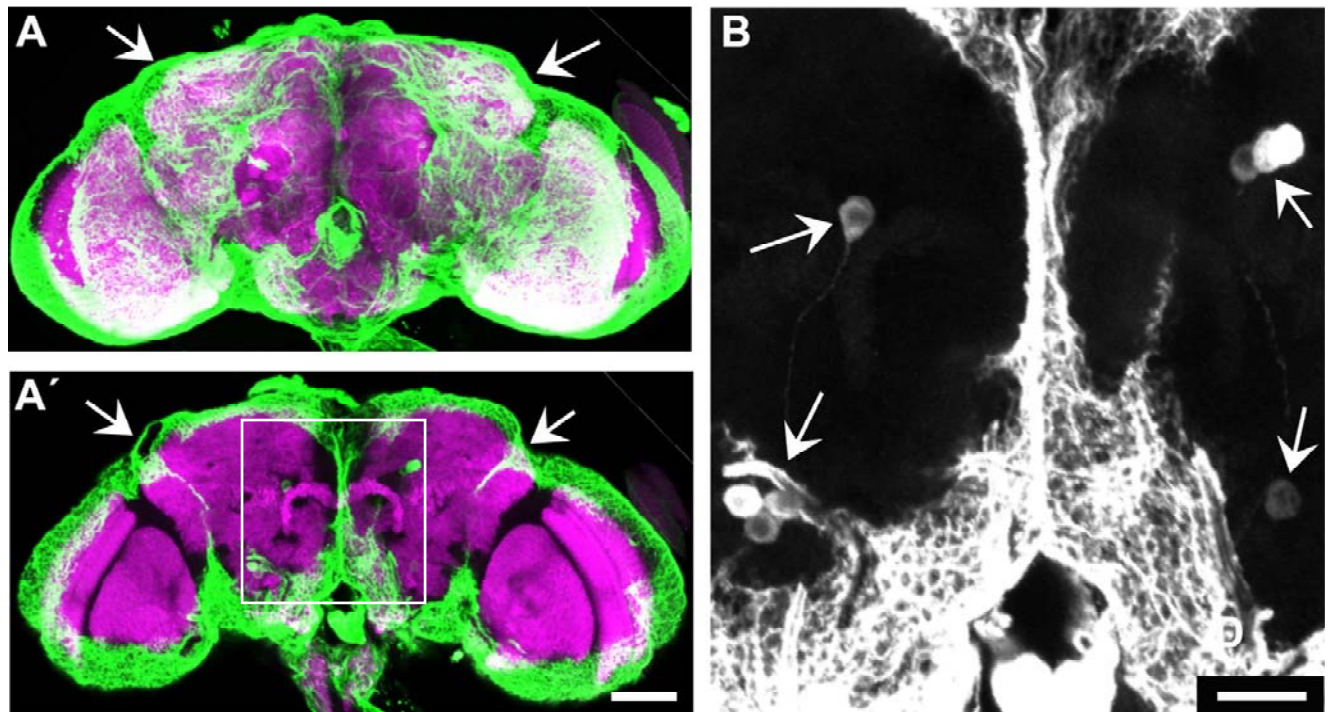


Abbildung 28: GFP- und Synapsin-Expression in adulten Gehirnen von *6.6TβH-GAL4/UAS-mCD8-GFP* Fliegen.

Das Effektor-Konstrukt *UAS-mCD8-GFP* wurde mit der *6.6TβH-GAL4*-Linie getrieben und das Expressionsmuster im ZNS in adulten *Drosophila melanogaster* Männchen untersucht. Konfokale Bilderstapel von (A+A') 70µm Schichten und einer (B) 30µm Schicht sind in dieser Abbildung gezeigt. (A+A') Eine spezifische grün fluoreszierende Schicht (weiße Pfeile) ist um das Gehirn zu erkennen (B) Die Vergrößerung des weißen Kästchens in Abbildung A' stellt Abbildung B dar. Darin ist ein sehr kleines Cluster von acht GFP-positiven Zellen caudal im Zentralgehirn zu detektieren (weiße Pfeile). Die Whole-mount Präparate wurden mit GFP Antikörper (grün) und Synapsin Antikörper (magenta) gefärbt. Der Größenbalken entspricht in (A+A') 50µm und in (B) 20µm.

3.7.5.2 Vergleich des *6.6TβH-GAL4*-Expressionsmusters mit dem von „TβH“

Ferner wurde in dieser Arbeit untersucht, ob die Zellen des *6.6TβH*-Expressionsmusters „TβH“-positiv sind. Mittels Kolokalisationsanalysen konnten die acht oben beschriebenen caudal gelegene Zellen als „TβH“-positiv charakterisiert werden. (Abbildung 29 B-B'', weiße Pfeile). Allerdings exprimiert die grün-fluoreszierende Membran, die das Gehirn umgibt, kein „TβH“ (Abbildung 29 B-B'').

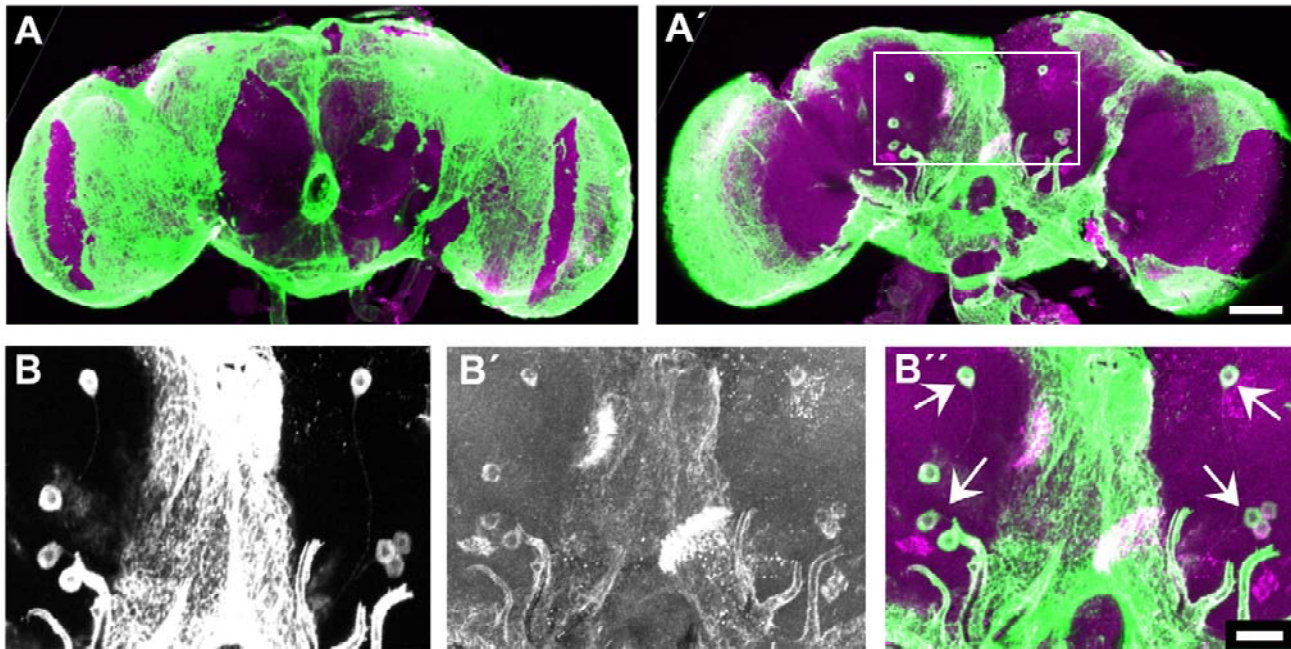


Abbildung 29: Die 6.6*TβH*-GAL4 Linie exprimiert in acht „TβH“-positiven Neuronen GFP.

Kolokalisationsfärbungen an 6.6*TβH*-GAL4/*UAS-mCD8-GFP* Whole-mount-Präparaten von *Drosophila melanogaster* Gehirnen werden dargestellt. Konfokale Bilderstapel von (A+A') 80µm Schichten und (B-B') 20µm sind in dieser Abbildung als Projektion gezeigt. (B-B') Acht caudale Zellen zeigen sowohl Expression von „TβH“ als auch GFP (weiße Pfeile). Die Whole-mount-Präparate wurden mit GFP Antikörper (grün) in den Abbildungen A,A',B,B' und „TβH“-Antiserum (magenta) in den Abbildungen A,A',B',B' gefärbt. Das weiße Kästchen in A' zeigt die vergrößerten Bereiche in B-B'. Der Größenbalken entspricht (A+A') 50µm und (B-B'; C-C') 20µm.

3.7.5.3 Vergleich des 6.6*TβH*-GAL4 Expressionsmusters mit dem von Oktopamin

Darüber hinaus wurden die acht caudalen Zellen in denen die 6.6*TβH* GAL4-Linie exprimiert in einer Kolokalisationsstudie mit Oktopamin analysiert (Abbildung 30 B-B'). Es konnte dabei keine der acht caudalen Zellen mit Oktopamin kolokalisiert werden (Abbildung 30 B-B'). Die das Gehirn umgebende Gliaschicht zeigte bei der Kolokalisationsanalyse ebenfalls keine Überlappung mit Oktopamin (Abbildung 30 B-B').

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass die 6.6*TβH*-GAL4 Treiberlinie Effektorgene in acht Zellkörpern und einer das Gehirn umgebenden Hülle ermöglicht. Diese acht caudal gelegenen Zellen sind „TβH“-positiv, jedoch Oktopamin-negativ.

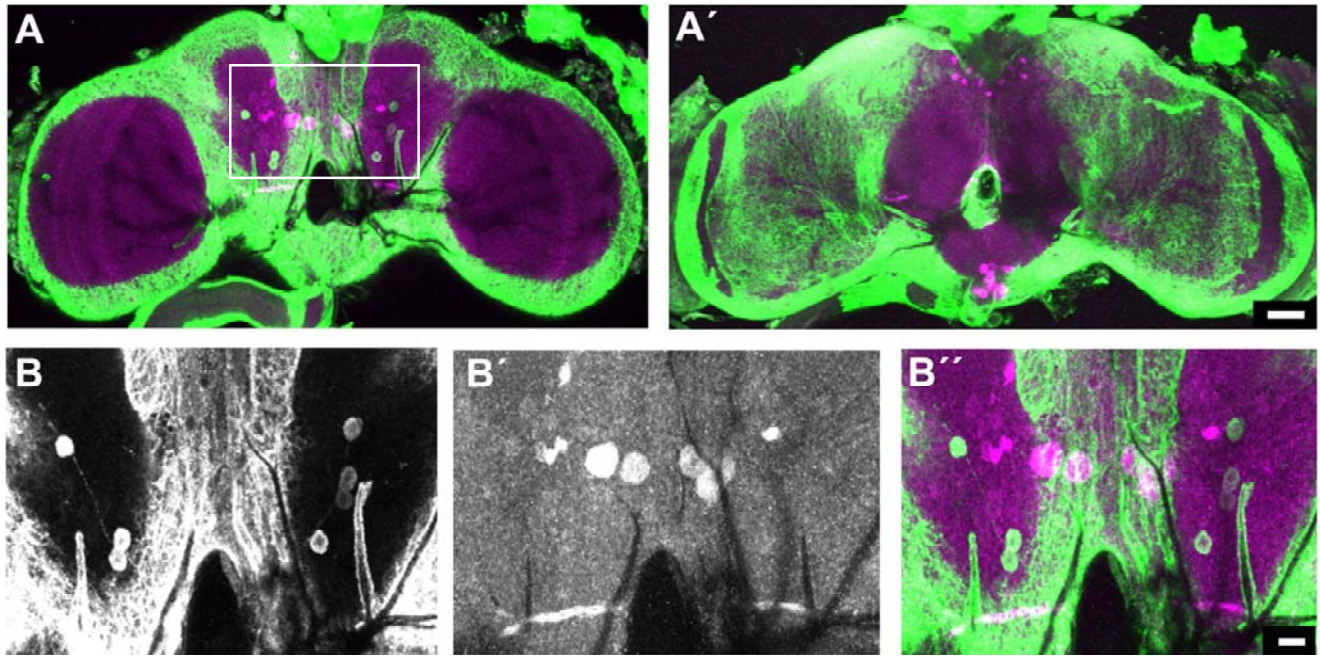


Abbildung 30: Die GFP-Expression der $6.6T\beta H-GAL4/UAS-mCD8-GFP$ Fliegen kolokalisiert nicht mit der Oktopamin-Expression.

Konfokale Bilderstapel von (A+A') 80 μ m Schichten und (B-B'') sind als Projektionsansicht dargestellt. Transgene $6.6T\beta H-GAL4; UAS-mCD8-GFP$ Fliegen zeigen keine Kolokalisation der getriebenen GFP-positiven Neurone (grün) mit Oktopamin (magenta). Die Abbildungen B-B'' stellen die Vergrößerungsansicht des weißen Kästchens in Abbildung A dar. Die Whole-mount Präparate wurden mit GFP Antikörper (A+A', B+B'') und Oktopamin-Antikörper (A+A', B'+B'') gefärbt. Der Größenbalken entspricht in Abbildung (A+A') 50 μ m und in (B-B'') 20 μ m.

3.7.6 Vergleich der GFP-Expressionsmuster aller $T\beta H-GAL4$ -Linien

Mit Hilfe der fünf untersuchten $T\beta H-GAL4$ -Linien lassen sich in sehr spezifischen Gruppen von Neuronen UAS -transgene Gene exprimieren. Da überlappende Promoterelemente verwendet wurden, sollte theoretisch in überlappenden Sätzen von Neuronen GFP exprimiert werden. Zum besseren Überblick sind die Zellen, in denen GFP exprimiert wird, in der Tabelle 3 zusammengefasst.

Tabelle 3: Zellpopulationen der Expressionsmuster verschiedener *TβH*-Promoter GAL4-Linien

Die Anzahl der detektierten Zellen pro Hirnhälfte ist angegeben. Die verwendete Nomenklatur ist in Tabelle 1 erklärt.

	650<i>TβH</i>- GAL4	1.3<i>TβH</i>- GAL4	4.6<i>TβH</i>- GAL4	6.2<i>TβH</i>- GAL4	6.6<i>TβH</i>- GAL4
EB (Ellipsoid Body)			22-26	20	
FB (Fanshaped Body)		2			
VUM (ventral unpaired median) Neuron				1	
PI (Pars intercerebralis)	5		1	5	
AL (Antennal Lobes)			32-36		
SSh (Surrounding Sheath)	+	-	-	-	+
dCSC (Dorsal caudal Small Cells)				20	
CBC (Caudal Big Cells)				2-4	
SOG (Suboesophageal Ganglion)		6-8		7	
CSC (Caudal Small Cells)			8		8

Die 650*TβH*-GAL4-Linie treibt die Expression von GFP in nur fünf Zellen gelegen in der PI. Ebenfalls GFP-exprimierende Neurone in der PI sind im Expressionsmuster der 4.6*TβH*-GAL4-Linie (eine Zelle) und in dem der 6.2*TβH*-GAL4-Linie (fünf Zellen) detektierbar. Es könnte sich dabei um überlappende Zellen handeln. Bei der Kolokalisationsstudie mit „TβH“ wurde in zwei der fünf durch die 650*TβH*-GAL4-Linie getriebenen GFP-positiven Zellen Kolokalisation verzeichnet. Die GFP-positive Zelle in der PI der Linie 4.6*TβH*-GAL4 konnte nicht in der Kolokalisationsstudie zusammen mit der „TβH“ Färbung gefärbt werden, da das GFP-Expressionsmuster unvollständig war. Es scheinen regulatorische Elemente für die spezifische Expression in Zellen des PI, in den verwendeten *TβH*-Sequenzen enthalten zu sein.

Keine der in der PI lokalisierten GFP-positiven Zellen konnte mit Oktopamin kolokalisiert werden. Das publizierte oktopaminerge Expressionsmuster von Sinakevitch und Straußfeld 2006 zeigt jedoch Oktopamin exprimierende G1 Zellen im Bereich des PI auf (Abbildung 17). Es wäre somit möglich, dass die GFP-positiven Zellen der *TβH*-GAL4-Linien in der PI ebenfalls

oktopaminerg sind. Die höhere Anzahl oktopaminerger Zellen in Sinakevitch und Straußfeld 2006 ist vermutlich auf die dort verwendete Färbemethode an Kryostatschnitten zurückzuführen. Gegebenenfalls liegt dieser Unterschied auch in einem anderen Oktopamin-Antikörper begründet, welcher eventuell das gesamte Oktopamin-Expressionsmuster färbt.

Das Expressionsmuster der 1.3*TβH*-GAL4-Linie zeigt keinerlei Überlappung mit den Expressionsmustern der restlichen vier *TβH*-GAL4-Linien. Scheinbar fehlen regulatorische Elemente, um die Expressionsmuster der anderen Linien zu enthalten.

Zellen der Ringneuronencluster sind bei den Expressionsmustern der Linien 4.6*TβH*-GAL4 und 6.2*TβH*-GAL4 gefärbt. Es wurden bei der Expression der 6.2*TβH*-GAL4-Linie wahrscheinlich R1-, R2- und R3- Neurone gefärbt und bei der Expression der 4.6*TβH*-GAL4-Linie R1- und R4- Neurone. Es wäre möglich, dass es sich bei den R1-Neuronen um dieselben Zellen handelt. Das bedeutet, dass die regulatorische Information für die Genexpression in den 4.6 kb und 6.2 kb großen *TβH*-Fragmenten für die R1-Neurone übereinstimmen könnte.

Im Bereich der den Zentralkomplex innervierenden GFP-positiven Neurone konnte keine Kollokalisierungen, weder mit der „TβH“- noch mit der Oktopamin-Expression festgestellt werden. Es kann beim Vergleich der Oktopamin-Expression gezeigt werden, dass das Oktopamin-Expressionsmuster nicht vollständig ist (Abbildung 17;

Tabelle 1). Es ist somit möglich, dass Neurone, die den Zentralkomplex innervieren TβH- und Oktopamin-positiv sind.

Vergleicht man nun die mit dem „TβH“-Expressionsmuster kollokalisierenden caudalen acht Zellen der 4.6*TβH* GAL4-Linie und der 6.6*TβH*-GAL4-Linie, so wäre es möglich, dass es sich dabei um dieselben Zellen handelt. Dies kann aufgrund der relativen Lage und der Tatsache, dass diese Zellen „TβH“-Expression zeigen, geschlossen werden. Allerdings zeigt keine der Zellen Oktopamin-Expression.

Die grün-fluoreszierende Hülle, die das Gehirn der Expressionsmuster der 650*TβH* GAL4 und der 6.6*TβH*-GAL4-Linien umgibt, ist wahrscheinlich identisch. Diese Struktur ist weder „TβH“- noch Oktopamin-positiv. Es wurde solch eine Struktur auch nicht als Oktopamin-positiv publiziert (Sinakevitch and Strausfeld 2006). Auf Grund der Form und Lage dieser Schicht gehen wir davon aus, dass es sich um die Blut-Hirn-Schranke handelt. Das Promoter-Fragment des *TβH*-Gens mit 650 bp Länge scheint dieselbe regulatorische Information für die Blut-Hirn-Schranke zu enthalten, wie das 6.6kb große Fragment. Die Linien 1.3*TβH*-GAL4, 4.6*TβH*-GAL4 und 6.2 *TβH*-GAL4 zeigen hingegen keine Expression von GAL4 in der das Gehirn umgebenden Gliaschicht. Möglicherweise sind in den für diese Linien verwendeten Sequenzen Repressoren für diese Zellen enthalten.

Ein ventral des SOGs gelegenes VUM Neuron kann in dem Expressionsmuster der Linie 6.2*TβH*-GAL4 detektiert werden. Diese Zelle zeigt GFP- und Oktopamin-Expression, jedoch keine „TβH“-Expression.

Die 6.2*TβH*-GAL4-Linie treibt zudem die Expression des *UAS-mCD8-GFP* Transgens in großen Zellen caudal im Gehirn. Bei Kolokalisationsanalysen dieser GFP-positiven Zellen mit Oktopamin, zeigen diese Kolokalisation. Jedoch wurde die Kolokalisationsanalyse nicht mit „TβH“ durchgeführt. Somit ist nicht klar, ob diese Zellen zudem auch mit „TβH“ kolokalisieren.

Aus dem Vergleich der verschiedenen *TβH*-GAL4-Linien kann man schlussfolgern, dass demnach die für die jeweiligen GAL4-Konstrukte verwendeten *TβH*-Fragmente partiell gleiche Informationen für die Regulation der Genexpression enthalten.

3.7.7 Die NP938 GAL4-Linie exprimiert in „TβH“-positiven Zellen und in oktopaminergen Zellen GFP.

3.7.7.1 Struktur des NP938 GAL4-Expressionsmusters

Die NP938-GAL4-Linie ist eine *TβH*-Enhancer Trap Linie (Datenbank des NP Konsortiums). Das P-Element der GAL4-Insertionslinie ist ca. 0,5 kb upstream des ersten Exons des *TβH*-Gens inseriert (<http://flybase.bio.indiana.edu/reports/FBgn0010329.html>). Enhancer-Elemente upstream bzw. downstream des *TβH*-Gens aktivieren wahrscheinlich die Transkription des GAL4-Gens im Enhancer Trap P-Element. Auf diese Weise kann die Expression des GAL4-Proteins eventuell in spezifischen TβH-positiven Zellen getrieben werden. Es wurden 10 Gehirne von NP938-GAL4/*UAS-mCD8-GFP* Fliegen in 1µm Schnitten mit einem konfokalen Mikroskop gescannt und analysiert. Die NP938-GAL4-Linie treibt die GFP-Expression des *UAS*-Reporterkonstruktes in einer großen Anzahl von Zellen caudal, anterior, ventral, dorsal und lateral vor den optischen Loben. Die genaue Anzahl der GFP-positiven Zellen kann nicht bestimmt werden, da sie zu hoch ist, wie man in Abbildung 31 erkennen kann. Es sind wahrscheinlich mehrere hundert Zellen GFP-positiv. Als stark innervierte Areale sind die optischen Loben (Abbildung 31 A', grüne Pfeile), das SOG (Abbildung 31 A'', rote Pfeile) und das laterale Protocerebrum (Abbildung 31 A', blaue Pfeile) zu verzeichnen. Jedoch ist die Anzahl der in diese Bereiche projizierenden Neurone nicht nachzuverfolgen. Es projizieren ≈10 laterale Zellen beidseitig in den Ellipsoid Körper (Abbildung 31 A'', gelbe Pfeile). Diese können bei Vergleich ihrer relativen Lage in die Ringneurone der R1-, R2- und R3- Gruppen eingeordnet werden (Renn et al. 1999). Ventral gelegene Zellkörper (≈22-26 Abbildung 31 A'-A'', orangene Pfeile) sind in dem Bereich lokalisiert, in dem oktopaminerge VUM-Neurone beschrieben wurden (Sinakevitch and Strausfeld 2006). Über den Antennalloben können beidseitig große Cluster von jeweils mindestens 30 Zellen detektiert werden (Abbildung 31 A''', grüne Pfeile). Diese und alle weiteren GFP exprimierenden Zellen sind nicht den publizierten oktopaminergen Clustern zu zuordnen.

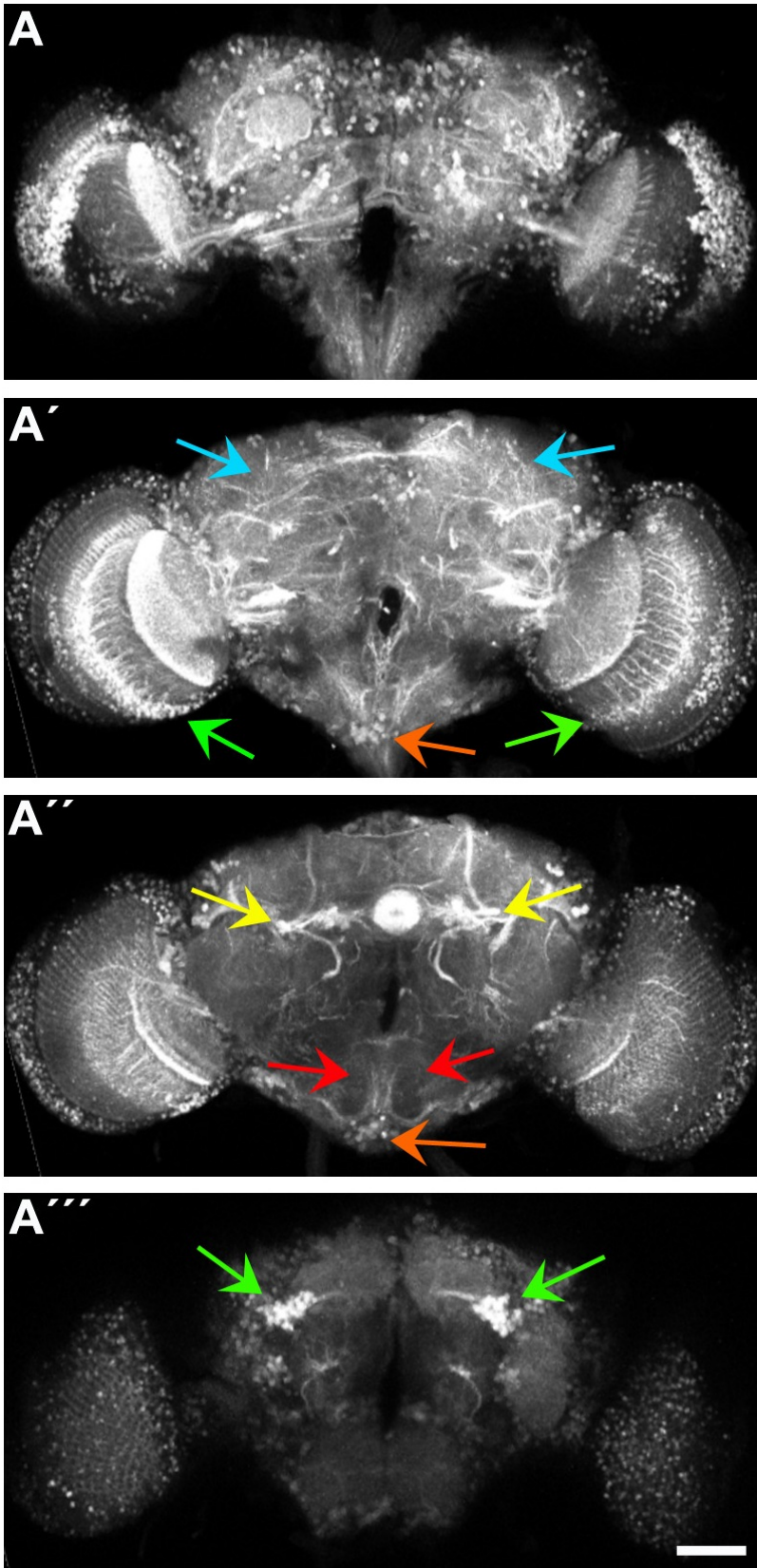


Abbildung 31: GFP-Expression in adulten Gehirnen von NP938-GAL4;UAS-mCD8-GFP Fliegen.

Die Projektionsansichten des Gehirns sind in Form von 45µm dicken konfokalen Schichten dargestellt (A-A'''). (A) Caudal ist eine sehr große Anzahl an Zellen gefärbt. (A') Das dorso-laterale Protocerebrum (blaue Pfeile), die optischen Loben (grüne Pfeile) und VUM Neurone (orangener Pfeil) sind GFP-positiv. (A'') Zudem sind Neurone, die den Ellipsoid Körper innervieren gefärbt (gelbe Pfeile). (A''') Beidseitig im Gehirn ist ein Cluster dorsal der Antennalloben GFP-positiv (grüne Pfeile). Die Whole-mount Präparate wurden mit GFP Antikörper (grün) und Synapsin Antikörper (magenta) gefärbt.

3.7.7.2 Vergleich des Expressionsmusters von NP938 mit dem von „TβH“

Anschließend wurde untersucht, ob die GFP-positiven Zellen der Linie NP938 auch „TβH“ exprimieren (Abbildung 32 A-D). Im caudalen Bereich exprimieren zwei große Zellen des Gehirns GFP und „TβH“. (Abbildung 32 C-C'', weiße Pfeile,). Diese Zellen könnten neurosekretorischer Art sein, aufgrund ihrer Größe und Form. In den restlichen Zellen wird nur GFP exprimiert und es gibt zudem Zellen, die „TβH“-positiv sind, jedoch GFP-negativ.

Der Fächerförmige Körper ist sowohl von GFP-positiven als auch „TβH“-positiven Aborisationen innerviert (Abbildung 32 B-B''). Die Innervationen kolokalisieren jedoch nicht miteinander. Ein GFP-positives Neuron im Bereich der VUM Neuronencluster konnte ebenfalls nicht mit „TβH“-positiven Zellen in Kolokalisation gebracht werden (Abbildung 32 D-D''). Dieses VUM Neuron weist jedoch Oktopamin-Expression auf (Abbildung 33 C-C'', weiße Pfeile). Die Kolokalisation des getriebenen GFP-Musters mittels der NP938-GAL4-Linie mit der „TβH“-Expression wurde an drei Gehirnen durchgeführt.

3.7.7.3 Vergleich des Expressionsmusters von NP938 mit dem von Oktopamin

Analysiert man nun adulte Gehirne von NP938-GAL4;*UAS-mCD8-GFP* Fliegen, so weisen diese Überlappungen der GFP-Expression mit ≈16 Oktopamin-positiven Zellen auf. Von den mit Oktopamin kolokalisierenden GFP-positiven Zellen können acht dem VUM Cluster (weiße Pfeile) und acht dem G3a Cluster (rote Pfeile) zugeordnet werden (Abbildung 33 C-C''). Die VUM Neurone sind dabei ventral des SOG lokalisiert und die G3a Zellen anterior im Gehirn. Jedoch, wie in

Tabelle 1 gezeigt, ist das oktopaminerge Expressionsmuster nicht vollständig. In Abbildung 33 A-A'' und B-B'' sind 60 konfokale Schnitte eines NP938-GAL4; *UAS-mCD8-GFP* Fliegengehirns jeweils zu 60µm dicken Schichten zusammengefasst. Dagegen die Darstellungen in C-C'' und D-D'' stellen 20µm dicke Schichten dar. Drei Gehirne wurden für die Kolokalisationsanalyse verwendet.

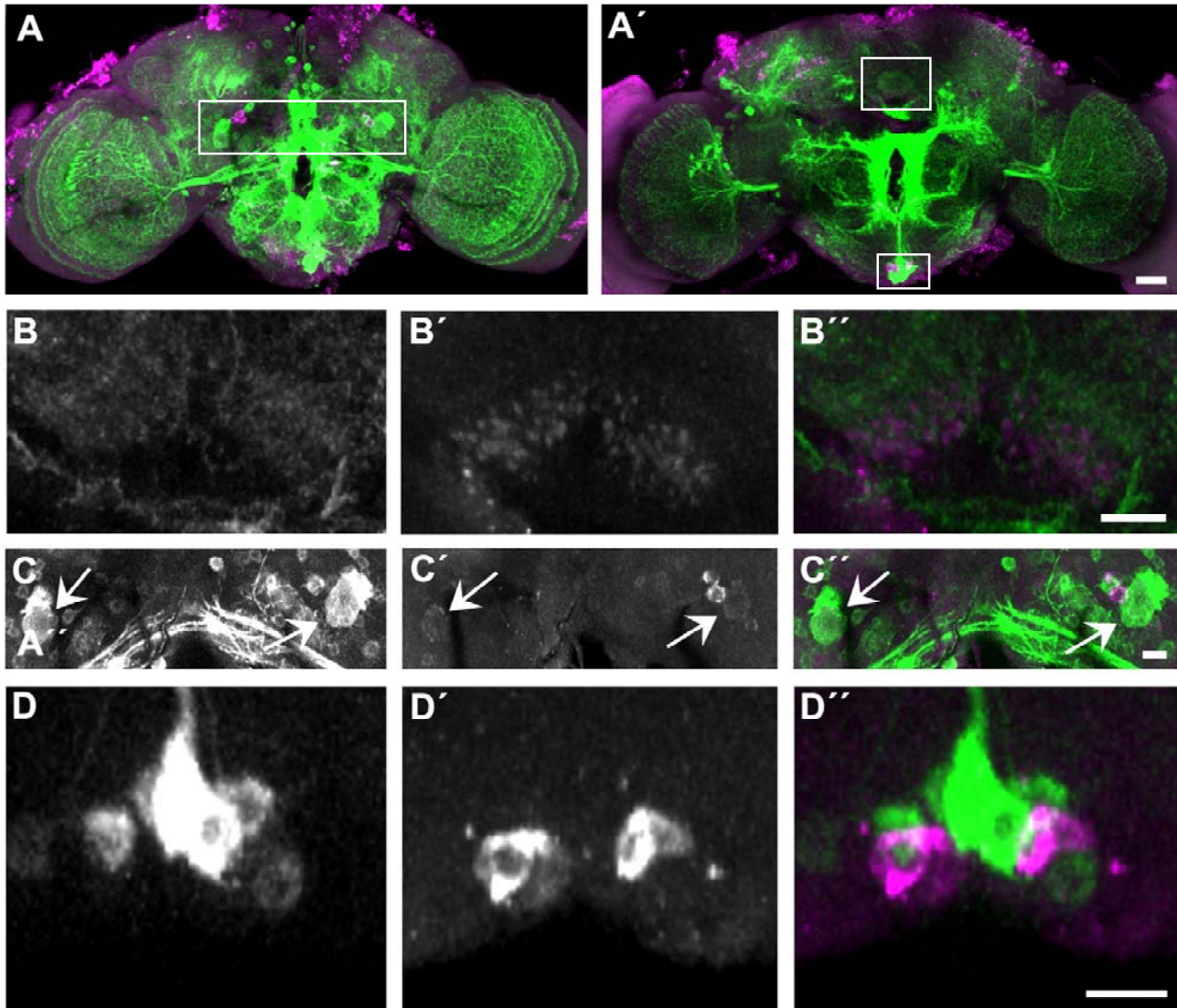


Abbildung 32: Die NP938-GAL4 Linie exprimiert in wenigen „TβH“-positiven Neuronen GFP.

Es sind Konfokale Bilderstapel von (A+A') 80µm Schichten und (B-B'',C-C'',D-D'') 20µm Schichten als Projektionsansicht dargestellt. Vergrößerungsansichten der weißen Kästchen in Abbildung A+A' sind in den Abbildungen B-B'',C-C'' und D-D'' gezeigt. (B-B'') GFP-positive Innervationen des Fächerförmigen Körpers weisen keine Kolokalisation mit der „TβH“-Expression auf. (C-C'') Transgene NP938-GAL4;UAS-*mCD8-GFP* Fliegen zeigen caudal Kolokalisation mit „TβH“ in zwei großen GFP-positiven Zellen (weiße Pfeile). (D-D'') „TβH“-positive Zellen im ventralen Bereich des Gehirns kolokalisieren nicht mit GFP-positiven Zellen. Die Whole-mount-Präparate wurden mit GFP Antikörper (grün) in den Abbildungen A, A',B, B',C und C'', und „TβH“-Antiserum (magenta) in den Abbildungen A, A', B, B',C' und C'' gefärbt. Die weißen Kästchen in A+A' repräsentieren die vergrößerten Bereiche in B- B'' und C- C''. Der Größenbalken entspricht (A+A') 50µm und (B-B'' ; C-C'') 20µm.

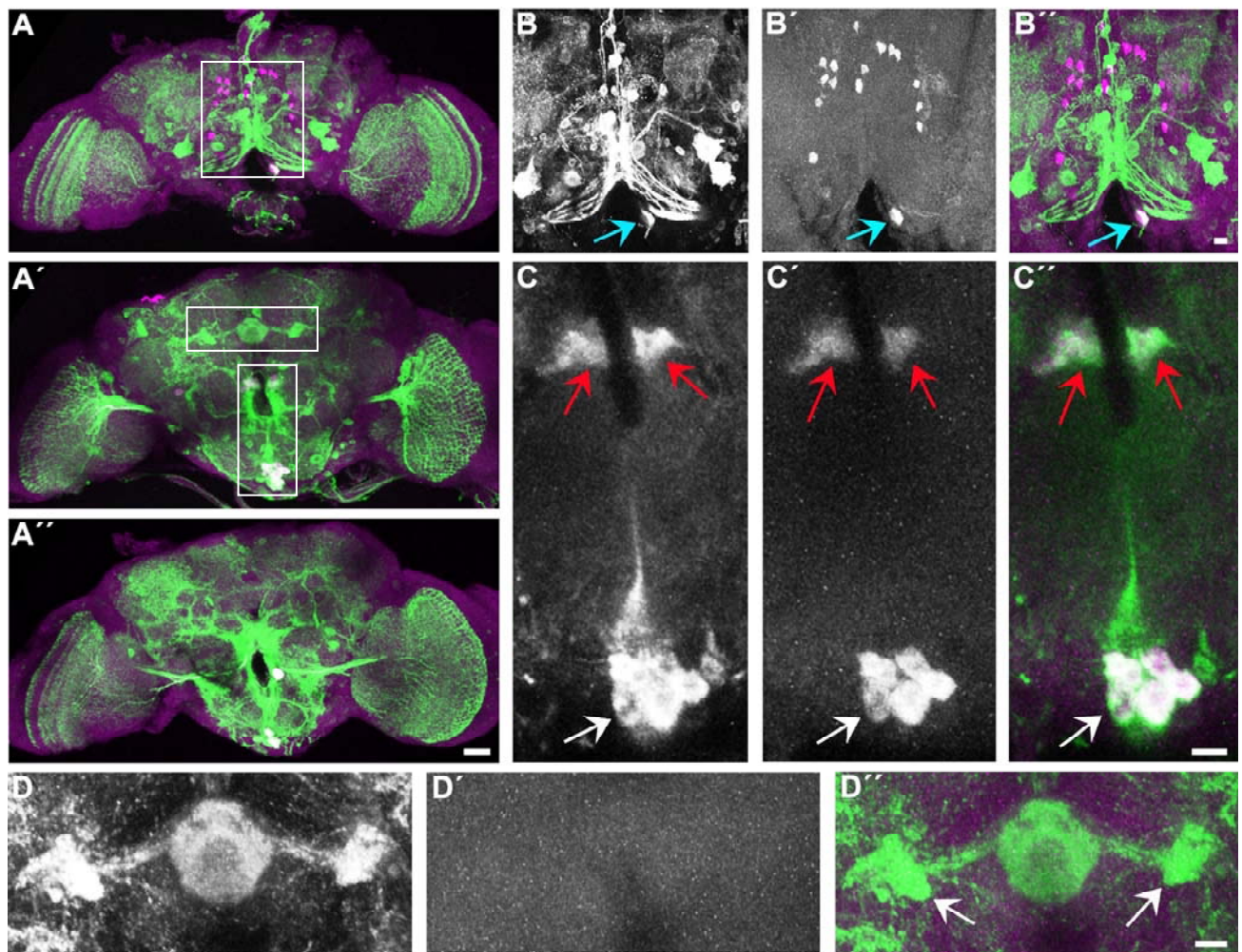


Abbildung 33: Die NP938-GAL4 Treiberlinie exprimiert in ≈ 16 oktopaminergen Neuronen GFP.

Die Kolokalisationsstudien von Oktopamin und GFP mit NP938-GAL4; *UAS-mCD8-GFP* transgenen Fliegen sind in Abbildung A-A'' dargestellt. Vergrößerungsansichten der weißen Kästchen in Abbildung A+A' sind in den Abbildungen B-B'', C-C'' und D-D'' gezeigt. (B''+C'') Transgene NP938-GAL4; *UAS-mCD8-GFP* Fliegen zeigen Kolokalisation in ≈ 16 GFP-positiven Neuronen (grün) mit Oktopamin (magenta). (B-B'') Caudal ist eine Zelle zu erkennen, die sowohl oktopaminerg als auch GFP-positiv ist und zu dem G3a Cluster gehört (blaue Pfeile). (C-C'') Die Kolokalisation von GFP und Oktopamin kann in ≈ 8 Zellen des VUM-Clusters verzeichnet werden (weißer Pfeil). Ebenfalls ≈ 8 GFP und Oktopamin exprimierende Zellen sind ventral der Antennalloben zu erkennen im G3a Cluster (rote Pfeile). (D-D'') Zellkörper, die in den Ellipsoid Körper projizieren kolokalisieren nicht mit der Oktopamin-Expression. Die Whole-mount-Präparate wurden mit GFP Antikörper (A-A'', B+B'', C+C'') und Oktopamin-Antikörper (A-A'', B'+B'', C'+C'') gefärbt. Der Größenbalken entspricht in Abbildung (A-A'') 50 μ m und in (B-B'', C-C'') 20 μ m.

Zusammenfassend ermöglicht die NP938-GAL4 Treiberlinie die Expression von Transgenen in einer unbestimmten Zahl von Neuronen. Diese innervieren die optischen Loben, das SOG, den Ösophagus, den Ellipsoid Körper, das laterale und das dorso-laterale Protocerebrum und Teile des Pilzkörpers. Etwa acht VUM-Neurone und acht G3a Zellen exprimieren zudem Oktopamin. Demzufolge kolokalisieren ≈ 16 der GFP-positiven Zellen mit Oktopamin exprimierenden Zellen. Zudem exprimieren zwei der caudal lokalisierten GFP-positiven Neurone „T β H“, die jedoch Oktopamin-negativ sind.

3.7.8 Das GFP-Expressionsmuster von *Tdc2-GAL4*; *UAS-mCD8-GFP* Fliegen kolokalisiert mit oktopaminergen Zellen, aber mit keiner „T β H“-positiven Zelle.

Die Tyrosin-Decarboxylase (Tdc) ist das Enzym, welches die Synthese des Oktopamin-Vorläufers Tyramin aus Tyrosin katalysiert. Aus der Promoterregion des *Tdc* Gens wurde die somit putativ oktopaminerge *Tdc2-GAL4* Treiberlinie, mit Insertion auf dem 2.Chromosom hergestellt (COLE et al. 2005). Mit dieser soll die Expression von *UAS*-Transgenen in oktopaminergen Neuronen getrieben werden, um oktopaminerge Gehirnareale zu identifizieren, die eine Rolle im ethanolinduzierten Verhalten spielen. Neuroanatomische Studien sollten Aufschluss geben über die Gehirnareale, welche durch *Tdc2-GAL4* exprimierende Neurone innerviert werden.

3.7.8.1 Struktur des Expressionsmusters von *Tdc2-GAL4*

In Abbildung 34 ist deutlich zu erkennen, dass die *Tdc2-GAL4/UAS-mCD8-GFP* Fliegen GFP-Expression in nahezu allen Bereichen des Gehirns verzeichnen. Die gesamte Anzahl an GFP-positiven Neuronen, beträgt dabei nur ≈ 120 Zellen. ((BUSCH 2006); Abbildung 34 A-A''''').

Ventral des SOGs befinden sich entlang der Mittellinie die VUM Zellcluster. Diese bestehen insgesamt aus etwa 26 Zellen (Abbildung 34 A-A''''', blauer Pfeil). Die relative Lage der Zellkörper lässt dabei vermuten, dass es sich um VUM Neurone handelt. Weitere 12 Zellkörper sind am anterioren Rand der Antennalloben (AL) zu erkennen. Demzufolge könnten diese

Zellen in das G3a-Zellcluster der Sinakevitch und Straußfeld 2006 Nomenkatur gehören (Abbildung 34 A''''', grüne Pfeile). Ventral des ventro-lateralen Protocerebrums sind zwei Zellen lokalisiert, die dem oktopaminergen G5a Cluster von Straußfeld zugeordnet werden könnten (Abbildung 34 A''''', gelbe Pfeile).

Ferner können beidseitig acht Zellen dorsal anterior im Gehirn detektiert werden. Diese sind im Bereich des superior medialen Protocerebrums zu finden (Abbildung 34 A''''', rote Pfeile). Zugeordnet werden können diese Neurone allerdings keinem bekannten Zellcluster. Caudal im Gehirn ist eine große Anzahl an Zellen lokalisierbar (Abbildung 34 A, gelbe Pfeile). Dieses Zellcluster besteht aus ≈ 60 Zellkörpern, die relativ klein sind. Etwa 18 dieser Zellen könnten mit den G4a/b Neuronen der Abbildung 17 übereinstimmen. Zusätzlich wäre es möglich, dass weitere 4-5 Zellen im Bereich des PI dem G1 Neuronencluster angehören können (Abbildung 34 A'+A'', grüne Pfeile).

Wie erwähnt, sind die Gehirne von *Tdc2-GAL4/UAS-mCD8-GFP* Fliegen in nahezu allen Bereichen mit GFP-positiven Projektionen von Neuronen innerviert. Aufgrund der dichten Innervationen und Überlappungen der Projektionen, können die Projektionsmuster einzelner Zellen nicht verfolgt werden. Demzufolge kann nur eine Aussage über das gesamte GFP-Expressionsmuster von ≈ 120 Zellen der GAL4-Linie getroffen werden. Sehr auffällig ist die starke Expression von GFP in Neuronen, welche die optischen Loben innervieren. Es können Aborisationen in der Medulla, der Lobula und der Lobula Platte festgestellt werden (Abbildung 34 A-A'' orangene Pfeile). Der Zentralkomplex ist teilweise gefärbt. Es sind Innervationen von GFP-positiven Neuronen im Fächerförmigen Körper (FB) und in der Protocerebralen Brücke (PB) detektierbar, jedoch nicht im Ellipsoidkörper (EB). Desweiteren zeigen die Antennalloben, das SOG, der Ösophagus, das Protocerebrum, sowie das laterale Horn GFP-positive Innervationen (Abbildung 34 A-A'''''). Zudem kommen GFP-positive Verzweigungen in Arealen des Pilzkörpers, wie in den Calyces und dem Sporn des γ -Lobus.

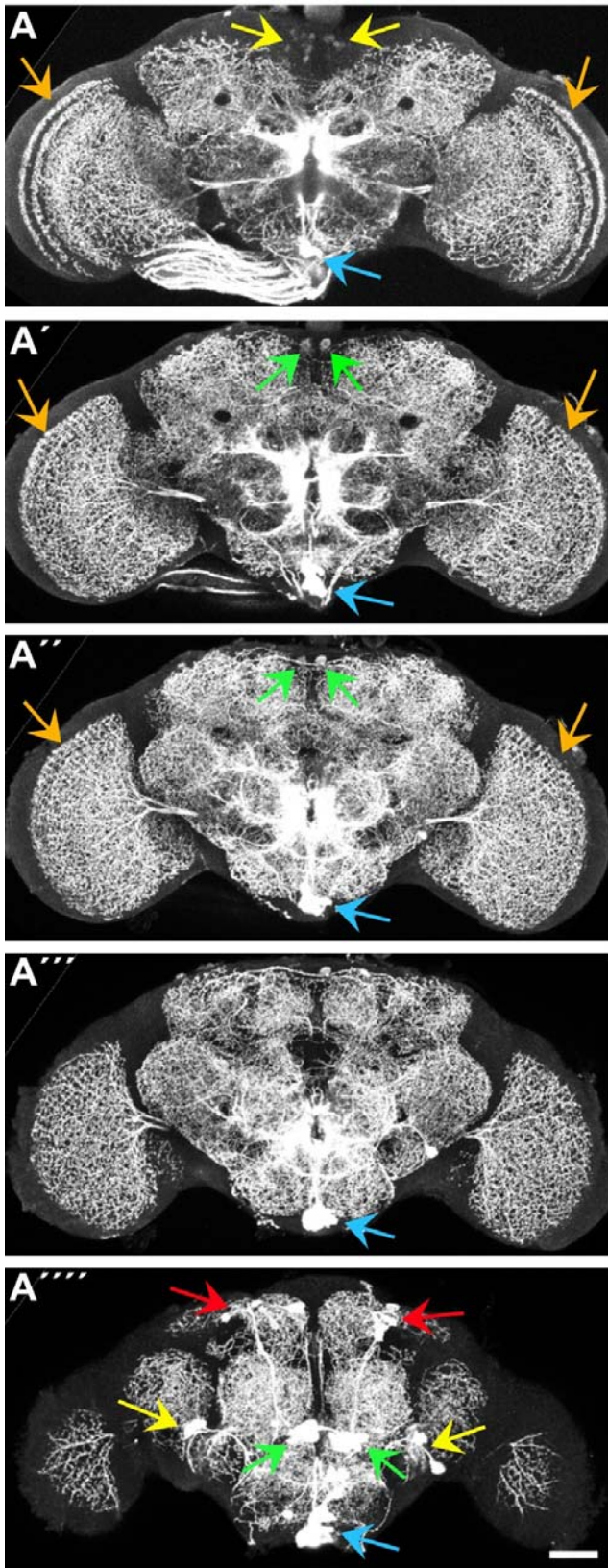


Abbildung 34: Die GAL4-Expression der *Tdc2*-GAL4 Linie wurde mit Hilfe eines *UAS-mCD8-GFP* Effektorgens und anschließender Antikörper Färbung sichtbar gemacht.

Das Effektor-Konstrukt *UAS-mCD8-GFP* wurde mit der *Tdc2*-GAL4-Linie getrieben und das Expressionsmuster im ZNS in adulten *Drosophila melanogaster* untersucht. (A-A''') Konfokale Bilderstapel von 35µm Schichten sind in dieser Abbildung als Projektionsansicht gezeigt. (A-A'') Die optischen Loben zeigen starke Innervationen (orangene Pfeile). (A-A''') Im Bereich der VUM Cluster sind 26 Zellen GFP-positiv (blauer Pfeil). (A'+A'') Sich im PI befindliche 4 Zellen sind mit grünen Pfeilen markiert. (A) Weiter werden kleine Zellkörper caudal detektiert (gelbe Pfeile). (A''') Jeweils 8 Zellen beidseitig im Gehirn sind dorsal im anterioren Bereich lokalisiert (rote Pfeile). Insgesamt werden etwa 120 Zellen gefärbt. Zudem zeigen beidseitig sechs Zellen ventral der Antennalloben GFP-Expression (grüne Pfeile). Zwei Cluster ventral des lateralen Protocerebrums sind ebenfalls GFP-positiv (gelbe Pfeile). Die Whole-mount-Präparate wurden mit GFP Antikörper gefärbt. Der Größenbalken ist equivalent zu 50µm.

3.7.8.2 Vergleich des *Tdc2*-GAL4 Expressionsmusters mit dem von „TβH“

Ferner wurde untersucht, ob und wie weit die GFP exprimierenden *Tdc2* getriebenen Zellen zudem ebenfalls „TβH“ exprimieren. Es konnten jedoch keine Zellen detektiert werden mit sowohl GFP als auch „TβH“-Expression (Abbildung 35).

Der Fächerförmige Körper zeigt Innervationen von GFP-positiven als auch „TβH“-positiven Projektionen (Abbildung 35 C-C', weißer Pfeil). Allerdings kolokalisieren diese Aborisationen nicht miteinander. Dies bedeutet, dass die Projektionen entweder GFP oder „TβH“ exprimieren.

Ventral, im Bereich der VUM Cluster sind „TβH“-positive Zellen lokalisiert (Abbildung 35 D'). Diese kolokalisieren jedoch nicht mit GFP exprimierenden Neuronen, die sich ebenfalls im Bereich des SOGs befinden (Abbildung 35 D'').

Beim Vergleich des GFP-Expressionsmusters in Abbildung 34 mit dem in Abbildung 35, können etwa 60 GFP-positve Zellen weniger detektiert werden. Es wurde für die Färbung der Abbildung 35 ein GFP Antikörper verwendet, der in der Maus hergestellt wurde, im Gegensatz zu dem GFP Antikörper, der in Abbildung 34 verwendet wurde, welcher im Kaninchen generiert wurde. Der Kaninchen GFP Antikörper zeigt ein deutlicheres Signal als der Maus GFP Antikörper.

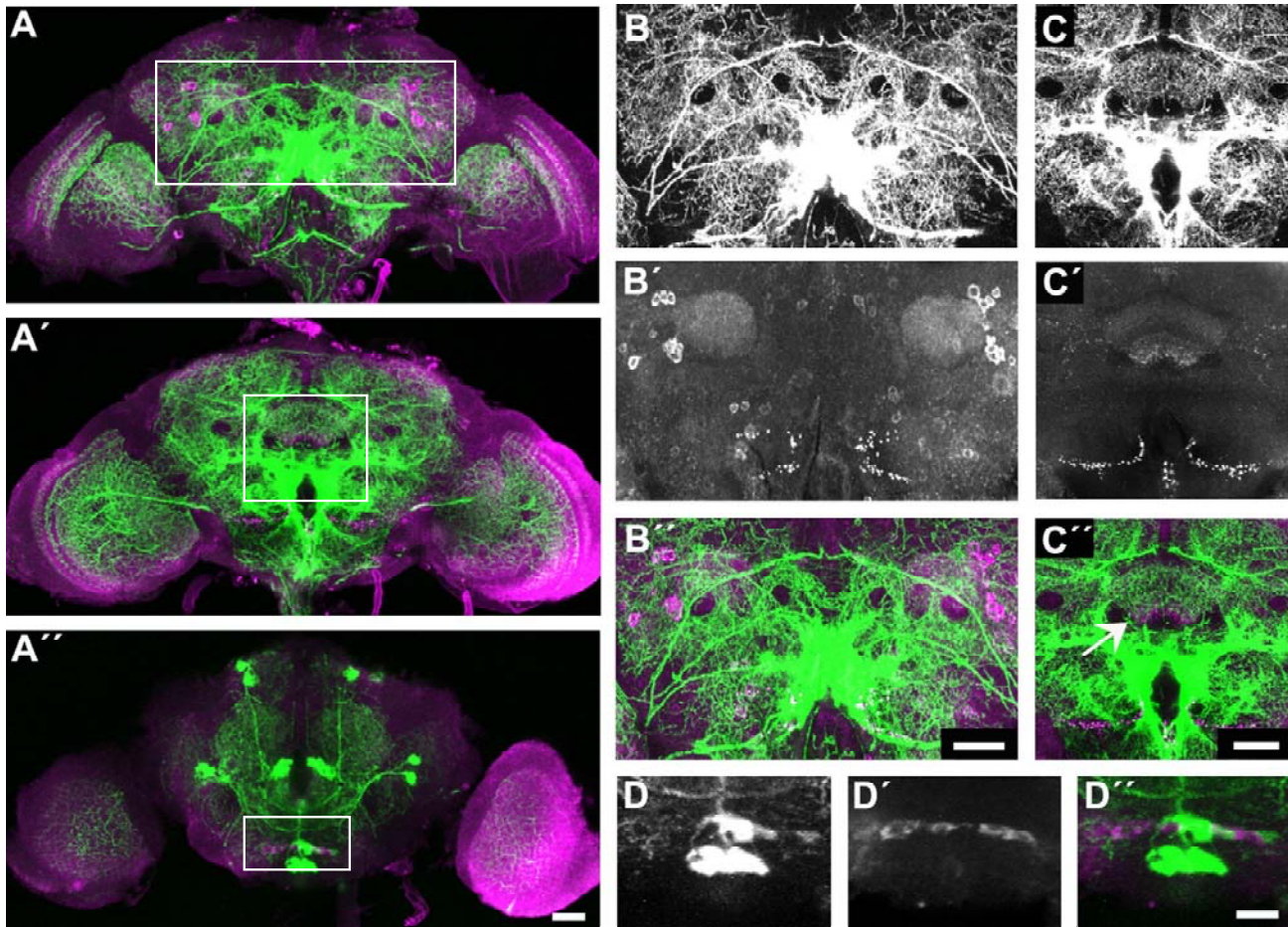


Abbildung 35: Die GFP-Expression der *Tdc2-GAL4/UAS-mCD8-GFP* Fliegen kolokalisiert nicht mit der „TβH“ Expression.

Konfokale Bilderstapel von 60µm Schichten sind als Projektion dargestellt. (B' '-D' ') Transgene *Tdc2-GAL4/UAS-mCD8-GFP* Fliegen zeigen keine Kolokalisation zwischen den durch die GAL4-Linie getriebenen GFP exprimierenden Neuronen (grün) und dem „TβH“-Expressionsmuster (magenta). (B-B' ') Caudal gefärbte „TβH“-positive Zellen kolokalisieren nicht mit GFP-positiven Zellen. (C-C' ') Ebenfalls keine Kolokalisation ist im Bereich des Fächerförmigen Körpers zu sehen. (D-D' ') Anteriore ventral gelegene Zellcluster mit GFP Färbung exprimieren kein „TβH“. (A-A' ') Vergrößerungsansichten der weißen Kästchen sind in den Abbildungen B-D dargestellt. Die Whole-mount Präparate wurden mit GFP Antikörper (A-A' ', B+B' ', C+C' ', D+D' ') und „TβH“-Antiserum (A-A' ', B'+B' ', C'+C' ', D'+D' ') gefärbt. Der Größenbalken in (A-A' ') entspricht 50µm und in (B-B' ', C-C' ', D-D' ') 20µm.

3.7.8.3

Vergleich des *Tdc2-GAL4* Expressionsmusters mit dem von Oktopamin

Bei der Analyse der Gehirne von *Tdc2-GAL4/UAS-mCD8-GFP* Fliegen werden Überlappungen der GFP-Expression mit der Oktopamin-Immunoreaktivität in ≈ 34 Zellen festgestellt (Abbildung 36 A-D). Es können 26 der kolocalisierenden Neurone dem VUM Cluster (C-C'', D-D'' gelbe Pfeile) und acht dem G3a Cluster (D-D'' weiße Pfeile) zugeordnet werden (Abbildung 36). Weiterhin könnten ≈ 18 GFP-positive Neurone der G4a/b Cluster, zwei der G5a Cluster und vier des G1 Clusters mit der Sinakevitch und Straußfeld 2006 Oktopamin-Expression kolocalisieren, wenn man die relative Lage der Zellen vergleicht. Eine direkte immunohistochemische Kolokalisation dieser Zellen war jedoch auf Grund der sehr unterschiedlichen Färbeprotokolle für Oktopamin und GFP nicht zu erreichen. Dies mag erklären, warum sowohl das oktopaminerge als auch das GFP-Expressionsmuster nicht vollständig gefärbt sind. Aufgrund dessen sollte die Kolokalisationsstudie wiederholt und optimiert werden.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass die *Tdc2-GAL4* Treiberlinie ein sehr weitreichendes Expressionsmuster hat. Nahezu alle Bereiche des Gehirns werden von den GFP-positiven Neuronen innerviert. Diese Projektionen resultieren aus den Fortsätzen von ≈ 120 Zellkörpern. Mit dem „T β H“-Expressionsmuster können vorerst aufgrund der suboptimalen Intensität der GFP-Färbung keine GFP-positiven Zellen kolocalisiert werden. Jedoch bei den Kolokalisationsstudien der durch die *Tdc2-GAL4* getriebenen GFP-Expression mit dem Oktopamin-Expressionsmuster, konnten Überlappungen von mindestens 34 Zellen detektiert werden. Die meisten der mit Oktopamin überlappenden Zellen (26) sind dem VUM-Cluster zugehörig.

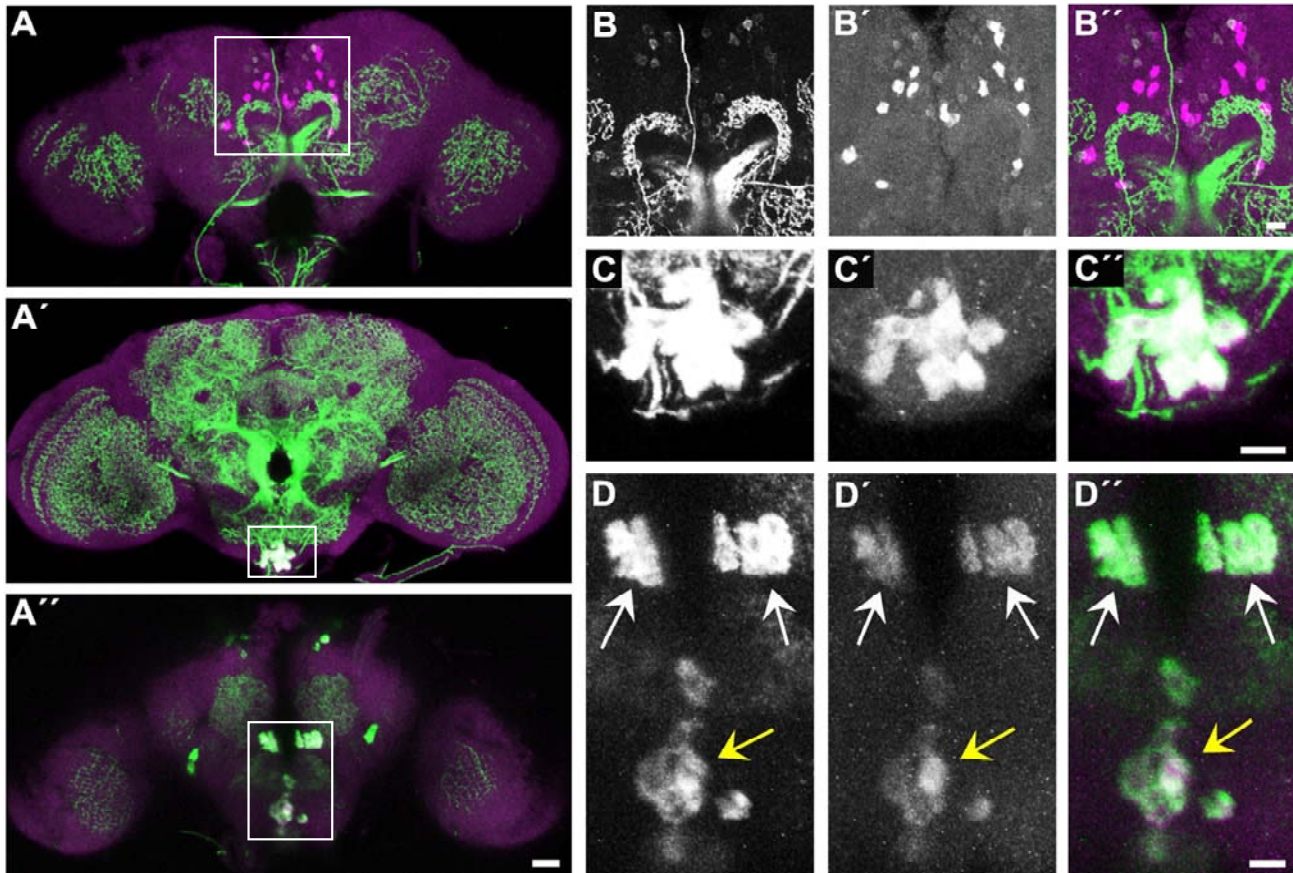


Abbildung 36: Die *Tdc2*-GAL4 Linie exprimiert in mindestens ≈ 34 oktopaminergen Neuronen GFP.

Konfokale Bilderstapel von (A-A'') 60µm und (B-B'', C-C'', D-D'') 30µm dicken Schichten sind in dieser Abbildung als Projektionsansicht dargestellt. Transgene *Tdc2*-GAL4/*UAS-mCD8-GFP* Fliegen zeigen Kolokalisation zwischen GFP exprimierenden Zellen und Zellen mit Oktopamin Immunoreaktivität (A'+A'', C-C'', D-D''). (C-C'', D-D'') Ventral des SOGs sind ≈ 25 VUM-Neurone zu erkennen, die sowohl oktopaminerg als auch GFP-positiv sind (gelbe Pfeile). (D-D'') Beidseitig frontal im Gehirn kolokalisieren sechs GFP-positive Zellen mit der Oktopamin-Färbung. (B-B'') Es können caudal keine zwischen GFP und Oktopamin kolokalisierenden Zellen detektiert werden. Vergrößerungsansichten der weißen Kästchen in A-A'' sind in B-D dargestellt. Die Whole-mount Präparate wurden mit GFP Antikörper (A-A'', B+B'', C+C'', D+D'') (grün) und Oktopamin-Antikörper (A-A'', B'+B'', C'+C'', D'+D'') (magenta) gefärbt. Der Größenbalken ist equivalent zu (A-A'') 50µm und (B-B'', C-C'', D-D'') 20µm.

3.8 Einfluss von putativen T β H-positiven Neuronen auf die Entwicklung von Ethanol sensitivität und Toleranz in *Drosophila melanogaster*.

Durch die Verwendung des GAL4/*UAS*-Systems können Neurone genetisch manipuliert werden (BRAND and PERRIMON 1993). Veränderungen der Neurotransmitter-Ausschüttung werden mit Hilfe eines *UAS*-Tetanustoxin (TNT) Transgens erreicht (SWEENEY et al. 1995), dagegen mit einem *UAS-Kir2.1* Transgen wird die Erregbarkeit von Neuronen geblockt (LEWOHL et al. 1999).

Zur Inhibition der Neurotransmitter Ausschüttung wird in Neuronen Tetanustoxin (TNT) exprimiert (SWEENEY et al. 1995). Tetanustoxin schneidet Synaptobrevin, welches essentiell für die Fusion von Neurotransmitter Vesikel mit der Membran der Synapse ist. Demzufolge kann der Vesikel nicht mit der Membran fusionieren und den Neurotransmitter in den synaptischen Spalt entleeren. Es erfolgt somit keine Informationsweiterleitung mittels Neurotransmitter-Ausschüttung aus Synaptobrevin-abhängigen Vesikeln. Hingegen bei Verwendung der *UAS-Kir2.1* Effektor Linie werden einwärts gerichtete Kaliumkanäle in die Membran der Neurone eingebaut, wodurch ein stetiger Kaliumstrom stattfindet. Auf diese Weise kann sich nach einmaliger Aktivierung der Zelle kein Ruhepotential mehr einstellen. Die Erregbarkeit der Zelle ist aufgrund dessen blockiert (LEWOHL et al. 1999).

In diesem Teil der Arbeit werden die *T β H*-GAL4-Linien durch Einkreuzen verschiedener Transgene auf Veränderung des ethanolinduzierten Verhaltens untersucht. Zusätzlich wird die putativ oktopaminerge *Tdc2*-GAL4-Linie verwendet. Durch wieder Einführung des intakten *T β H* Gens in *T β H*-defiziente Fliegen sollte der Phänotyp der reduzierten Ethanol toleranzentwicklung gerettet werden. In allen gezeigten Experimenten werden männliche Testfliegen, sowie Kontrollgruppen im Inebriometer auf Ethanol sensitivität und Toleranz untersucht.

3.8.1 Das *white* Gen beeinflusst weder die Ethanol sensitivität noch die Toleranz der *TβH^{M18}* Mutanten.

Das mini-*white* Gen wird als genetischer Marker bei der Nutzung des GAL4/*UAS* Systems verwendet. Es wurde untersucht, ob die Expression von White einen Einfluss auf die Entwicklung von Ethanol sensitivität und Toleranz aufweist. (Abbildung 37).

Wildtyp-Fliegen mit intaktem *white* Gen (*w⁺*) unterscheiden sich nicht signifikant bei der Entwicklung von Ethanol sensitivität bzw. Toleranz von *white*-Fliegen (*white¹¹¹⁸*), welche kein intaktes *white* Gen besitzen (Abbildung 37). Zudem wurde die *TβH^{M18}* Mutante mit und ohne funktionellem *white* Gen auf ihre Ethanol sensitivität und Toleranz hin getestet. Es ließen sich keine Unterschiede zwischen beiden mutanten Stämmen finden. Das bedeutet, dass die Expression von White keinen Einfluss auf den Phänotyp der *TβH^{M18}* Mutante hat (Abbildung 37).

Gegenüber den als Wildtyp definierten Fliegen *w⁺* und *white¹¹¹⁸* entwickelte die *TβH^{M18}* Mutante keine veränderte Ethanol sensitivität, jedoch wie erwartet eine reduzierte Ethanol toleranz (Abbildung 37)(SCHOLZ et al. 2000). Bei Berechnung der Signifikanzen zwischen den wildtypischen und den mutanten Fliegenstämmen mittels T-Test, ergibt sich ein hochsignifikanter Unterschied ($p^{***} \leq 0.001$).

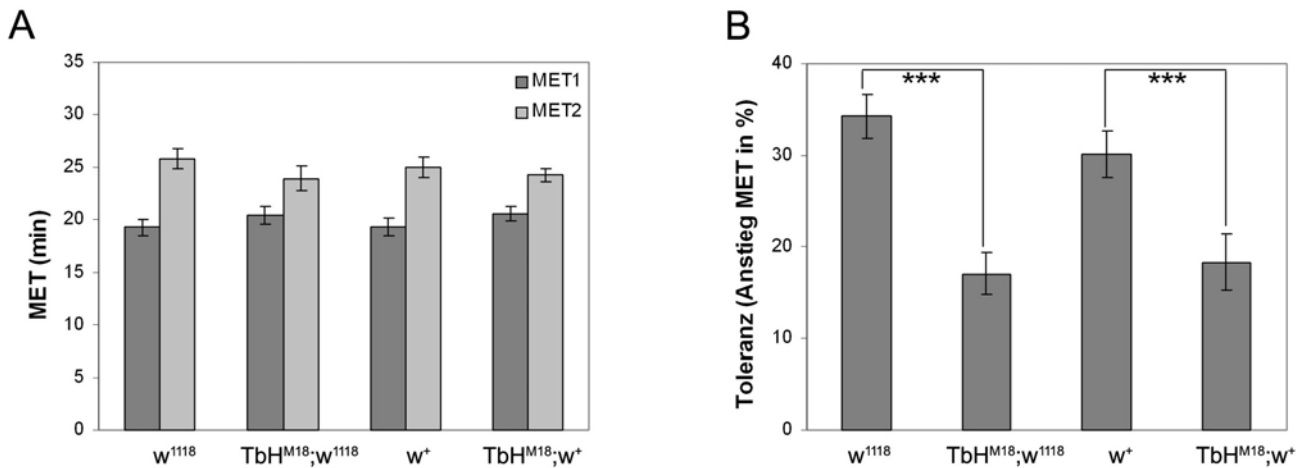


Abbildung 37: Das *white* Gen beeinflusst nicht die Entwicklung von Ethanol sensitivität und Toleranz von wildtypischen und $T\beta H^{M18}$ mutanten Fliegen.

(A) Die Mean Elution Time (MET) 1 von $T\beta H^{M18}$ Fliegen mit bzw. ohne Mutation im *white* Gen unterscheiden sich nicht von denen der Kontrollen w^{1118} und w^+ (dunkelgrau) ($T\beta H^{M18}, w^{1118}$: 20,4 ± 0,8 min; $T\beta H^{M18}, w^+$: 20,6 ± 0,7 min; w^{1118} : 19,3 ± 0,7 min; w^+ : 19,3 ± 0,8 min). Zwischen den MET 2 Werten der $T\beta H^{M18}$ Mutanten mit bzw. ohne *white* Gen ist kein Unterschied sichtbar ($T\beta H^{M18}, w^+$: 24,3 ± 0,6 min; $T\beta H^{M18}, w^{1118}$: 23,9 ± 1,2 min). Jedoch die MET 2 Werte der Kontrollgruppen unterscheidet sich signifikant von denen der $T\beta H^{M18}$ Mutanten (hellgrau) (w^{1118} : 25,9 ± 0,9 min; w^+ : 25,1 ± 1,0 min; $T\beta H^{M18}, w^+$: 24,3 ± 0,6 min; $T\beta H^{M18}, w^{1118}$: 23,9 ± 1,2 min). (B) $T\beta H^{M18}$ Fliegen sowohl im w^{1118} als auch im w^+ Hintergrund zeigen eine signifikante Reduktion der Ethanol toleranz gegenüber den Kontrollgruppen ($T\beta H^{M18}, w^{1118}$: 17,0 ± 2,3 %; $T\beta H^{M18}, w^+$: 18,3 ± 3,1 %; w^{1118} : 34,3 ± 2,4 %; w^+ : 30,1 ± 2,5 %). Die Anzahl der Versuche beträgt $n \geq 10$ und $p^{***} \leq 0.001$. Die Fehlerbalken repräsentieren den SEM (Standardfehler) (alle Werte in Tabelle A 1; Anhang).

3.8.2 Die Expression von TβH in allen Zellen von $T\beta H^{M18}$ Fliegen führt zu einer tendenziellen Rettung der Entwicklung der reduzierten Ethanol toleranz.

Es wurde getestet, ob die reduzierte Ethanol toleranz der TβH defizienten Fliegen durch wieder Einbringung eines intakten *TβH* Gens gerettet werden kann. Dazu wurden TβH defiziente Fliegen, die ein intaktes w^+ Allel besitzen, mit einem *hsp70-TβH* Fliegenstamm verkreuzt. Als Kontrolle wurden w^+ Fliegen mit demselben *hsp70-TβH* Fliegenstamm verpaart (SCHWAERZEL et al. 2003). Mit Hilfe dieses *hsp70-TβH* Transgens kann nach Gabe eines Hitzeschocks (HS) bei 37 °C die Transkription der dem Hitzeschock-Promoter nachgeschalteten *Tyramin-β-Hydroxylase* cDNA angeschaltet werden (SCHWAERZEL et al. 2003).

Sobald durch HS aktivierte Proteine an den *Hsp70*-Promoter binden, sollte die *TβH*-cDNA transkribiert und TβH-Protein in den Zellen des Organismus exprimiert werden. Somit würde wieder Oktopamin aus Tyramin synthetisiert werden können. Die Stämme *w^r* und *TβH^{M18}; hsp70-TβH* erhielten zwei Hitzeschocks bei 37°C für jeweils 30 min Dauer. Fünf Stunden nach dem ersten, wurde der zweite Hitzeschock gegeben. Zwischen zweitem Hitzeschock und der Messung vergingen 12h. Als Kontrolle wurden die Fliegenstämme *w^r* und *TβH^{M18}; hsp70-TβH* ohne Hitzeschock getestet. (Abbildung 38). Die erste Ethanol Exposition erhielten alle vier Fliegengruppen für 20min in Falcon-Röhrchen. Nach 3,5h Ausnüchterung wurde ihre Mean Elution Time (MET) im Inebriometer gemessen, was der MET2 im Standartexperiment entsprechen würde. Die Begasung der Fliegen mit Ethanol in Röhrchen erfolgte bei diesem Experiment aufgrund der geringen Anzahl von Nachkommen. Da bei jeder Messung im Inebriometer 130 Fliegen benötigt werden und ein Verlust von mindestens 15-20 Fliegen jeweils zu verzeichnen ist.

Die MET2 der *w^r* Fliegen mit (HS⁺) bzw. ohne (HS⁻) Hitzeschock unterscheiden sich nicht signifikant voneinander. Dagegen die *TβH^{M18}; hsp70-TβH* HS⁺ Fliegen benötigen mehr Ethanol, um von der Säule eluiert zu werden, als die *TβH^{M18}; hsp70-TβH* HS⁻ Fliegen (Abbildung 38). Mittels T-Test konnte jedoch keine Signifikanz zwischen *TβH^{M18}; hsp70-TβH* HS⁺ bzw. *TβH^{M18}; hsp70-TβH* HS⁻ Fliegen berechnet werden. *TβH^{M18}; hsp70-TβH* HS⁺ Fliegen sind zudem ebenfalls signifikant niedriger in ihrer MET2 als die Wildtyp Kontrollen *w^r* HS⁺ und *w^r* HS⁻. Es wurden bei dieser Messung jedoch nur fünf Versuchsdurchführungen vorgenommen.

Somit kann durch Aktivierung der Transkription durch einen 37°C Hitzeschock eventuell eine partielle Rettung des Phänotyps der reduzierten Toleranzentwicklung erreicht werden, wenn eine höhere Anzahl an Versuchsdurchführungen durchgeführt wird.

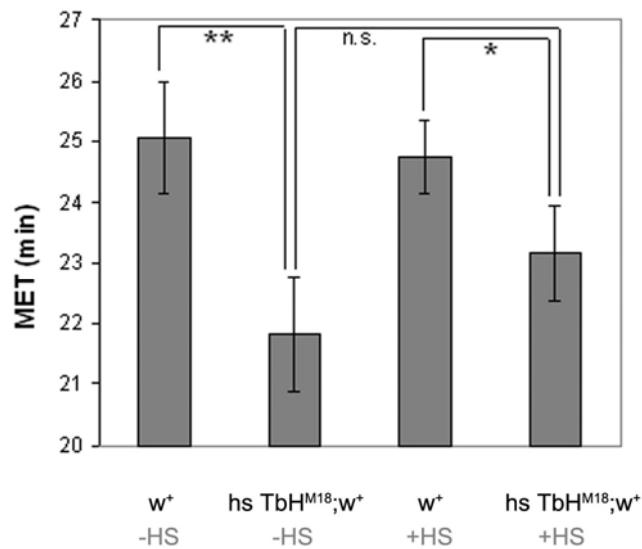


Abbildung 38: Der *TβH^{M18}* Toleranz Defekt kann durch Expression eines *UAS-TβH* Transgens nicht gerettet werden

Alle Fliegen wurden 20 min in Röhren mit Ethanol begast, 3,5h ausnüchtern gelassen und anschließend die MET2 im Inebriometer gemessen. Wildtyp Kontrollen benötigten mit Hitzeschock (HS) bei 37°C sowie ohne HS etwa dieselbe Zeit, um von den Säulen eluiert zu werden (*w⁺* HS⁺: 24,8 ± 0,6; *w⁺* HS⁻: 25,1 ± 0,9). Die *TβH^{M18}* Mutante blieb bei gegebenem HS signifikant längere Zeit im Inebriometer als die Mutante ohne HS (*TβH^{M18}*; *hsp70-TβH* HS⁺: 23,2 ± 0,8 min; *TβH^{M18}*; *hsp70-TβH* HS⁻: 21,8 ± 1,0 min). Bei zusätzlicher Bonferroni-Korrektur sind die *TβH^{M18}* Mutanten mit und ohne

HS nicht signifikant unterschiedlich voneinander. Die *TβH^{M18}*; *hsp70-TβH* HS⁺ ist ebenfalls signifikant unterschiedlich von den Wildtyp Kontrollen. Die Anzahl der Versuchsdurchführungen beträgt n=5 und $p^* \leq 0.05$; $p^{**} \leq 0.01$ mit T-Test. Die Fehlerbalken repräsentieren den SEM (alle Werte in Tabelle A 12; Anhang).

Eine weitere Möglichkeit die intakte *TβH*-cDNA in der Fliege zur Transkription anzuschalten, ist das Treiben dieser mittels einer GAL4-Linie. Der Versuch die Transkription der transgenen *TβH*-cDNA mittels Gabe eines Hitzeschocks anzuschalten hat den Vorteil, dass z. B. die Transkription zu einem beliebigen Zeitpunkt mittels Hitzeschock aktiviert werden kann. Ein Nachteil hingegen ist, dass die Expression des TβH-Proteins in allen Zellen des Körpers stattfindet. Aus diesem Grund wurde ein weiterer Rettungsversuch durchgeführt. Im folgenden Experiment wurde die TβH mit Hilfe der *App1*-GAL4-Linie in allen Neuronen des ZNS exprimiert (GUNAWARDENA and GOLDSTEIN 2001). Allerdings ist hierbei der Nachteil, dass das Transgen während der gesamten Entwicklung exprimiert wird, nicht zu einem bestimmten Zeitpunkt.

Die MET1 Werte der Kontrollgruppen sind verglichen mit denen der Testgruppe nicht signifikant verschieden voneinander (Abbildung 39). Ebenfalls die MET2 Werte der mutanten Kontrollgruppe sind nicht signifikant unterschiedlich zu der Testgruppe. Der Phänotyp der reduzierten Ethanoltoleranz der *TβH^{M18}* Mutante wird durch die Expression von TβH in allen ZNS Neuronen in diesem Experiment nicht signifikant verändert (Abbildung 39). Daraus kann geschlossen werden, dass die Neurone in denen die *App1*-GAL4-Linie das *UAS-TβH* Transgen getrieben hat, nicht den relevanten Teil des TβH-Expressionsusters beinhalten, oder eine zu schwache

Treiberlinie ist. Eine andere mögliche Erklärung wäre jedoch, dass der Insertionsort des *UAS-TβH* Transgens Einfluss auf die Entwicklung der Ethanoltoleranz zu haben scheint, da die Kontrollgruppe *w¹¹¹⁸/TβH^{M18}, UAS-TβH* signifikant ($p < 0,0002$) weniger tolerant gegenüber Ethanol ist, als die Kontrollgruppe *w¹¹¹⁸/TβH^{M18}, +; Appl-GAL4*. Man kann somit nicht sicher sagen, ob die *UAS-TβH* Transgeninsertion die Rettung der Ethanoltoleranz nicht unterdrücken würde. Das Experiment müsste mit einem *UAS-TβH* Transgen an einem anderen Insertionsort wiederholt werden.

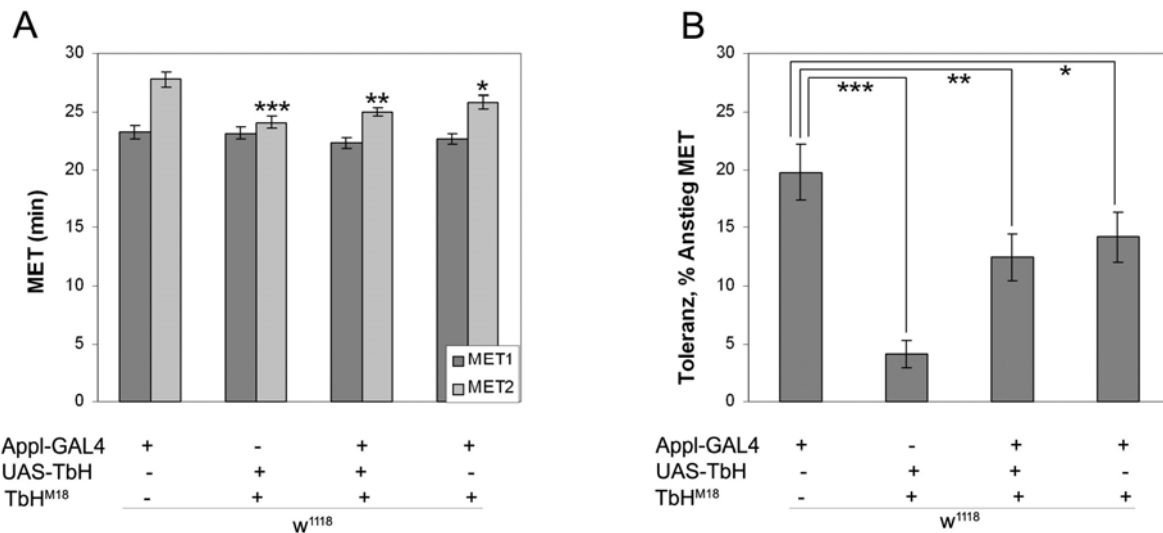


Abbildung 39: Die Expression des *TβH* Gens mittels der *Appl-GAL4* Treiber-Linie rettet nicht die reduzierte Ethanol-Toleranz der *TβH^{M18}* Mutante.

Mit der Reporter-Linie *Appl-GAL4* wird das *UAS-TβH* Transgen im *TβH^{M18}* mutanten Hintergrund getrieben. (A) Das getriebene *UAS-TβH* Transgen hat keinen Einfluss auf die Ethanol sensitivität, da sich die MET1 Werte (dunkelgrau) der Kontrollgruppen nicht signifikant von denen der experimentellen Gruppe unterscheiden (*w¹¹¹⁸, +; Appl-GAL4*: $23,3 \pm 0,6$ min; *w¹¹¹⁸/TβH^{M18}, UAS-TβH; +; Appl-GAL4*: $23,2 \pm 0,5$ min; *w¹¹¹⁸/TβH^{M18}, +; Appl-GAL4*: $22,7 \pm 0,5$ min; *w¹¹¹⁸, TβH^{M18}/UAS-TβH; +; Appl-GAL4*: $22,3 \pm 0,5$ min). Die MET2 Werte (hellgrau) der Fliegen im *TβH^{M18}* mutanten Hintergrund unterscheiden sich signifikant von den Wildtyp Fliegen (*w¹¹¹⁸, +; Appl-GAL4*: $27,8 \pm 0,6$ min; *w¹¹¹⁸/TβH^{M18}, UAS-TβH; +; Appl-GAL4*: $24,1 \pm 0,5$ min; *w¹¹¹⁸/TβH^{M18}, +; Appl-GAL4*: $25,0 \pm 0,4$; *w¹¹¹⁸, TβH^{M18}/UAS-TβH; +; Appl-GAL4*: $25,9 \pm 0,6$ min). (B) Die Wildtyp Kontrolle entwickelt signifikant mehr Ethanol toleranz als die Testgruppe (*w¹¹¹⁸, +; Appl-GAL4*: $19,8 \pm 2,4$ %; *w¹¹¹⁸/TβH^{M18}, UAS-TβH; +; Appl-GAL4*: $12,4 \pm 1,9$ %). Die entwickelte Ethanol toleranz der Kontrolle *w¹¹¹⁸/TβH^{M18}, Appl-GAL4* ($14,1 \pm 2,1$ %) ist nicht signifikant verschieden von der der Testgruppe *w¹¹¹⁸/TβH^{M18}, UAS-TβH; +; Appl-GAL4* ($12,4 \pm 1,9$ %). Die Kontrollgruppe *w¹¹¹⁸/TβH^{M18}, UAS-TβH* ($4,2 \pm 1,3$ %) ist jedoch signifikant niedriger ($p < 0,0002$) in der entwickelten Ethanol toleranz als die Kontrollgruppe *w¹¹¹⁸/TβH^{M18}, +; Appl-GAL4* ($14,1 \pm 2,1$ %). Die Anzahl der Versuchsdurchführungen beträgt $n=12$ und $p \leq 0,05$; $p'' \leq 0,01$; $p''' \leq 0,001$. Die Fehlerbalken repräsentieren den SEM. (alle Werte in Tabelle A 3; Anhang).

3.8.3 Inhibition der Neurotransmitterausschüttung bzw. Erregbarkeit von putativen T β H-positiven Neuronen während der Entwicklung, beeinflusst die Ethanol sensitivität und Toleranz

Ziel war es, die Neurotransmission in putativen oktopaminergen Neuronen zu inhibieren, um deren Einfluss in Bezug auf ethanolinduziertes Verhalten zu untersuchen. Die GAL4-Linien, die für diese Experimente verwendet wurden, sind die eigens hergestellten *T β H*-GAL4-Linien und die putative oktopaminerge GAL4-Linie *Tdc2*-GAL4. Leider konnte die *T β H* Enhancer Trap Linie NP938 nicht gemessen werden, da diese bei Expression der Transgene *UAS-TNT* und *UAS-Kir2.1* lethal ist.

3.8.3.1 Die Expression von TNT-Molekülen in Neuronen, getrieben durch die 650*T β H*-GAL4 Linie hat weder Einfluss auf die Ethanol sensitivität noch auf die Toleranz.

Die Neurotransmitter Ausschüttung der 650*T β H*-GAL4 Neurone ist nicht essentiell für das ethanolinduzierte Verhalten, wie das Experiment mit dem *UAS-TNT* Transgen zeigte. In diesem Experiment unterschieden sich weder die MET1 Werte noch die MET2 Werte der Kontrollgruppen (*w¹¹⁸*; +; 650*T β H*-GAL4 und *w¹¹⁸*, *UAS-TNT*) von denen der Testgruppe signifikant voneinander (*w¹¹⁸*; *UAS-TNT*; 650*T β H*-GAL4),(Abbildung 40). Es kommen demzufolge auch keine signifikanten Änderungen in der Ethanol toleranzentwicklung zwischen den Kontrollgruppen und der Testgruppe zustande. Da nicht davon zwangsläufig ausgegangen werden kann, dass alle Neurone TNT sensitiv sind (RISTER and HEISENBERG 2006), sollten die 650*T β H*-GAL4 Neurone zudem mit Hilfe eines *UAS-Kir2.1* Transgens ausgeschaltet werden. Die Expression eines *UAS-Kir2.1* Transgens in 650*T β H*-GAL4-positiven Neuronen konnte jedoch nicht gemessen werden, da die Nachkommen dieser Kreuzung lethal sind. Demzufolge bleibt offen, ob die 650*T β H*-GAL4 Neurone Einfluss bei der Entwicklung von Ethanol sensitivität bzw. Toleranz haben.

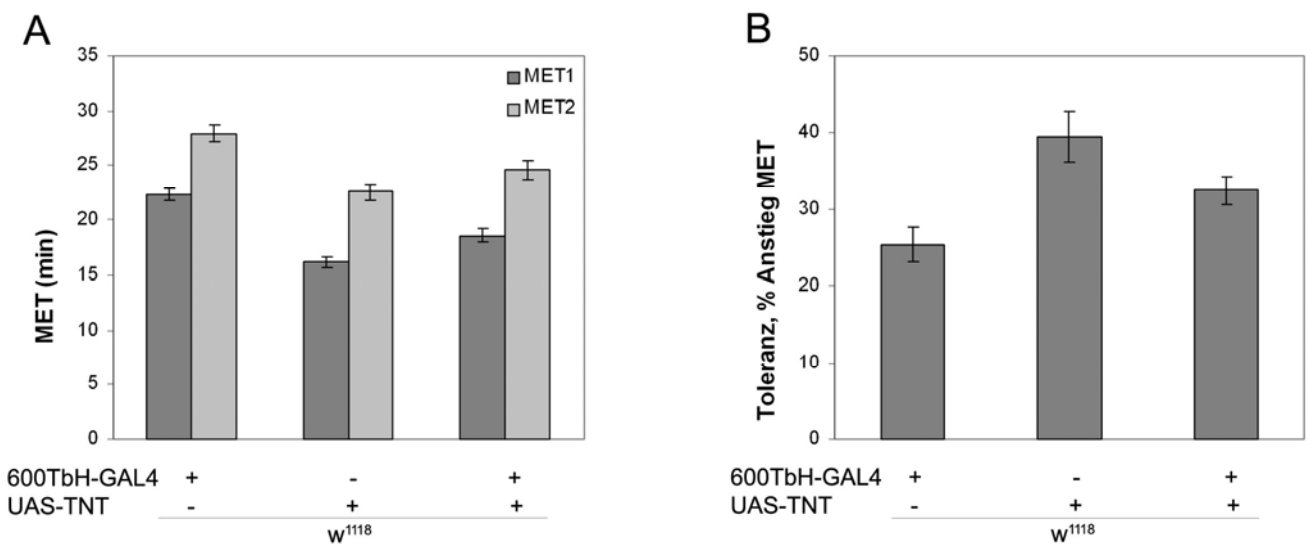


Abbildung 40: Inhibition spezifischer Neurone in *w¹¹¹⁸;UAS-TNT;650TbH-GAL4* Fliegen verändert nicht die Ethanolsensitivität oder Toleranz.

(A). Die MET1 (dunkelgrau) der Kontrollgruppen unterscheiden sich nicht von der MET1 der experimentellen Gruppe (*w¹¹¹⁸; +; 650TbH-GAL4*: 22,3 ± 0,5 min; *w¹¹¹⁸; UAS-TNT*: 16,2 ± 0,5 min; *w¹¹¹⁸; UAS-TNT; 650TbH-GAL4*: 18,6 ± 0,6 min). Dasselbe gilt für die MET2 (hellgrau) der Kontrollgruppen verglichen mit der MET2 der experimentellen Gruppe (*w¹¹¹⁸; +; 650TbH-GAL4*: 28 ± 0,7 min; *w¹¹¹⁸; UAS-TNT*: 22,5 ± 0,7 min; *w¹¹¹⁸; UAS-TNT; 650TbH-GAL4*: 24,6 ± 0,9 min). (B) Dementsprechend ist die Ethanoltoleranz der Kontrolltiere nicht signifikant verschieden von der Toleranz der experimentellen Tiere (*w¹¹¹⁸; +; 650TbH-GAL4*: 25,3 ± 2,2%; *w¹¹¹⁸; UAS-TNT*: 40,0 ± 3,3 %; *w¹¹¹⁸; UAS-TNT; 650TbH-GAL4*: 32,4 ± 1,8 %). Die Fehlerbalken repräsentieren den SEM. Die Anzahl der Versuche beträgt n=7. (alle Werte in Tabelle A 10, Anhang)

3.8.3.2 Die Expression von einwärts gerichteten Kaliumkanälen in Neuronen, getrieben mit Hilfe der 1.3TbH-GAL4 Linie, beeinflusst die Ethanolsensitivität.

Die Erregbarkeit der 1.3TbH-GAL4 Neurone spielt eine essentielle Rolle für das ethanolinduzierte Verhalten im Inebriometer. Dies wird aufgrund der signifikanten Unterschiede der MET1 der Kontrollgruppen (*w¹¹¹⁸; 1.3TbH-GAL4* und *w¹¹¹⁸; UAS-Kir2.1*) im Vergleich zur Testgruppe sichtbar (*w¹¹¹⁸; 1.3TbH-GAL4/UAS-Kir2.1*) (Abbildung 41). Man würde erwarten, dass die MET1 der Testgruppe zwischen denen der Kontrollgruppen liegen würde. Stattdessen befindet sich die MET1 der Testgruppe *w¹¹¹⁸; 1.3TbH-GAL4/UAS-Kir2.1* etwa 5 min über der höchsten MET1 der Kontrollgruppe *w¹¹¹⁸; UAS-Kir2.1*. Die MET2 Werte der Kontrollgruppen weichen hingegen nicht signifikant von denen der Testgruppe ab. Da allerdings die MET1 Werte der Kontrollgruppen von dem der Testgruppe abweichen, kommt es zu signifikanten Änderungen in der Entwicklung von

Ethanoltoleranz. Die Testgruppe entwickelt etwa 25-30 % weniger Ethanoltoleranz als die Kontrollgruppen. Somit sind die 1.3*TβH*-GAL4-positiven Neurone bei der Entwicklung von ethanolinduziertem Verhalten beteiligt.

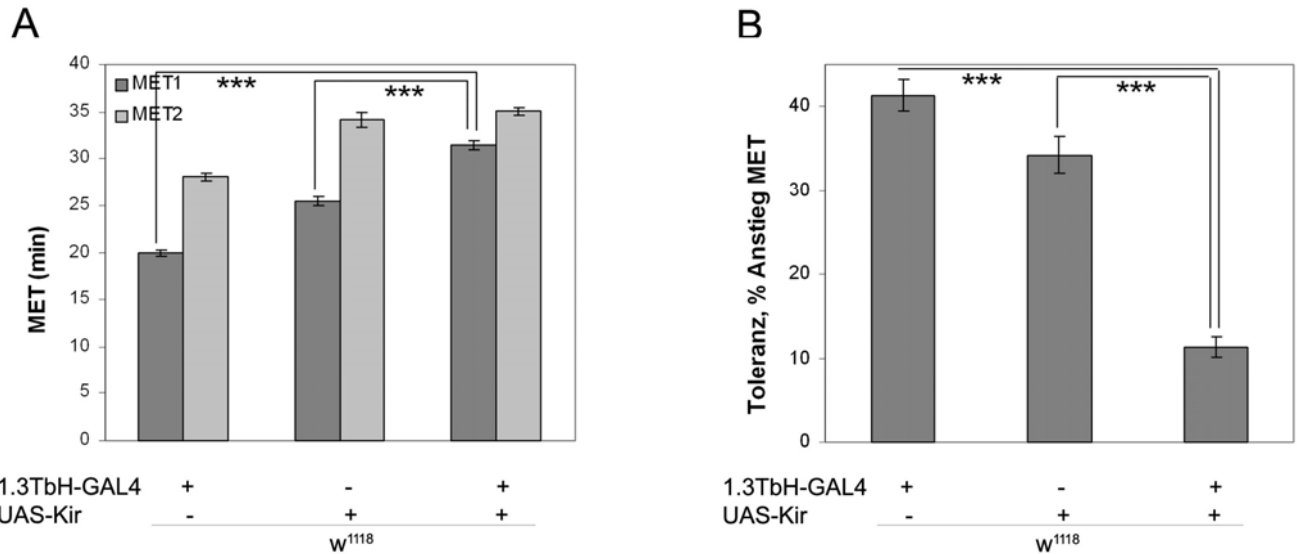


Abbildung 41: Inaktivierung spezifischer Neurone in *w*¹¹¹⁸; 1.3*TβH*/*UAS-Kir2.1* Fliegen beeinflusst die Ethanol sensitivität und eventuell Toleranz.

(A) Die MET1 Werte (dunkelgrau) der Kontrollgruppen unterscheiden sich von der MET1 der experimentellen Gruppe (*w*¹¹¹⁸; 1.3*TβH*-GAL4: 19,9 ± 0,3 min; *w*¹¹¹⁸; *UAS-Kir2.1*: 25,4 ± 0,5 min, *w*¹¹¹⁸; 1.3*TβH*-GAL4/ *UAS-Kir2.1*: 32,0 ± 0,5 min). Für die MET2 (hellgrau) der Kontrollgruppen gilt, dass sie sich nicht signifikant von der MET2 der experimentellen Gruppe unterscheiden (*w*¹¹¹⁸; 1.3*TβH*-GAL4: 28,1 ± 0,4 min; *w*¹¹¹⁸; *UAS-Kir2.1*: 34,1 ± 0,8 min; *w*¹¹¹⁸; 1.3*TβH*-GAL4/*UAS-Kir2.1*: 35,04 ± 0,41 min). (B) Die Ethanol toleranz ist stark reduziert bei der Testgruppe gegenüber den Kontrolltieren (*w*¹¹¹⁸; 1.3*TβH*-GAL4: 41,3 ± 1,9 %; *w*¹¹¹⁸; *UAS-Kir2.1*: 34,3 ± 2,2 %, *w*¹¹¹⁸; 1.3*TβH*-GAL4/*UAS-Kir2.1*: 11,3 ± 1,3 %). Die Fehlerbalken repräsentieren den SEM. Die Anzahl der Versuchsdurchführungen beträgt n=7 und p*** ≤ 0.001. (alle Werte in Tabelle A 4, Anhang).

Ferner wurde getestet, ob die Expression von Tetanustoxin, getrieben mittels der 1.3*TβH*-GAL4-Linie, Einfluss auf die Ethanol sensitivität und/oder Toleranz ausübt (Abbildung 42). Beim Betrachten der MET1 der Kontrollgruppen (*w*¹¹¹⁸; 1.3*TβH*-GAL4 und *w*¹¹¹⁸; *UAS-TNT*) gegenüber der MET1 der Testgruppe (*w*¹¹¹⁸; 1.3*TβH*-GAL4/*UAS-TNT*), zeigen sich keine signifikanten Unterschiede. Ebenso wenig, wie beim Vergleich der MET2 der Kontrollgruppen mit der MET2 der Testgruppe. Somit können keine signifikanten Änderungen in der Entwicklung von Ethanol toleranz zwischen den Kontrollgruppen und der Testgruppe zustande gekommen sein.

Demzufolge ist die Neurotransmitter Ausschüttung aus Synaptobrevin-abhängigen Vesikeln dieser Neurone nicht notwendig für das ethanolinduzierte Verhalten.

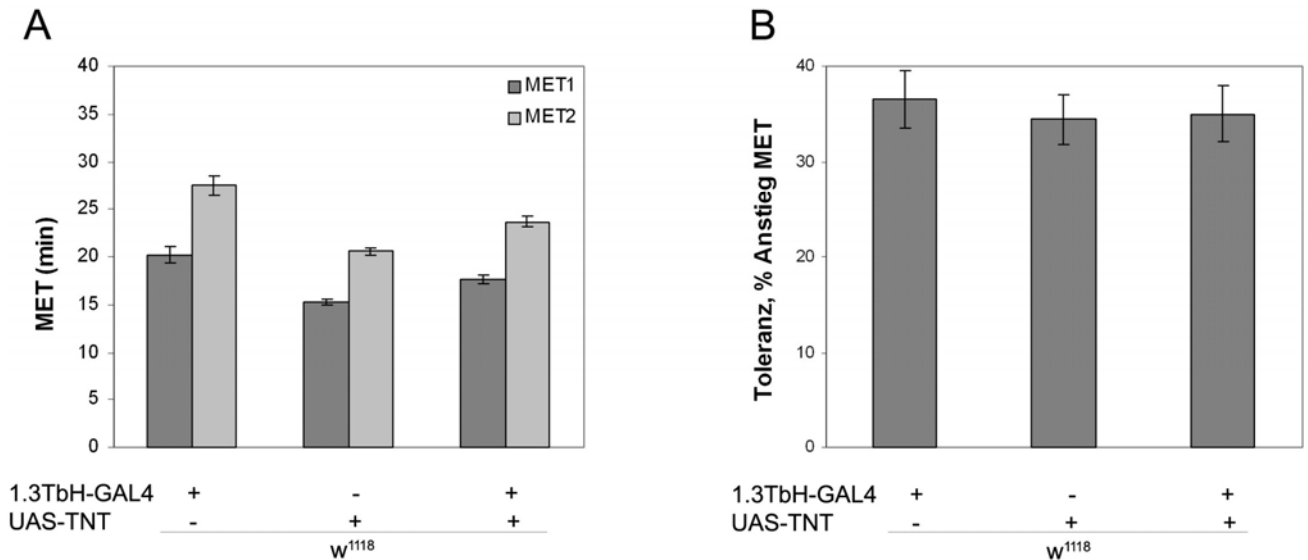


Abbildung 42: Die Inhibition spezifischer Neurone in w^{118} ; 1.3TβH-GAL4/UAS-TNT Fliegen beeinflusst nicht die Ethanolsensitivität oder Toleranz.

Durch die Expression von Tetanustoxin wird die Neurotransmission in den w^{118} ; 1.3TβH/UAS-TNT-positiven Neuronen inhibiert. (A) MET1 Werte (dunkelgrau) der Kontrollgruppen unterscheiden sich nicht von der MET1 der experimentellen Gruppe (w^{118} ; 1.3TβH-GAL4: 20,2 ± 0,9 min; w^{118} ; UAS-TNT: 15,3 ± 0,3 min; w^{118} ; 1.3TβH-GAL4/UAS-TNT: 17,6 ± 0,5 min). Dasselbe gilt für die MET2 Werte (hellgrau) der Kontrollgruppen verglichen mit der MET2 der experimentellen Gruppe (w^{118} ; 1.3TβH-GAL4: 27,5 ± 1,1 min; w^{118} ; UAS-TNT: 20,6 ± 0,4 min, w^{118} ; 1.3TβH-GAL4/UAS-TNT: 23,6 ± 0,6 min). (B) Ebenso ist die Ethanoltoleranz der Kontrolltiere nicht signifikant verschieden von der Toleranz der experimentellen Tiere (w^{118} ; 1.3TβH-GAL4: 36,6 ± 3,0%; w^{118} ; UAS-TNT: 35 ± 2,9%, w^{118} ; 1.3TβH-GAL4/UAS-TNT: 34,5 ± 2,6%). Die Anzahl der Versuchsdurchführungen beträgt n=8. Die Fehlerbalken repräsentieren den SEM. (alle Werte in Tabelle A 5, Anhang).

Die 1.3TβH-GAL4-positiven Zellen haben eine Funktion bei der Entwicklung von Ethanolsensitivität, wie die Versuche mit dem UAS-Kir2.1 Transgen zeigen (Abbildung 41). Dem cAMP Signaltransduktionsweg, in dem die Protein Kinase A (PKA) ein wichtiger Bestandteil ist, wird ebenfalls eine wichtige Rolle bei der Entwicklung von Ethanolsensitivität zugesprochen (RODAN et al. 2002). Deshalb wurde nun untersucht, ob die Protein Kinase A in 1.3TβH-GAL4-positiven Zellen das ethanolinduzierte Verhalten beeinflusst. Durch die Bindung von cAMP an die regulatorische Untereinheit der PKA wird die katalytische Untereinheit freigesetzt. Diese

diffundiert passiv zum Zellkern, um dort und im Zytoplasma Substrate wie CREB zu phosphorylieren. Auf diese Weise kann CREB an die CRE Sequenz von Genen binden und somit die Transkription induzieren. Mithilfe eines exprimierten Inhibitors, der an die katalytische Untereinheit der PKA bindet und somit die Phosphorylierung von Transkriptionsfaktoren im Zellkern verhindert, kann die PKA Signaltransduktion blockiert werden (RODAN et al. 2002). Bei Inhibition der PKA in *1.3TβH-GAL4*-positiven Zellen, wird klar, dass diese jedoch keine Rolle bei dem untersuchten ethanolinduzierten Verhalten spielt. Dies ist deutlich in Abbildung 43 zu erkennen. Die MET1 der Kontrollgruppen (w^{1118} ; *1.3TβH-GAL4* und w^{1118} ; +; *UAS-PKAinh*) weichen nicht signifikant von der MET1 der Testgruppe (w^{1118} ; *1.3TβH-GAL4*; *UAS-PKAinh*) ab. Dasselbe ist bei den MET2 Werten zu verzeichnen. Demzufolge unterscheiden sich die entwickelten Ethanoltoleranz Werte ebenfalls nicht zwischen den Kontrollgruppen und der Testgruppe.

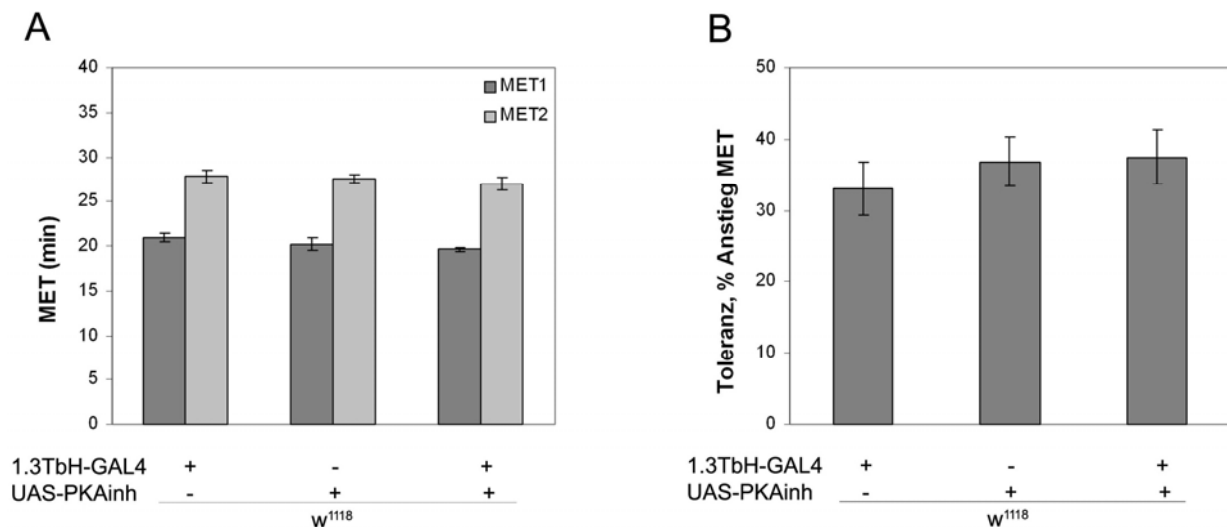


Abbildung 43: Inhibition der Protein-Kinase A in spezifischen Neuronen verändert nicht die Ethanol sensitivität und Toleranz.

Die PKA Aktivität wird in *1.3TβH-GAL4*-positiven Neuronen mit einem *UAS-PKAinh* Effektor Gen inhibiert. (A) Die MET1 Werte (dunkelgrau) der Kontrollgruppen unterscheiden sich nicht von dem MET1 Wert der experimentellen Gruppe (w^{1118} ; *1.3TβH-GAL4*: 21,0 ± 0,5 min; w^{1118} ; +; *UAS-PKAinh*: 20,2 ± 0,7 min; w^{1118} ; *1.3TβH-GAL4*; *UAS-PKAinh*: 19,6 ± 0,2 min). Dasselbe gilt für die MET2 Werte (hellgrau) der Kontrollgruppen verglichen mit den MET2 Werten der experimentellen Gruppe (w^{1118} ; *1.3TβH-GAL4*: 27,8 ± 0,7 min; w^{1118} ; +; *UAS-PKAinh*: 27,6 ± 0,5 min; w^{1118} ; *1.3TβH-GAL4*; *UAS-PKAinh*: 27,0 ± 0,7 min). (B) Dementsprechend ist die Ethanoltoleranz der Kontrolltiere nicht signifikant verschieden von der Toleranz der experimentellen Tiere (w^{1118} ; *1.3TβH-GAL4*: 33,0 ± 3,8 %; w^{1118} ; +; *UAS-PKAinh*: 37,0 ± 3,4 %; w^{1118} ;

1.3 *TβH*-GAL4; *UAS-PKA^{inh}*: 37,5 ± 3,9 %). Die Fehlerbalken repräsentieren den SEM. Die Anzahl der Versuchsdurchführungen beträgt n=7. (alle Werte in Tabelle A 2; Anhang)

3.8.3.3 Die durch die 4.6*TβH*-GAL4 Linie getriebene Expression von Tetanustoxin hat weder Einfluss auf die Entwicklung von Ethanol sensitivität noch auf die Ethanol toleranz.

In Abbildung 44 wird gezeigt, dass weder die MET1 Werte der Kontrollgruppen (*w¹¹¹⁸*; 4.6*TβH*-GAL4 und *w¹¹¹⁸*; *UAS-TNT*) sich signifikant von der Testgruppe (*w¹¹¹⁸*; 4.6*TβH*-GAL4/*UAS-TNT*) unterscheiden, noch die MET2 Werte der Kontrollgruppen von der Testgruppe. Somit sind auch keine signifikanten Änderungen in der Ethanol toleranzentwicklung zwischen den Kontrollgruppen und der Testgruppe zu verzeichnen. Daraus folgt, dass entweder die Synaptobrevin-abhängige Neurotransmitter-Ausschüttung aus 4.6*TβH*-GAL4-positiven Zellen keinen Einfluss im ethanolinduzierten Verhalten im Inebriometer aufweist, oder dass diese Zellen nicht TNT-sensitiv sind. Da die Inaktivierung der 4.6*TβH*-GAL4 Zellen mittels des *UAS-Kir2.1* Transgens lethal ist, kann nicht gezeigt werden, ob diese Neurone tatsächlich eine Funktion im ethanolinduzierten Verhalten aufweisen.

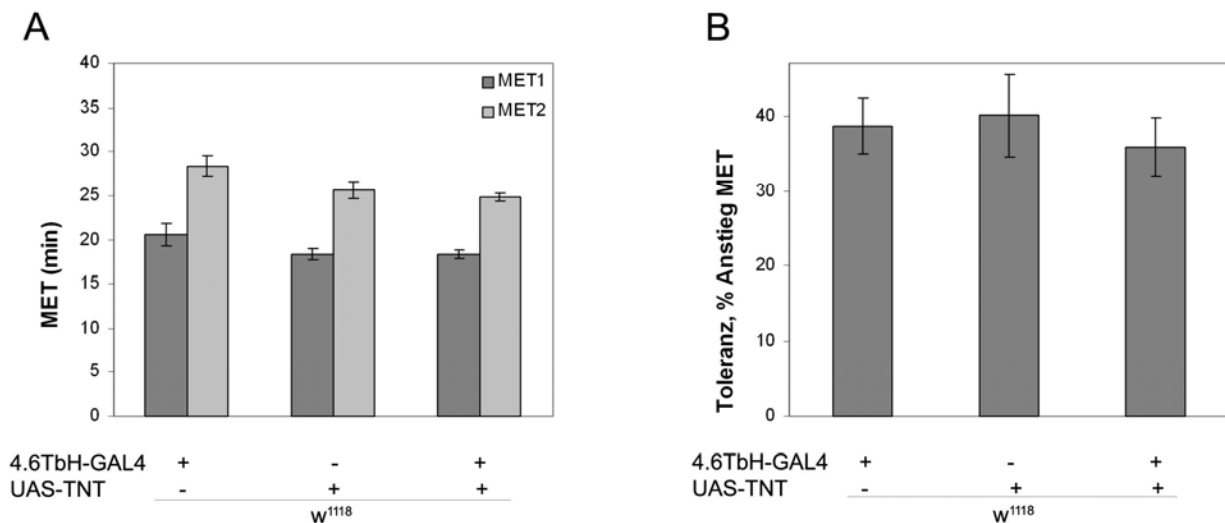


Abbildung 44: Inhibition der Neurotransmission in 4.6TβH-GAL4 Neuronen beeinflusst nicht die Ethanolsensitivität und Toleranz.

Das *UAS-TNT* Effektorgen wird mittels der 4.6TβH-GAL4-Linie in putativ TβH-positiven Neuronen getrieben. (A) MET1 Werte (dunkelgrau) der Kontrollgruppen unterscheiden sich nicht von dem MET1 Wert der experimentellen Gruppe (w^{1118} ; 4.6TβH-GAL4: 20,6 ± 1,2 min; w^{1118} ; *UAS-TNT*: 18,4 ± 0,6 min, w^{1118} ; 4.6TβH-GAL4/*UAS-TNT*: 18,4 ± 0,5 min). Dasselbe gilt für die MET2 Werte (hellgrau) der Kontrollgruppen verglichen mit den MET2 Werten der experimentellen Gruppe (w^{1118} ; 4.6TβH-GAL4: 28,3 ± 1,2 min; w^{1118} ; *UAS-TNT*: 25,6 ± 0,9 min, w^{1118} ; 4.6TβH-GAL4/*UAS-TNT*: 24,9 ± 0,5 min). (B) Die Ethanoltoleranz der Kontrolltiere ist nicht signifikant verschieden von der Toleranz der experimentellen Tiere (w^{1118} , 4.6TβH-GAL4: 38,6 ± 3,8%; w^{1118} , *UAS-TNT*: 40,1 ± 5,5%, w^{1118} , 4.6TβH-GAL4/*UAS-TNT*: 35,9 ± 3,9%). Die Fehlerbalken repräsentieren den SEM. Die Anzahl der Versuchsdurchführungen beträgt n=8. (alle Werte in Tabelle A 6; Anhang)

3.8.3.4 Wird die Neurotransmitter Ausschüttung in Neuronen mit Hilfe der Linie 6.2TβH-GAL4 Linie inhibiert, beeinflusst dies das ethanolinduzierte Verhalten.

Vergleicht man in Abbildung 45 die MET1 der Kontrollgruppen (w^{1118} ; 6.2TβH-GAL4 und w^{1118} ; *UAS-TNT*) mit denen der Testgruppe (w^{1118} , 6.2TβH-GAL4/*UAS-TNT*), so liegen die Werte der Testgruppe zwischen denen der Kontrollgruppen. Dies gilt auch bei den MET2 Werten der Testgruppe, verglichen mit denen der Kontrollgruppen. Aufgrund dessen sind auch keine signifikanten Änderungen in der Ethanoltoleranzentwicklung zwischen den Kontrollgruppen und der Testgruppe zu verzeichnen.

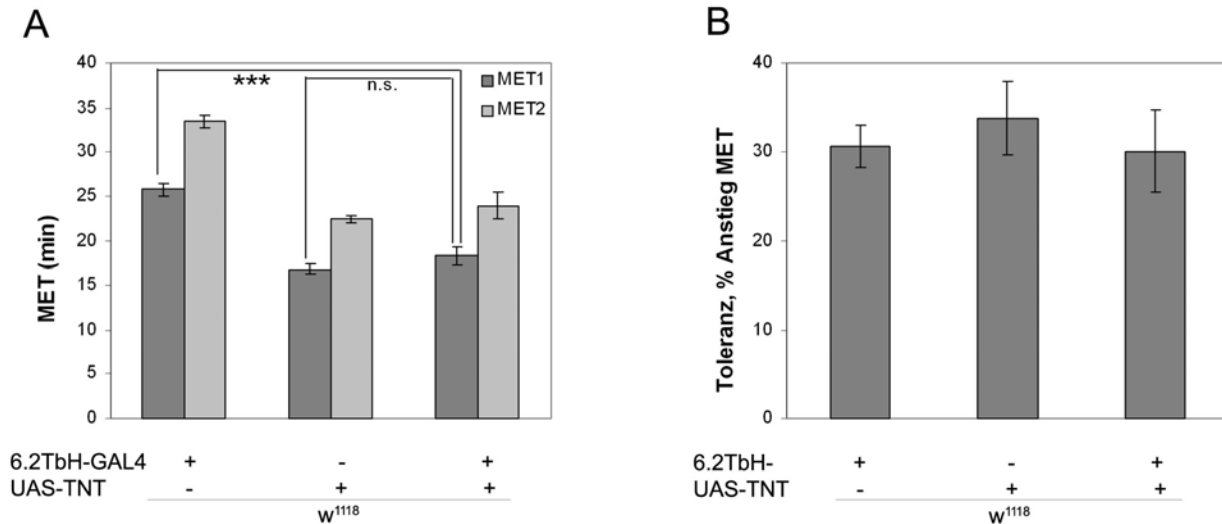


Abbildung 45: Inhibition der Neurotransmitter Ausschüttung in 6.2TβH-GAL4 Neuronen verändert nicht die Ethanolsensitivität und Toleranz.

(A) Die MET1 Werte (dunkelgrau) der Kontrollgruppen unterscheiden sich nicht von dem MET1 Wert der experimentellen Gruppe ($w^{1118}; 6.2T\beta H-GAL4$: 25,7 ± 0,8 min; $w^{1118}; UAS-TNT$: 17,0 ± 0,5 min, $w^{1118}; 6.2T\beta H-GAL4/UAS-TNT$: 18,3 ± 1,1 min). Dasselbe gilt für die MET2 Werte (hellgrau) der Kontrollgruppen verglichen mit den MET2 Werten der experimentellen Gruppe ($w^{1118}; 6.2T\beta H-GAL4$: 33,5 ± 0,7 min; $w^{1118}; UAS-TNT$: 22,4 ± 0,4 min, $w^{1118}; 6.2T\beta H-GAL4/UAS-TNT$: 23,9 ± 1,5 min). Allerdings sind die Kontrollgruppen signifikant unterschiedlich in ihrer MET1. (B) Die Ethanoltoleranz der Kontrolltiere ist nicht signifikant verschieden von der Toleranz der experimentellen Tiere ($w^{1118}; 6.2T\beta H-GAL4$: 30,6 ± 2,4 %; $w^{1118}; UAS-TNT$: 33,9 ± 4,2 %, $w^{1118}; 6.2T\beta H-GAL4/UAS-TNT$: 30,1 ± 4,7%). Die Fehlerbalken repräsentieren den SEM. Der Versuch wurde 5 Mal wiederholt. Die Sterne markieren die Signifikanz $p^{***} \leq 0.001$. (alle Werte in Tabelle A 7, Anhang)

Die MET1 der Kontrolle $w^{1118}; 6.2T\beta H-GAL4$ verglichen mit der Kontrolle $w^{1118}; UAS-TNT$ und der Testgruppe $w^{1118}; 6.2T\beta H-GAL4/UAS-TNT$ ist um ca. 8 min erhöht (Abbildung 45). Das legt nahe, dass die Insertionsorte der P-Element Konstrukte $w^{1118}; UAS-TNT$ und/oder $w^{1118}; 6.2T\beta H-GAL4$ Einfluss auf das ethanolinduzierte Verhalten haben.

Da die Entwicklung von Ethanoltoleranz Dosis-abhängig ist (SCHOLZ *et al.* 2000), wurden die Experimente mit einer konstanten ersten Ethanolexposition wiederholt. Für diesen Versuch wurden die Fliegengruppen in Falcon-Röhrchen 25 min mit derselben Konzentration Ethandampf begast, extern des Inebriometers. Nach 3,5h Ausnüchterung konnte die MET der Fliegen im Inebriometer gemessen werden, die der MET2 im Standartexperiment entspricht (Abbildung 46). Vergleicht man nun die im Inebriometer gemessenen MET (Abbildung 46), so

sieht man, dass die Kontrollgruppen resistenter gegenüber Ethanol sind, als die Testgruppe. Demzufolge unterdrückte die GAL4-Linie den Effekt der erhöhten Sensitivität der Testgruppe in Abbildung 45. Dieses Experiment lässt vermuten, dass die *6.2TβH-GAL4* Neurone TNT-sensitiv sind und somit die inhibierte Neurotransmitterausschüttung das ethanolinduzierte Verhalten beeinflusst.

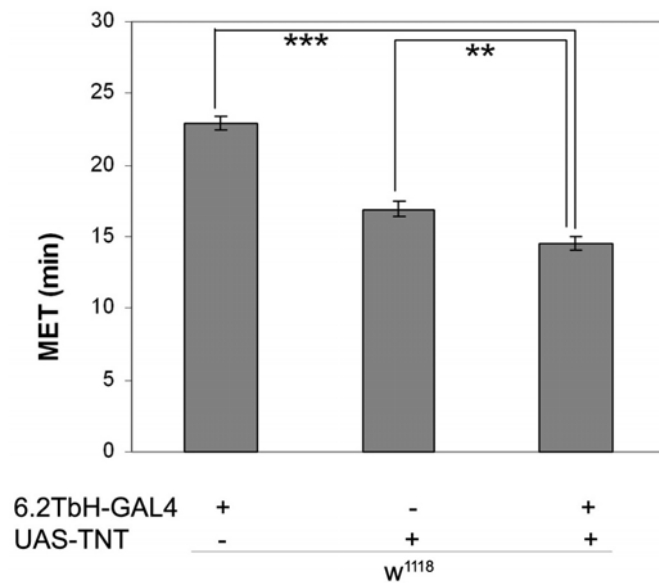


Abbildung 46: Bei Verabreichung gleicher Mengen an Ethanol entwickeln *6.2TβH-GAL4*; *UAS-Kir* Fliegen eine niedrigere MET.

In den *w¹¹⁸*; *6.2TβH-GAL4/UAS-TNT*-positiven Neuronen wird durch Expression von Tetanustoxin die Neurotransmission inhibiert. Kontroll- sowie Testgruppen werden zur Messung der MET2 (hellgrau) 3,5h nach 25 minütiger Ethanolexposition in Falcon Röhrchen in das Inebriometer eingeführt. Die Kontrollgruppen entwickeln verglichen mit der Testgruppe eine geringere Sensitivität gegenüber Ethanol (*w¹¹⁸*; *6.2TβH-GAL4*: 22,9 ± 0,5 min; *w¹¹⁸*; *UAS-TNT*: 16,9 ± 0,5 min; *w¹¹⁸*; *6.2TβH-GAL4/UAS-TNT*: 14,56 ± 0,5 min).

Die Anzahl der Versuchsdurchführungen beträgt n=6 und p^{**}≤0.01; p^{***}≤0.001. Die Fehlerbalken repräsentieren den SEM (alle Werte in Tabelle A 8, Anhang).

3.8.3.5 Durch Inaktivierung der neuronalen Erregbarkeit der *6.2TβH-GAL4* Neurone wird die Ethanolsensitivität reduziert.

Um zu untersuchen, ob andere zelluläre Mechanismen der *6.2TβH-GAL4*-positiven Neurone Auswirkungen auf das ethanolinduzierte Verhalten haben, wurde die *6.2TβH-GAL4*-Linie gegen die Effektorlinie *UAS-Kir2.1* gekreuzt. Die Erregbarkeit der *6.2TβH-GAL4*-positiven Neurone wird auf diese Weise inhibiert. Durch Inaktivierung der neuronalen Erregbarkeit in den 60-70 *6.2TβH-GAL4* Neuronen wird die Ethanolsensitivität stark beeinflusst (Abbildung 47). Aufgrund signifikanter Unterschiede der MET1 Werte der Kontrollgruppen (*w¹¹⁸*; *6.2TβH-GAL4* und *w¹¹⁸*; *UAS-Kir2.1*) zur Testgruppe (*w¹¹⁸*; *6.2TβH-GAL4/UAS-Kir2.1*) kann den *6.2TβH-GAL4* Neuronen eine Funktion bei der Entwicklung von Ethanolsensitivität bzw. Resistenz zugesprochen werden.

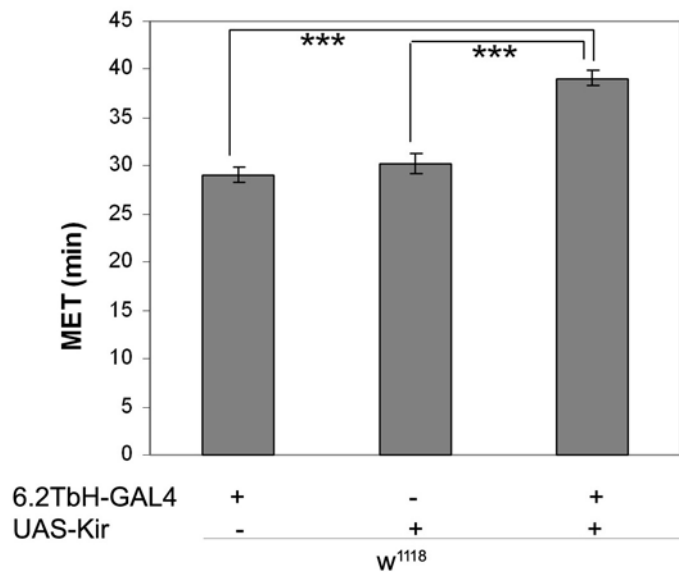


Abbildung 47: Inaktivierung spezifischer Neurone in w^{118} , $6.2T\beta H$, $UAS-Kir2.1$ Fliegen beeinflusst die Ethanol sensitivität.

Durch Expression eines $UAS-Kir$ Effektor Gens wird die Aktivierbarkeit von $6.2T\beta H$ -GAL4 positiven Neuronen unterdrückt. Männliche Testfliegen, sowie Kontrollgruppen werden im Inebriometer auf Ethanol sensitivität untersucht. Die MET1 Werte der Kontrollgruppen unterscheiden sich nicht von dem MET1 Wert der experimentellen Gruppe (w^{118} ; $6.2T\beta H$ -GAL4: 29,1 ± 0,8 min; w^{118} ; $UAS-Kir2.1$: 30,2 ± 1,1 min; w^{118} ; $6.2T\beta H$ -GAL4/ $UAS-Kir2.1$: 39,1 ± 0,8 min). Die Fehlerbalken sind SEM. Die Anzahl der Versuche beträgt n=4 und $p^{***} \leq 0.001$. (alle Werte in Tabelle A

13, Anhang)

Beim Vergleich der MET der Kontrollgruppe w^{118} ; $6.2T\beta H$ -GAL4 Fliegen der Abbildung 45 und Abbildung 47 zeigen diese einen Unterschied von etwa 5 min. Dies ist damit zu erklären, dass jeweils unterschiedliche Ethanolkonzentrationen zum Begasen für die Experimente verwendet wurden. Bei Abbildung 45 wird ein Ethanol-Luft-Gemisch von 2,5 Einheiten Ethanol zu 2,0 Einheiten Luft verwendet. Hingegen bei Abbildung 47 werden 2,5 Einheiten Ethanol mit 2,5 Einheiten Luft vermischt. Somit ist ein höherer Anteil an Luft im Ethanol-Luft-Dampf bei der Messung der Abbildung 47. Aufgrund dessen benötigen die Fliegen in Abbildung 47 etwa 5 min länger bis zur Elution aus dem Inebriometer. Dies hat keine Auswirkungen auf die signifikant erhöhte Resistenz der Testgruppe (w^{118} ; $6.2T\beta H$ -GAL4/ $UAS-Kir2.1$) relativ zu den Kontrollgruppen (w^{118} ; $6.2T\beta H$ -GAL4 und w^{118} ; $UAS-Kir2.1$).

Beim Vergleich der Daten in Abbildung 46 und Abbildung 47 wird deutlich, dass diese auf den ersten Blick widersprüchlich erscheinen. Denn die Inhibierung der Neurotransmission in TNT-sensitiven $6.2T\beta H$ -GAL4 Neuronen resultiert in erhöhter Ethanol sensitivität, hingegen die Inaktivierung der Erregbarkeit der gesamten Zellen in reduzierter Ethanol sensitivität. Es wäre somit möglich, dass die Ethanol resistenz über verschiedene Mechanismen oder andere Zellgruppen reguliert wird als die Sensitivität.

3.8.3.6 Die Expression von Tetanustoxin in 6.6*TβH*-GAL4 Neuronen hat weder Einfluss auf die Entwicklung von Ethanol sensitivität noch Toleranz.

Die Neurotransmitter Ausschüttung aus Vesikeln der 6.6*TβH*-GAL4 Neurone ist nicht notwendig für die Entwicklung des ethanolinduzierten Verhaltens im Inebriometer. Diese Aussage kann getroffen werden, da sich weder die MET1 Werte der Kontrollgruppen (w^{1118} ; 6.6*TβH*-GAL4 und w^{1118} ; *UAS-TNT*) von der Testgruppe (w^{1118} ; 6.6*TβH*-GAL4/*UAS-TNT*) signifikant unterscheiden, noch die MET2 Werte der gemessenen Fliegengruppen voneinander unterscheiden (Abbildung 48). Signifikante Änderungen bei der Entwicklung von Ethanol toleranz kommen demzufolge bei diesem Experiment zwischen den Kontrollgruppen und der Testgruppe nicht zustande.

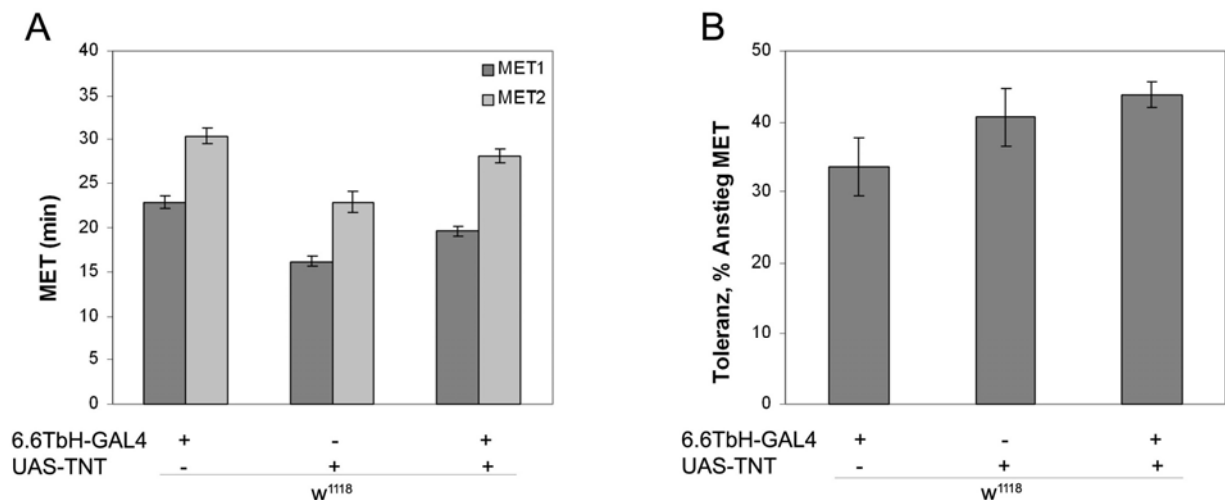


Abbildung 48: Inhibition der Neurotransmission in 6.6*TβH*-GAL4 Neuronen verändert die Ethanol sensitivität und Toleranz nicht.

(A) Die MET1 Werte (dunkelgrau) der Kontrollgruppen unterscheiden sich nicht von dem MET1 Wert der experimentellen Gruppe (w^{1118} ; 6.6*TβH*-GAL4: 22,8 ± 0,8 min; w^{1118} ; *UAS-TNT*: 16,2 ± 0,6 min; w^{1118} ; 6.6*TβH*-GAL4/*UAS-TNT*: 19,5 ± 0,6 min). Dasselbe gilt für die MET2 Werte (hellgrau) der Kontrollgruppen verglichen mit den MET2 Werten der experimentellen Gruppe (w^{1118} ; 6.6*TβH*-GAL4: 30,4 ± 0,9 min; w^{1118} ; *UAS-TNT*: 22,8 ± 1,2 min, w^{1118} ; 6.6*TβH*-GAL4/*UAS-TNT*: 28,1 ± 0,8 min). (B) Ebenso ist die Ethanol toleranz der Kontrolltiere nicht signifikant verschieden von der Toleranz der experimentellen Tiere (w^{1118} ; 6.6*TβH*-GAL4: 33,6 ± 4,21%; w^{1118} ; *UAS-TNT*: 40,62 ± 4,01 %; w^{1118} ; 6.6*TβH*-GAL4/*UAS-TNT*: 43,91 ± 1,84%). Die Anzahl der Versuchsdurchführungen beträgt n=8 und die Fehlerbalken repräsentieren den SEM. (alle Werte in Tabelle A 9, Anhang)

3.8.3.7 Durch Inaktivierung der neuronalen Erregbarkeit von *Tdc2*-GAL4 Neuronen wird die Ethanolsensitivität erhöht.

Der Einfluss der putativ oktopaminergen *Tdc2*-GAL4 Neurone in die Entwicklung von Ethanolsensitivität und/oder Toleranz wird in Abbildung 49 untersucht. Dazu wurde das *UAS-Kir2.1* Transgen mit Hilfe der *Tdc2*-GAL4-Linie getrieben. Die Expression von einwärts gerichteten Kaliumkanälen in *Tdc2*-GAL4 Neuronen beeinflusst die Ethanolsensitivität, aber nicht die Ethanoltoleranz (Abbildung 49) Dies kann aufgrund der signifikanten Unterschiede der MET1 Werte beim Vergleich der Kontrollgruppen (w^{1118} ; *Tdc2*-GAL4 und w^{1118} ; *UAS-Kir2.1*) mit der Testgruppe (w^{1118} ; *Tdc2*-GAL4/*UAS-Kir2.1*) festgestellt werden. Jedoch weichen die MET2 Werte der Kontrollgruppen nicht signifikant von denen der Testgruppe ab. Trotz der Unterschiede in den Werten der MET1 können keine signifikanten Änderungen in der Ethanoltoleranz zwischen den Kontrollgruppen und der Testgruppe verzeichnet werden (Abbildung 49 B).

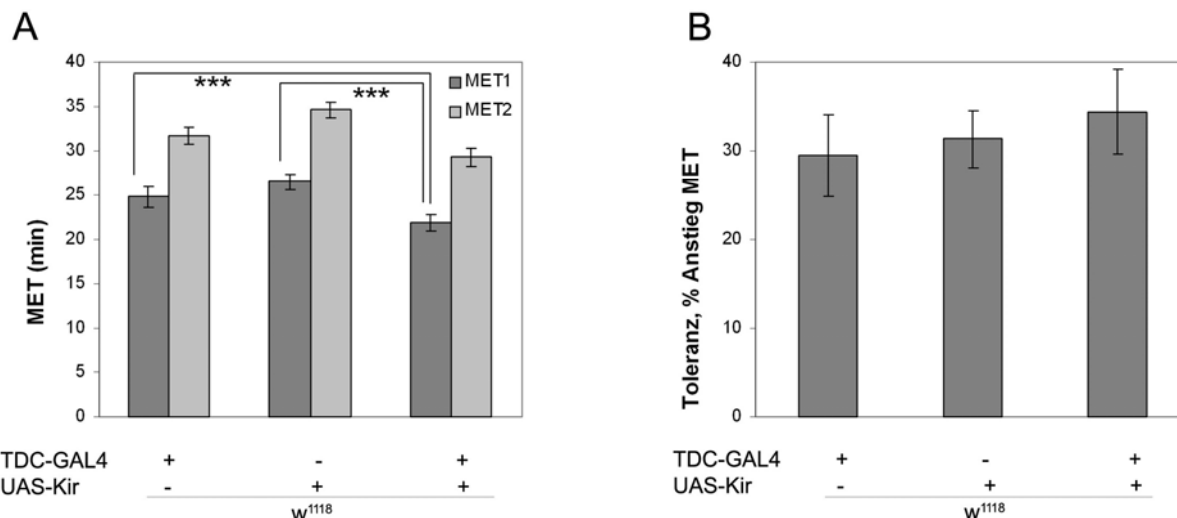


Abbildung 49: Inaktivierung spezifischer Neurone in w^{1118} ; *Tdc2*-GAL4/*UAS-Kir2.1* Fliegen beeinflusst die Ethanolsensitivität.

Die Aktivierbarkeit der *Tdc2*-GAL4 Neurone wird durch den Einbau von einwärts gerichteten Kaliumkanälen in die Membranen blockiert. (A) Die MET1 Werte (dunkelgrau) der Kontrollgruppen unterscheiden sich signifikant von dem MET1 Wert der experimentellen Gruppe (w^{1118} ; *Tdc2*-GAL4: 24,8 ± 1,2 min; w^{1118} ; *UAS-Kir2.1*: 27,0 ± 0,9 min; w^{1118} ; *Tdc2*-GAL4/*UAS-Kir2.1*: 21,9 ± 0,6 min). Das gilt nicht für die MET2 Werte (hellgrau) der Kontrollgruppen verglichen mit dem MET2 Wert der experimentellen Gruppe (w^{1118} ; *Tdc2*-GAL4: 31,7 ± 0,9 min; w^{1118} ; *UAS-Kir2.1*: 34,6 ± 0,9 min; w^{1118} ; *Tdc2*-GAL4/*UAS-Kir2.1*: 29,3 ± 1,1 min). (B) Die Ethanoltoleranz der Kontrolltiere ist nicht signifikant verschieden von der Toleranz der experimentellen Tiere (w^{1118} ; *Tdc2*-GAL4: 25,3% ± 2,2; w^{1118} ; *UAS-Kir2.1*: 39,5% ± 3,3; w^{1118} ; *Tdc2*-

GAL4/*UAS-Kir2.1*: $32,4 \pm 1,8$ %). Fehlerbalken sind SEM und $p^{***} \leq 0.001$. Die Anzahl der Versuche ist $n \geq 8$. (alle Werte in Tabelle A 11, Anhang).

3.8.4 Neurone der *1.3TβH-GAL4*-Linie spielen eine wichtige Rolle bei Fixations- bzw. Antifixations-Prozessen.

Um sicher zu stellen, dass w^{1118} ; *1.3TβH-GAL4/UAS-Kir2.1* Fliegen keinen Defekt im Laufverhalten und in ihrer Aktivität aufweisen, wurden diese im Buridan Paradigma untersucht (GOTZ 1980). Das Buridan Paradigma bietet den Vorteil, Aufschluss über potentielle lokomotorische Defekte und Objekt-Fixations-Probleme der Versuchstiere zu bekommen (STRAUSS and HEISENBERG 1993). Während der Messung wurde für 15 min jeweils eine Fliege mit gestutzten Flügeln auf einer Plattform in der Buridan Arena analysiert. Die Plattform wird von Wasser umgeben, so dass die Fliegen die zwei gezeigten schwarzen Landmarken nicht erreichen und auch nicht entkommen können (Abbildung 9). Wildtypfliegen patrouillieren normalerweise zwischen den beiden Landmarken, die in Abbildung 50 als schwarze Balken neben den Laufspuren markiert sind, hin und her. Das heißt, wildtypische Fliegen fixieren bzw. antifixieren Landmarken.

Das mittels der *1.3TβH-GAL4*-Linie getriebene GFP-Expressionsmuster zeigt Innervationen des Fächerförmigen Körpers, als Teil des Zentralkomplexes und Zellen im SOG (Abbildung 21). Es wurde publiziert, dass Strukturen des Zentralkomplexes eine essentielle Rolle in der Lokomotion aufweisen (STRAUSS 2002; STRAUSS and HEISENBERG 1993).

Die w^{1118} ; *1.3TβH-GAL4/UAS-Kir2.1* Fliegen haben einen Defekt in der Entwicklung von wildtypischer Ethanol sensitivität. Falls die Fliegen ebenfalls einen Defekt im Laufverhalten und in ihrer Aktivität haben, könnte die verlängerte Zeit im Inebriometer nicht auf Verlust der posturalen Kontrolle zurück zuführen sein. Es wäre somit möglich, dass bei geringerer Aktivität die Fliegen, diese weniger Fehler bei ihrer Schrittfolge machen und nicht aus dem Inebriometer fallen.

Im Gegensatz zu den Kontrollgruppen (w^{1118} ; *1.3TβH-GAL4/+* und w^{1118} ; *UAS-Kir2.1/+*) zeigt die Testgruppe (w^{1118} ; *1.3TβH-GAL4/UAS-Kir2.1*) ein eindeutiges Defizit in der Fähigkeit der Fixation

und Antifixation von Landmarken. Bei den Testtieren ist ein zirkuläres randständiges Laufmuster erkennbar. Diese Beobachtung legt nahe, dass $1.3T\beta H$ -GAL4 Neurone eine Funktion bei der Wahrnehmung von Landmarken haben

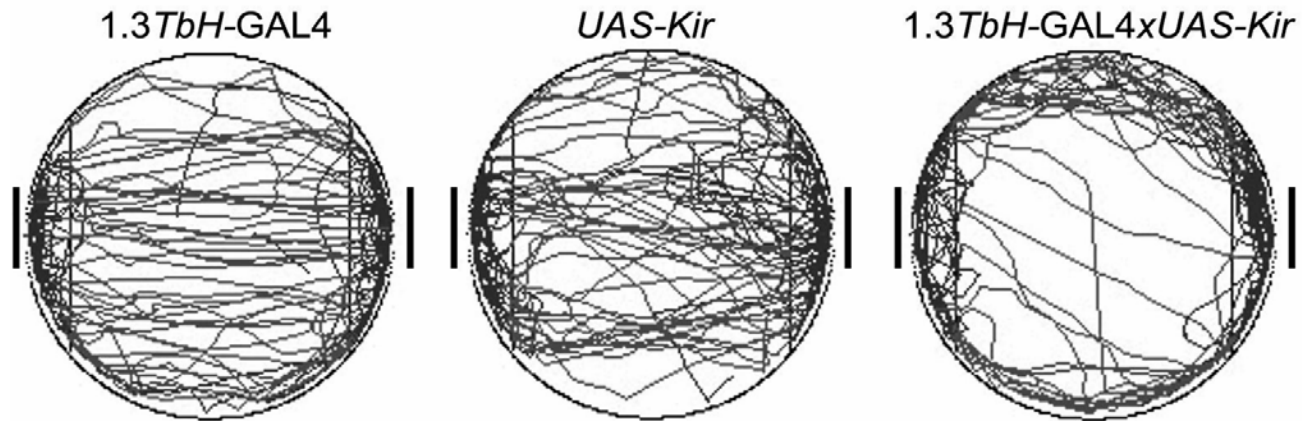


Abbildung 50: Durch das Ausschalten von $w^{118};1.3T\beta H$ -GAL4/ UAS - $Kir2.1$ Neuronen kommt es zu starken Einschränkungen der Fixation bzw. Antifixation von Landmarken

Abgebildet sind aufgezeichnete repräsentative Laufspuren von Kontrollgruppen ($w^{118}; 1.3T\beta H$ -GAL4/+ und $w^{118}; UAS$ - $Kir2.1$ /+) und der experimentellen Gruppe ($w^{118}; 1.3T\beta H$ -GAL4/ UAS - $Kir2.1$). Diese wurden im Buridan Paradigma gemessen. Die Kontrollfliegen patrouillieren zwischen den Landmarken (schwarze Balken). Die Testgruppe dagegen kann den Prozess der Fixation und Antifixation der Landmarken nicht im gleichen Ausmaß wie der Wildtyp durchführen.

Die Präferenz der Fliegen am Rand entlang zu laufen, wurde zusätzlich noch mit statistisch ausgewerteten Daten in der Abbildung 51 dargestellt. Kontrollfliegen laufen etwa 50% der gemessenen Zeit entlang des Plattformrandes. Dabei wird deutlich, dass die Testgruppe 20 % mehr Zeit am Rand der Plattform verbringt als die Kontrollgruppen.

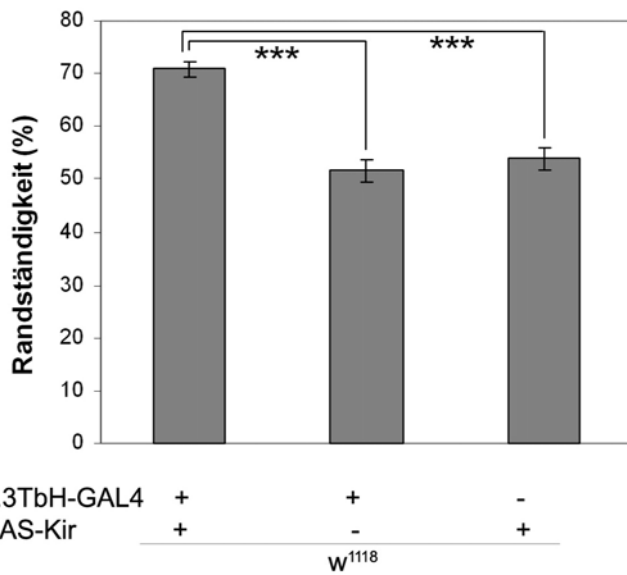


Abbildung 51: Das Inaktivieren von $w^{1118}; 1.3T\beta H-GAL4/UAS-Kir2.1$ Neuronen hat Einfluss auf die Randständigkeit der Fliegen

Laufspuren von Kontrollgruppen ($w^{1118}; 1.3T\beta H-GAL4/+$ und $w^{1118}; UAS-Kir2.1/+$) und der experimentellen Gruppe ($w^{1118}; 1.3T\beta H-GAL4/UAS-Kir2.1$) werden mittels Videokamera aufgezeichnet und anschließend ausgewertet. Da die experimentelle Gruppe kein Fixations- bzw. Antifixationsverhalten zu der Landmarke zeigte, lief diese die meiste Zeit entlang des Arenarandes, anstatt zwischen den Landmarken zu patrouillieren. Die am Arenarand verbrachte Zeit wird dabei als %-Anteil der gesamten Zeit in dem Balkendiagramm dargestellt ($w^{1118}; 1.3T\beta H-GAL4/+$: $51,57 \pm 2,02$ %; $w^{1118}; UAS-Kir2.1/+$: $53,86 \pm 2,16$ %; $w^{1118}; 1.3T\beta H-GAL4/UAS-Kir2.1$: $70,86 \pm 1,37$ %). Wie ersichtlich

verbrachte die experimentelle Gruppe 70 % der gemessenen Zeit am Arenarand, hingegen die Kontrollgruppen nur zwischen 50-55 %. Die Testgruppe ist signifikant unterschiedlich zu den Kontrollgruppen in der Präferenz am Rand zu laufen. Fehlerbalken repräsentieren den SEM und $p^{***} \leq 0.001$. Die Anzahl der getesteten Fliegen beträgt $n \geq 14$.

Weiterhin kann gezeigt werden, welche Winkel die getesteten Fliegen beim Anlauf auf eine fixierte Landmarke einnahmen (Abbildung 52). Fliegen die direkt auf die gezeigte Landmarke zulaufen haben einen Fehlerwinkel von 0° . Hingegen bei dem größten möglichen Fehlerwinkel von 118° läuft die Fliege direkt auf die Seiten zu, die 90° zu den Landmarken stehen. Der Fehlerwinkel ist dabei die Abweichung der Richtung, gemessen in Bezug auf die Landmarke. In der Abbildung 52 werden die Daten der Abbildung 50 und Abbildung 51 detaillierter dargestellt. Auf diese Art und Weise wird die Häufigkeit der jeweiligen Fehlerwinkel angegeben, wie oft die verschiedenen Fehlerwinkel in den 15 min gemessen wurden. Die Kontrollgruppen (blau und gelb) zeigen eine offensichtlich signifikant höhere Häufigkeit, direkt auf die Landmarken zu zugehen, im Gegensatz zur Testgruppe (rosa).

Abbildung 52 zeigt, dass die Testgruppe $w^{1118}; 1.3T\beta H-GAL4/UAS-Kir2.1$ dieselben Häufigkeiten an 0° - 50° Fehlerwinkeln in Bezug auf die Landmarken gelaufen sind. Die Kontrollgruppe $w^{1118}; 1.3T\beta H-GAL4/+$ hingegen verhält sich wildtypisch, da die Fliegen die höchste Häufigkeit des

Fehlerwinkels von 0° haben. Die zweite Kontrollgruppe verhält sich zwar auch wildtypisch, hat jedoch eine leichte Präferenz nach links.

Es wäre möglich, dass dies auf die geringe Menge an White-Protein zurückzuführen ist. Da sich alle gemessenen Fliegen im *white* Hintergrund befinden, resultiert das exprimierte White-Protein aus wieder eingebrachten *mini-white* Genen der *UAS*- bzw. GAL4-P Elemente. Je nachdem, ob das *white* Gen stark oder schwach transkribiert wird, variiert die Augenfarbe der Fliegen von gelb bis dunkelrot. Die orangene Augenfarbe der Kontrolle $w^{118}; UAS-Kir2.1/+$ scheint die Erkennung der Landmarken geringfügig beeinflusst zu haben. Hingegen die Augenfarben der zweiten Kontrollgruppe $w^{118}; 1.3T\beta H-GAL4/+$ und der Testgruppe $w^{118}; 1.3T\beta H-GAL4/UAS-Kir2.1$ waren dunkelrot. Die Sehfähigkeit sollte demnach nicht beeinträchtigt sein.

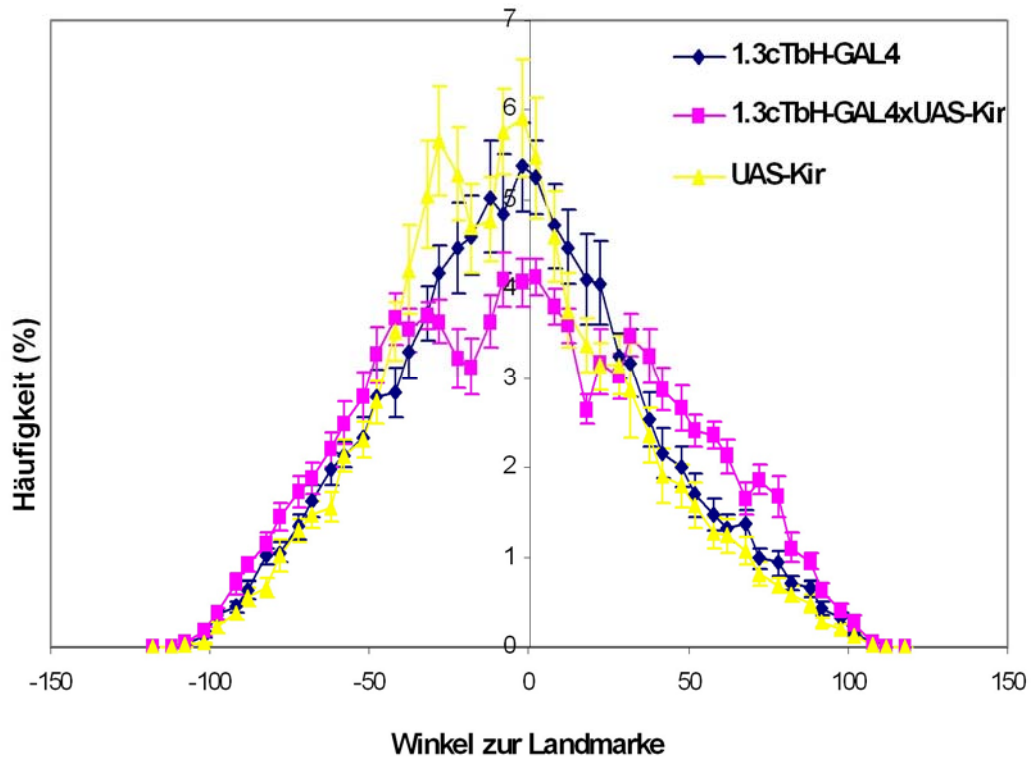


Abbildung 52: Das Ausschalten von 1.3*TβH*-GAL4 positiven Neuronen beeinflusst die Prozesse der Fixation und Antifixation von Landmarken.

Die experimentelle Gruppe (rosa) zeigt kein eindeutiges Fixieren der Landmarken, da die Winkel zur Landmarke von 0°-118° gestreut sind und keine eindeutige Häufigkeit des Winkels 0° auftritt. Hingegen die gelaufenen Winkel der Kontrollfliegen (gelb+blau) zeigen eine deutlich höhere Häufigkeit des Winkels 0°. Der Winkel 0° würde bedeuten, die Fliege läuft direkt auf die Landmarke zu, hingegen der Winkel ± 118°, dass sie am weitesten Punkt entfernt von der Landmarke läuft. Die Kontrollgruppen zeigen offensichtlich gegenüber der Testgruppe eine eindeutige Präferenz zu den Landmarken.

Die Laufdaten können nach Anzahl der Läufe, der zurückgelegten Distanz, der Geschwindigkeit und der Aktivität über den Zeitraum von 15 min ausgewertet werden. Die Auswertung erfolgt dabei mit einer selbst geschriebenen Software (Tilman Triphan), um zu zeigen, dass die Testgruppe ($w^{118}; 1.3T\beta H\text{-GAL4}/UAS\text{-Kir}2.1$) keine grundlegenden lokomotorischen Defekte gegenüber den Kontrollgruppen ($w^{118}; 1.3T\beta H\text{-GAL4}/+$ und $w^{118}; UAS\text{-Kir}2.1/+$) aufweist.

Die Anzahl der ausgeführten Läufe bei den Kontrollgruppen ist signifikant höher als bei der Testgruppe. Beide Kontrollgruppen zeigen ungefähr 12 Läufe mehr gegenüber der experimentellen Gruppe (Abbildung 53 A). Dem gegenüber wurde jedoch kein signifikanter Unterschied in der zurückgelegten Distanz zwischen den Kontrollgruppen und der Testgruppe nachgewiesen

(Abbildung 53 B). Somit scheinen die Kontrollgruppen in einer höheren Anzahl an Läufen dieselbe Distanz zu laufen, wie die Testgruppe in einer geringeren Anzahl. Das heißt, dass die $w^{118}; 1.3T\beta H-GAL4/UAS-Kir2.1$ Fliegen konstanter als die Kontrollgruppen laufen, ohne Unterbrechungen der Läufe zu machen. Demzufolge haben die Testfliegen keinen Defekt in der Lokomotion.

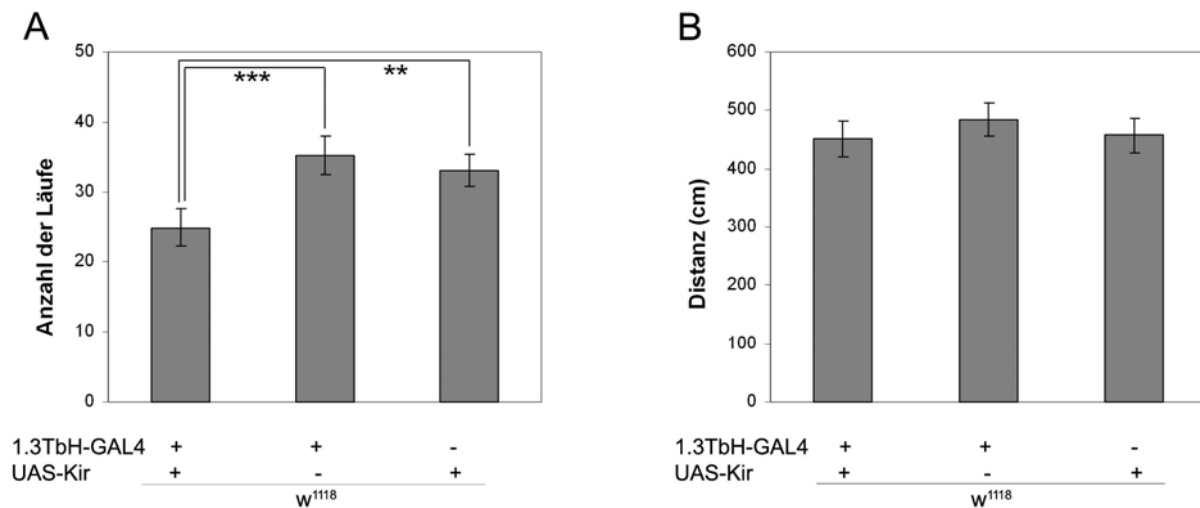


Abbildung 53: Das Inaktivieren von $w^{118}; 1.3T\beta H-GAL4/UAS-Kir2.1$ Neuronen hat (A) Einfluss auf die Anzahl der unternommenen Läufe, verändert jedoch nicht (B) die zurückgelegte Distanz

Laufspuren von Kontrollgruppen und der experimentellen Gruppe werden mittels Videokamera aufgezeichnet und anschließend ausgewertet ($w^{118}; 1.3T\beta H-GAL4/+$; $w^{118}; UAS-Kir2.1/+$; $w^{118}; 1.3T\beta H-GAL4/UAS-Kir2.1$). **(A)** Die Anzahl der unternommenen Läufe ist bei den Kontrollgruppen signifikant höher, als bei der experimentellen Gruppe ($w^{118}; 1.3T\beta H-GAL4/UAS-Kir2.1$: $24,9 \pm 2,7$; $w^{118}; 1.3T\beta H-GAL4/+$: $35,2 \pm 2,8$; $w^{118}; UAS-Kir2.1/+$: $33,1 \pm 2,4$). **(B)** Demgegenüber ist kein signifikanter Unterschied zwischen den Kontrollfliegen und der Testgruppe bei der zurückgelegten Distanz zu verzeichnen ($w^{118}; 1.3T\beta H-GAL4/UAS-Kir2.1$: $451,6 \pm 30$ cm; $w^{118}; 1.3T\beta H-GAL4/+$: $483,7 \pm 28,8$ cm; $w^{118}; UAS-Kir2.1/+$: $457,3 \pm 28,7$ cm). Fehlerbalken repräsentieren SEM und $p^{**} \leq 0,01$, $p^{***} \leq 0,001$. Die Anzahl der beobachteten Tiere ist $n \geq 14$.

Die durchschnittliche Geschwindigkeit der zurückgelegten Läufe zeigt keinen signifikanten Unterschied zwischen Kontrollgruppen und der Testgruppe $w^{118}; 1.3T\beta H-GAL4/UAS-Kir2.1$ (Abbildung 54). Alle drei Gruppen laufen ca. 8 Millimeter pro Sekunde (Abbildung 54 A). Bei der Messung der Aktivität ist ebenfalls zwischen den Kontrollgruppen und der Testgruppe kein signifikanter Unterschied zu erkennen (Abbildung 54 B). Die drei Gruppen weisen eine durchschnittliche Laufaktivität von ca. 40% in der gemessenen Zeit auf.

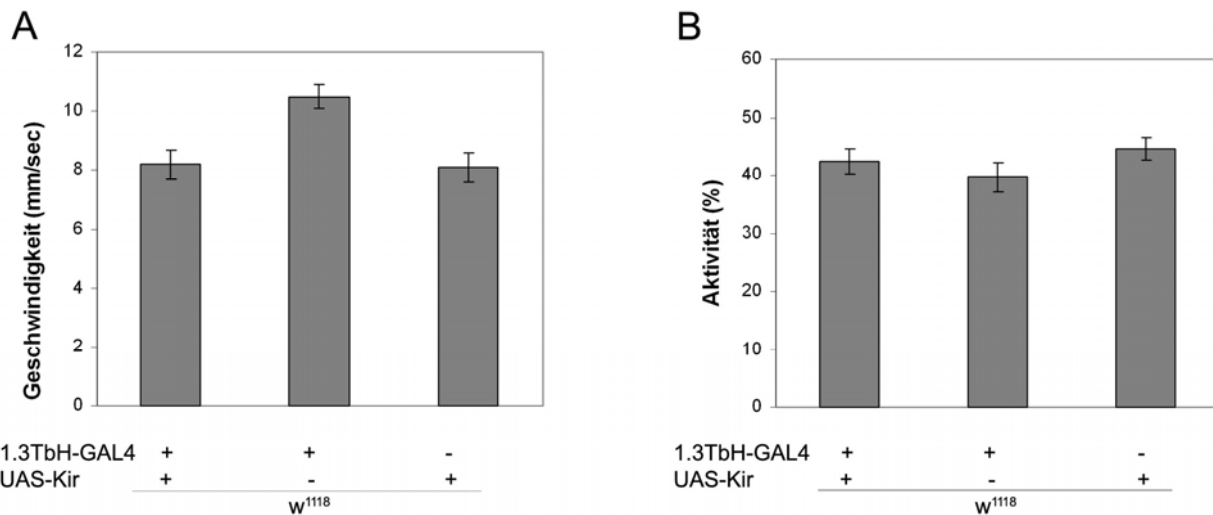


Abbildung 54: Die Inaktivierung von $w^{1118}; 1.3T\beta H-GAL4/UAS-Kir2.1$ Neuronen, die unter anderem den Fächerförmigen Körper innervieren, hat keinen Einfluss (A) auf die Geschwindigkeit beim Laufen, sowie (B) auf die Aktivität der Fliegen.

Laufspuren von Kontrollgruppen ($w^{1118}; 1.3T\beta H-GAL4/+$; $w^{1118}; UAS-Kir2.1/+$) und der experimentellen Gruppe ($w^{1118}; 1.3T\beta H-GAL4/UAS-Kir2.1$) wurden mittels Videokamera aufgezeichnet. (A) Die durchschnittliche Geschwindigkeit der Kontrollgruppen unterscheidet sich nicht signifikant von der experimentellen Gruppe ($w^{1118}; 1.3T\beta H-GAL4/UAS-Kir2.1$: $8,2 \pm 0,5$ mm/s; $w^{1118}; 1.3T\beta H-GAL4/+$: $10,5 \pm 0,4$ mm/s; $w^{1118}; UAS-Kir2.1/+$: $8,1 \pm 0,5$ mm/s). (B) Ebenso bei der Aktivität ist kein signifikanter Unterschied zwischen den Kontrollfliegen und der Testgruppe zu erkennen ($w^{1118}; 1.3T\beta H-GAL4/UAS-Kir2.1$: $42,39 \pm 2,25$ %; $w^{1118}; 1.3T\beta H-GAL4/+$: $39,68 \pm 2,48$ %; $w^{1118}; UAS-Kir2.1/+$: $44,55 \pm 1,87$ %). Die Fehlerbalken repräsentieren den SEM. Die Anzahl der Versuchsdurchführungen beträgt $n \geq 14$.

Es ist möglich, dass die Experimentelle Gruppe die Landmarken nicht erkennen kann und deshalb nicht fixiert. Um dies auszuschließen wurde die Optomotorik der Fliegen getestet. Bei dem Optomotorik Test wird die Fähigkeit der Fliegen analysiert, die Rotation eines um sie drehenden Musters zu kompensieren (STRAUSS et al. 1997). Hierbei wurden Fliegen mit gestutzten Flügeln auf eine Laufplattform in einer LED-Arena gesetzt. Ein Muster, bestehend aus vertikalen schwarzen und weißen Streifen rotierte dabei 5 min nach links und im darauf folgenden Durchgang in Richtung rechts um die Fliege. Bei der optomotorischen Kompensation versucht die Fliege nun die Drehbewegung des Musters durch ihre Eigenbewegung mit dem Muster auszugleichen, wobei die Anzahl der Drehungen der Fliege in 5 min Intervallen gezählt wurde. In welche Richtung sich das Muster zuerst bewegte war zufällig. Vergleicht man nun die Kontrollgruppen mit den experimentellen Fliegen, so kann kein signifikanter Unterschied in der Fähigkeit der

optomotorischen Kompensation erkannt werden (Abbildung 55). Alle getesteten Fliegen zeigten Kompensation von über 85 %. Das heißt, die Fliegen können sehen.

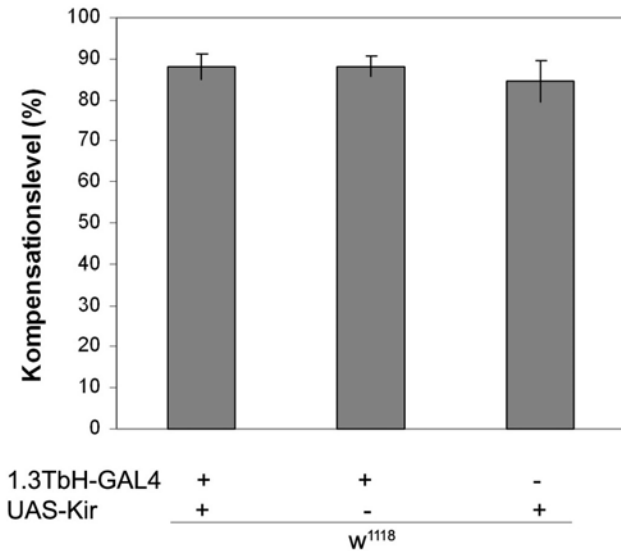


Abbildung 55: Die Optomotorik ist in $1.3T\beta H-GAL4; UAS-Kir2.1$ transgenen Fliegen wildtypisch.

In einer LED-Arena werden *Drosophila melanogaster* Männchen auf die Fähigkeit getestet, die Rotation eines sie umgebenden Musters zu kompensieren. Kontrollgruppen sowie die Testgruppe unterscheiden sich nicht signifikant in ihrer Kompensations-Fähigkeit voneinander ($w^{1118}; 1.3T\beta H-GAL4/UAS-Kir2.1$: 88,1 ± 3,13 %; $w^{1118}; 1.3T\beta H-GAL4/+$: 88,1 ± 2,5 %; $w^{1118}; UAS-Kir2.1/+$: 84,5 ± 4,9 %).

Schlussfolgernd kann dazu gesagt werden, dass der Phänotyp im Fixations- bzw. Antifixationsprozess der in den $w^{1118}; 1.3T\beta H-GAL4/UAS-Kir2.1$ Fliegen ausgelöst wird, nicht als Folge von Blindheit auftritt. Demzufolge wäre es möglich, dass die Verarbeitung von visuellem Input in den $1.3T\beta H-GAL4$ -positiven Neuronen vermittelt wird.

4 Diskussion

4.1 Die Untersuchung des „T β H“-Expressionmusters zeigt keine Korrelation mit dem von Oktopamin auf.

Das T β H-Protein weist in 39 % seiner DNA-Sequenz Homologie zu der menschlichen Dopamin- β -Hydroxylase (D β H) auf (MONASTIRIOTI et al. 1996; PONTING 2001). Da die D β H im Vertebraten das Enzym ist, welches Dopamin zu Noradrenalin konvertiert (BLAKELY et al. 1994; KAMACHI et al. 2005; ROEDER 1999), deutet diese partielle Sequenzhomologie darauf hin, dass die Synthese von Noradrenalin aus Dopamin im Vertebraten mit einem der Tyramin- β -Hydroxylase ähnlich strukturierten Enzyms stattfindet. Mittels HPLC kann zudem Noradrenalin wie auch Oktopamin in der Fruchtfliege nachgewiesen werden (DAVID and COULON 1985; MCCAMAN *et al.* 1972). In Ermangelung einer D β H in der Fliege liegt daher nahe, dass die T β H in unterschiedlichen Zellen für die Synthese von entweder Oktopamin oder Noradrenalin verantwortlich ist. (ROEDER 2005). Dazu könnte die T β H in jeweils unterschiedlichen Zellen vorliegen, um die unterschiedlichen Aufgaben erfüllen.

Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass in der Oktopamin Nullmutante *T β H^{M18}* (MONASTIRIOTI et al. 1996) noch Transkript des *T β H* Gens vorhanden ist, welches jedoch nicht die Sequenz des zweiten Exons beinhaltet. Dies kann entweder damit erklärt werden, dass ein um 9kDa verkürztes und damit im Rahmen der Oktopaminsynthese funktionsloses T β H-Protein in der Mutante exprimiert wird oder dass aufgrund der Deletion des zweiten Exons der *T β H* kein nachweisbares T β H-Protein mehr exprimiert wird (MONASTIRIOTI et al. 1996).

Aufgrund des Defizits von Oktopamin in der *T β H^{M18}* Mutante, kann davon ausgegangen werden, dass in diesen Tieren die Synthese von Oktopamin mittels T β H nicht mehr durchgeführt wird (MONASTIRIOTI et al. 1996). Würde jedoch ein funktionsloses Protein teilweise dieselbe Proteinstruktur der funktionellen T β H aufweisen, so könnte das „T β H“-Antiserum identische Epitope beider Proteine detektieren. Auf diese Weise würde der „T β H“-Expressionslevel der

Mutante so hoch erscheinen wie der des Wildtyps. Genau dieses Ergebnis konnte mittels ELISA gezeigt werden.

Um diese Ergebnisse zu verifizieren wurde mittels Westernblot die Spezifität des „TβH“ Serums bestimmt (CIBIC 2007). Da der bereits existierende TβH Antikörper (MONASTIRIOTI et al. 1996) nicht verfügbar gemacht werden konnte, war eine Kontrollfärbung gegen die Tyramin-β-Hydroxylase, mit diesem als TβH-spezifisch publizierten Antikörper nicht möglich. Somit konnten die Proteinbanden des „TβH“-Antiserums nicht zweifelsfrei dem TβH-Protein zugeordnet werden. Zudem wurde beim Vergleich der Proteinbanden von Wildtypfliegen mit denen der *TβH^{M18}* Mutante kein Unterschied festgestellt. Demzufolge erkennt das „TβH“-Antiserum wahrscheinlich nicht spezifisch die Tyramin-β-Hydroxylase, die verantwortlich für die Synthese von Oktopamin ist.

Dieses Ergebnis wird durch die Ergebnisse der immunohistochemischen Untersuchungen bestätigt. Der Vergleich der relativen Lage der Expressionsmuster von „TβH“ und Oktopamin zeigt, dass das „TβH“-Antiserum keine oktopaminergen Zellen anfärbt (SINAKEVITCH and STRAUSFELD 2006). Von einer anderen Seite betrachtet, färbt das verwendete Oktopamin-Antiserum auch nur etwa die Hälfte der Zellen des publizierten Oktopamin-Expressionsmusters (SINAKEVITCH and STRAUSFELD 2006). Daher wäre es also trotzdem möglich, dass „TβH“-positive Zellen oktopaminerg sind.

4.2 Die Expression eines *hsp70-TβH* Transgens rettet tendenziell die reduzierte Ethanoltoleranz in der *TβH^{M18}* Mutante.

Aufgrund fehlender TβH-Funktion zeigt die *TβH^{M18}* Mutante eine reduzierte Ethanoltoleranz (SCHOLZ et al. 2000). Um den Defekt der *TβH^{M18}* Mutante im ethanolinduzierten Verhalten zu retten wurde die wildtypische *TβH*-cDNA mittels eines Hitzeschocks exprimiert (*hsp70-TβH*) (SCHWAERZEL et al. 2003). Schwaerzel et al. 2003 konnte mit diesem Transgen durch Hitzeschockinduktion die TβH exprimieren und auf diese Weise einen Defekt im Zuckerbelohnungslernen retten. Somit wurde die Funktionalität des Transgens gesichert.

Bei der Auswertung unserer Daten mittels T-Test konnte jedoch keine Rettung der Ethanoltoleranz gezeigt werden. Ein Grund für die nur tendenzielle Rettung könnte sein, dass der Hitzeschock nicht intensiv genug war, oder zu früh vor der Messung gegeben wurde, so dass die TβH schon wieder abgebaut wurde.

Um auszuschließen, dass der Hitzeschock zum falschen Zeitpunkt gegeben wurde, wurde ein Rettungsversuch unternommen, bei dem die *TβH*-cDNA durch die gesamte Entwicklung mittels der *AppI*-GAL4-Linie getrieben wurde. Da jedoch bei diesem Experiment die reduzierte Ethanoltoleranz der Mutante nicht gerettet werden konnte, wirft dies die Frage auf, ob das Transgen nicht stark genug exprimiert wurde, oder möglicherweise das *UAS-TβH* Transgen nicht funktionell ist. Obwohl der modulatorische Einfluss unterschiedlicher Oktopaminkonzentrationen auf verschiedene Verhaltensmuster viel diskutiert ist und die Experimente zum ethanolinduzierten Verhalten in diese Richtung weisen (siehe Diskussion 4.5), können hier jedoch keine Evidenzen dafür angeführt werden. Dass das *UAS-TβH* Transgen nicht funktionell ist, kann ausgeschlossen werden, da das verwendete Konstrukt erfolgreich für die Rettung des Defekts im Zuckerbelohnungslernen benutzt wurde (persönliche Kommunikation S. Knappek). Alternativ stellt sich daher die Frage, ob die *TβH*-cDNA des Rettungskonstruktes in den für die Ethanoltoleranz verantwortlichen Zellen exprimiert wurde. Die meisten der als panneural publizierten GAL4-Linien zeigen im adulten Tier kein panneurales GAL4-Expressionsmuster (persönliche Kommunikation A. Jenett). Damit wäre es möglich, dass die verwendete *AppI*-GAL4-Linie (GUNAWARDENA and GOLDSTEIN 2001) tatsächlich nicht panneural ist, was den unverändert mutanten Phänotypen erklären würde.

4.3 Spezifische Kolokalisation von Neuronen der verschiedenen *TβH*-Promotor-GAL4-Linien mit „TβH“ und Oktopamin.

Aus der *TβH* Promoterregion wurden unterschiedlich große Fragmente verwendet, um möglichst spezifische *TβH*-GAL4-Linien herzustellen. Bei den neuroanatomischen Analysen der *TβH*-GAL4-Linien wurden Kolokalisationen von oktopaminergen und „TβH“-positiven Zellen erwartet, da die

Katalyse von Oktopamin durch die T β H gewährleistet wird und somit beide zumindest in einigen Zellen überlappen sollten (CARLSSON and WALDECK 1963; ROEDER 1999). Bevor Aussagen über die Spezifität des „T β H“-Antiserums gemacht werden konnten, wurden Kollokalisationsstudien mit den GFP-Expressionsmustern der verschiedenen *T β H*-GAL4-Linien durchgeführt.

Mit dem polyklonalen „T β H“-Antiserum konnten nur acht caudal kollokalisierende Neurone der Linien 4.6*T β H*-GAL4 und 6.6*T β H*-GAL4 detektiert werden. Beim Vergleich der relativen Lage dieser Zellen im Gehirn, kann man davon ausgehen, dass es sich bei beiden Linien um die selben Zellen handelt. Zudem überlappen zwei andere GFP-markierte Zellen der Linie 650*T β H*-GAL4 in der Pars intercerebralis (PI) mit der „T β H“-Färbung.

Des Weiteren wurden die verschiedenen *T β H*-GAL4-Linien mit Oktopamin kollokalisiert. Es befindet sich bei dem Expressionsmuster der 6.2*T β H*-GAL4-Linie ein GFP-positiver Zellkörper ventral des SOGs, welcher mit Oktopamin kollokalisiert. Da es Oktopamin-positiv ist und aufgrund seiner Lokalisation, liegt die Vermutung nahe, dass es sich bei diesem Neuron um ein VUM-Neuron handelt (HAMMER and MENZEL 1998; SINAKEVITCH and STRAUSFELD 2006). Ebenso konnten vier große oktopaminerge Zellkörper im caudalen Bereich des Gehirns in der 6.2*T β H*-GAL4-Linie identifiziert werden. Diese wurden in bisherigen Veröffentlichungen nicht beschrieben. Da sie nur schwach gefärbt sind, ist es denkbar, dass die Oktopamin-Konzentration in diesen Zellen relativ niedrig ist. Aufgrund dessen liegt nahe, dass diese Zellen nicht konsistent detektierbar sind. Da der Oktopamin-Antikörper eine Kreuzreaktion gegen Tyramin aufweist, kann zudem nicht ausgeschlossen werden, dass die kollokalisierenden Zellen eventuell tyraminerg sind und nicht zwangsläufig oktopaminerg sein müssen (persönliche Kommunikation M. Selcho).

Mit den vorliegenden Daten können die mit den *T β H*-GAL4-Linien getriebenen GFP-Expressionsmuster nicht dem veröffentlichten Expressionsmuster von Oktopamin zugeordnet werden (SINAKEVITCH and STRAUSFELD 2006). Eine Erklärung dafür wäre, dass in Whole-mount Präparaten meist weniger Zellen gefärbt werden, als in Kryostatschnitten, wie sie in anderen Publikationen verwendet wurden (DACKS et al. 2005; SINAKEVITCH et al. 2005). Die Epitope in

Schnitten sind leichter zugänglich und da die Penetration des Antikörpers nicht durch umgebendes Gewebe behindert wird. Dies legt nahe, dass sich in Schnitten auch mit dem in dieser Arbeit verwendeten Antikörper eine höhere Anzahl an oktopaminergen Neuronen nachweisen lässt, welche gegebenenfalls mit den *TβH*-GAL4-Expressionsmustern kolokalisieren.

4.4 Die für die GAL4-Konstrukte verwendeten fünf Promotorfragmente des *TβH* Gens enthalten partiell überlappende regulatorische Informationen.

Für die Klonierung der verschiedenen *TβH*-GAL4-Linien wurden fünf unterschiedlich lange Promotorsequenzen des *TβH* Gens verwendet. Aus den resultierenden GFP-Expressionsmustern wurden Rückschlüsse auf die Organisation des *TβH*-Promotors erwartet.

Die Linien 650*TβH* GAL4 und 6.6*TβH* GAL4 weisen zum Beispiel Expression in der Blut-Hirn Schranke auf (DANEMAN and BARRES 2005). Dies legt nahe, dass die gleichen regulatorischen Elemente in den für die GAL4-Linie verwendeten Promotorelementen aktiv sind. Fünf 650*TβH*-GAL4-Linien und zwei 6.6*TβH*-GAL4-Linien, deren Insertionsorte des *TβH*-GAL4 Konstruktes variieren, wurden untersucht. Bei allen Expressionsmustern der untersuchten Transformanten der 650*TβH*-GAL4 und der 6.6*TβH*-GAL4-Linien, konnte die Blut-Hirn-Schranke detektiert werden. Demzufolge kann die GAL4-Expression in diesem Gewebe kein Effekt des Insertionsortes der P-Elemente sein. Diese Färbung ist des Weiteren kein Fixationsartefakt, oder auf unspezifische Bindung der Antikörper zurückzuführen. Sie ist auch ohne Antikörperfärbung unter dem konfokalen Mikroskop detektierbar. Die Lokalisation zusätzlicher Zellen, die sich im Zentralgehirn befinden, variiert hingegen in der Gruppe der 650*TβH*-GAL4 Insertionslinien. Dies legt einen Positionseffekt der genomischen Sequenz, in die das P-Element inserierte, nahe (BELLEN et al. 2004; BRAND and PERRIMON 1993; LEVINE and TJIAN 2003).

Die Sequenz der 650*TβH*-GAL4-Linie ist Teil der Promotorfragmente aller hergestellten *TβH*-GAL4-Linien. Jedoch konnte die Blut-Hirn-Schranke in nur zwei der fünf Expressionsmustern der untersuchten *TβH*-GAL4-Linien gezeigt werden. In den zusätzlichen verwendeten Sequenzen

scheinen somit Repressoren für diese Expression aktiv zu sein. Möglicherweise enthält die zusätzliche DNA-Sequenz des 6.6kb Fragmentes wiederum regulatorische Elemente, welche die reprimierenden Elemente unterdrücken.

Bei den Expressionsmustern der hergestellten *TβH*-GAL4-Linien sind wenige Zellen gefärbt, die potentiell in mehreren GAL4-Linien überlappen. Vergleicht man die Expressionsmuster der 6.50*TβH*-GAL4, 4.6*TβH*-GAL4 und 6.2*TβH*-GAL4-Linien, so können als Gemeinsamkeit Zellen in der Pars intercerebralis detektiert werden. Demnach scheint die regulatorische Information für die Expression in diesem Areal bei allen drei Fragmenten enthalten und aktiv sein.

Zudem sind bei den Linien 4.6*TβH*-GAL4 und 6.2*TβH*-GAL4 gekreuzt mit *UAS-mCD8-GFP* unter anderem Ringneurone gefärbt. Die Zugehörigkeit der Neurone in spezielle Ringneuronencluster konnte durch Vergleich der relativen Position der Zellen im Gehirn, mit den publizierten Ringneuronenclustern bestimmt werden (HANESCH 1989; RENN et al. 1999). Somit sind regulatorische Elemente, die die Expression des GAL4-Proteins in Ellipsoid Körper Neuronen treiben, in beiden *TβH*-Promotorfragmenten vorhanden. Auf der anderen Seite beinhaltet das verwendete 6.6kb Fragment das 4.6kb Promotorfragment. Man würde nun erwarten, dass wie in der 4.6*TβH*-GAL4-Linie ebenfalls Strukturen des Zentralkomplexes bei dem 6.6*TβH*-GAL4-Expressionsmuster markiert werden. Es ist jedoch keinerlei Überlappung der beiden Expressionsmuster zu erkennen. Dies lässt darauf schließen, dass zur Regulation des *TβH* Gens eine Vielzahl von regulatorischen Elementen nötig ist. Die komplexe und weit reichende Anordnung der regulatorischen Elemente machte die Klonierung einer spezifischen *TβH*-GAL4-Linie zum Zeitpunkt dieser Arbeit unmöglich. Neu etablierte molekularbiologische Methoden zur gezielten Insertion von bis zu 133 kb großen DNA-Fragmenten können jedoch solche Projekte in Zukunft ermöglichen (VENKEN and BELLEN 2007).

Die Enhancer Trap Linie NP938, bei der das GAL4 P-Element in die 5' Promotor Sequenz des *TβH* Gens inseriert ist (<http://flybase.bio.indiana.edu/reports/FBgn0010329.html>, Datenbank des NP Konsortiums), wurde mit in die Untersuchung aufgenommen. Bei dieser wird davon ausgegangen,

dass sie das wildtypische T β H-Expressionsmuster reflektiert. Es kann nicht eindeutig gezeigt werden, dass das getriebene Expressionsmuster dem von T β H entspricht, da keine Kolokalisationsstudien mit einem Antikörper durchgeführt werden konnte, der spezifisch die Tyramin- β -Hydroxylase erkennt (MONASTIRIOTI et al. 1996). Mit Hilfe des „T β H“-Antiserums konnten nur zwei große caudale Zellen mit dem NP938-Expressionsmuster kolokalisiert werden. Das NP938-Expressionsmuster enthält mehrere hundert Zellen, wovon die meisten keine Oktopamin Immunoreaktivität aufweisen. Nur etwa 16 dieser GFP-positiven Zellen sind oktopaminerg. Die restlichen GFP-positiven Zellen zeigen auch beim Vergleich ihrer relativen Lage keine Ähnlichkeit mit der Lokalisation Oktopamin-positiver Zellen. Demzufolge könnte das NP938 GAL4-Expressionsmuster entweder nicht nur von genregulatorischen Elementen des *T β H* Gens getrieben werden, sondern auch von denen anderer Gene. Auch denkbar ist, dass es neben den oktopaminergen auch die noradrenergen Zellen im Fliegengehirn beinhaltet. Dies würde die deutlich größere Ausdehnung dem oktopaminergen Expressionsmuster gegenüber rechtfertigen.

4.5 Unterschiedliche Konzentrationen an Oktopamin regulieren unter anderem das ethanolinduzierte Verhalten.

Oktopamin und Tyramin sollten in denselben Zellen synthetisiert werden (ROEDER 1999; SINAKEVITCH and STRAUSFELD 2006). Es konnte bisher nicht gezeigt werden, wie viele Zellen existieren, die nur Tyramin enthalten ohne Oktopamin zu katalysieren. Somit gibt es etwa 100 Zellen, die tyraminerg und zudem oktopaminerg sind (SINAKEVITCH and STRAUSFELD 2006). Die Konzentrationen an Tyramin im Gehirn sind jedoch um den Faktor von etwa 30 geringer als die von Oktopamin (MONASTIRIOTI et al. 1996).

In dieser Arbeit wurde daher *Tdc2*-GAL4 als eine GAL4-Linie untersucht, die tyraminerge Zellen enthält. Zudem wurde analysiert, welche neuronalen Areale dabei eine besondere Rolle im ethanolinduzierten Verhalten spielen. Die Tyrosin-Decarboxylase (Tdc) ist das Enzym, welches Tyrosin in Tyramin konvertiert. Da Tyramin der Vorläufer von Oktopamin ist, wurde erwartet, dass einige der Tdc enthaltenden Zellen ebenfalls oktopaminerg sind (COLE et al. 2005).

Das Expressionsmuster der GAL4-Linie zeigt tatsächlich Kolo­kalisierung mit Oktopamin in mindestens 34 Neuronen. Bei Inhibition der Neurotransmission von *Tdc2*-GAL4-positiven Neuronen mit *UAS-Kir2.1* entwickeln die Fliegen erhöhte Ethanol­sensitivität. Es ist jedoch keine Veränderung der Toleranz zu verzeichnen. Im Bezug auf Tyramin steht dies im Gegensatz zu den Beobachtungen an *TβH^{M18}* Fliegen, die aufgrund des Verlusts der TβH-Funktion eine 10 mal größere Menge an Tyramin aber kein Oktopamin aufweisen. Sie entwickeln jedoch keine veränderte Ethanol­sensitivität, aber eine reduzierte Toleranz (SCHOLZ et al. 2000). Die mutante Fliegenlinie *Honoka* trägt eine Mutation im Tyramin Rezeptor, kann also auf tyraminerge Signale nicht reagieren. Sie entwickelt in Inebriometer jedoch eine wildtypische Sensitivität und Toleranz (KUTSUKAKE et al. 2000; SCHOLZ 2005). Demzufolge scheinen weder die Tyraminkonzentration noch die Blockierung tyraminerger Signaltransduktionswege einen eindeutigen Effekt auf ethanolinduziertes Verhalten zu haben. Vorstellbar für die Modulation der ethanolinduzierten Phänotypen wäre daher, dass sowohl definierte Konzentrationen an Tyramin als auch Oktopamin benötigt werden.

4.6 Mögliche Gehirnareale, die die Entwicklung von Ethanol­sensitivität oder Toleranz vermitteln, sind der Zentralkomplex, das SOG und die Pars intercerebralis.

Für den Zentralkomplex ist bereits gezeigt worden, dass er eine Funktion bei der Entwicklung von Ethanol­sensitivität und Toleranz hat (RODAN et al. 2002; SCHOLZ et al. 2000; URIZAR et al. 2007). Dabei ist die Neurotransmitter-Ausschüttung in den Synapsen von Kleinfeld-Neuronen wichtig, die den Ellipsoid und den Fächerförmigen Körper innervieren und miteinander verbinden (RODAN et al. 2002; SCHOLZ et al. 2000). Zum Beispiel entwickeln Fliegen (78Y), deren Kleinfeld- Neurone mittels TNT inhibiert wurden, eine reduzierte Ethanol­toleranz (RODAN et al. 2002; SCHOLZ 2005).

Zusätzlich zu der Tatsache, dass Kleinfeld-Neurone eine Funktion in der Entwicklung von Ethanol­sensitivität und Toleranz haben, wurde den Großfeld-Neuronen R2 und R4 ebenfalls eine Funktion im ethanolinduzierten Verhalten zugesprochen (URIZAR et al. 2007).

Die kürzlich publizierte *homer* Nullmutante, die keine Homer-Expression mehr in den Ellipsoid Körper innervierenden Neuronen zeigt, entwickelt eine erhöhte Sensitivität und eine reduzierte Toleranz gegenüber Ethanol (URIZAR et al. 2007). Dieser Phänotyp konnte mittels wieder eingebrachter Homer-Expression in R2- und R4- Neuronen gerettet werden. Die für diese Versuche benutzen GAL4-Treiberlinien c819, c42 exprimieren spezifisch in den R2- und R4- Neuronen, die den Ellipsoid Körper innervieren (RENN et al. 1999; URIZAR et al. 2007).

In früheren Arbeiten wurden des Weiteren verschiedene Strukturmutanten analysiert, die den Zentralkomplex betreffen. Unter anderem Mutanten wie *central-body-defect* (*cbd*^{KS96}), *central-complex* (*cex*^{KS181}) und *ellipsoid-body-open* (*ebo*) bei denen der Zentralkomplex verändert, aber noch vorhanden ist (STRAUSS and HEISENBERG 1993). In der *cbd* Mutante sind die Strukturen des Fächerförmigen Körpers und des Ellipsoid Körpers nicht voneinander unterscheidbar und stark fragmentiert. Bei der *cex* Mutante ist die Protocerebrale Brücke weniger kompakt, als beim Wildtyp. Zudem ist der Fächerförmige Körper entlang der Mittellinie gespalten und der Ellipsoid Körper ist ventral geöffnet. *Ebo* Mutanten weisen einen nierenförmig deformierten Ellipsoid Körper auf, welcher geteilt vorliegen kann (STRAUSS and HEISENBERG 1993). Diese Mutanten zeigen unter anderem verzögerte Laufaktivität, reduzierte Laufgeschwindigkeit und reduzierte zurückgelegte Distanz, Defekte in der Beincoordination und Veränderungen beim Anlaufen der Landmarken im Buridan Paradigma (STRAUSS and HEISENBERG 1993).

Die im Inebriometer gemessenen Daten der Strukturmutanten wie *cex*^l und *ebo* zeigen eine normale Ethanol sensitivität (SCHOLZ et al. 2000). Hingegen zeigt die *cex* Mutante eine reduzierte Toleranz, die *ebo* Mutante entwickelt jedoch eine wildtypische Ethanol toleranz (SCHOLZ et al. 2000). Das Ausmaß an Deformationen des Zentralkomplexes kann offensichtlich nicht mit dem Grad der Entwicklung von Ethanol sensitivität oder Toleranz korreliert werden, da die Veränderung der Architektur des Zentralkomplexes bei einigen der Zentralkomplex Mutanten zu keinem veränderten ethanolinduzierten Verhalten zu führen scheint (SCHOLZ et al. 2000; STRAUSS and HEISENBERG 1993). Durch Tests der Fliegen in der Buridan Arena und dem Inebriometer

können auf diese Weise Lokomotionsdefekte von ethanolinduziertem Verhalten unterschieden werden.

Zwei der fünf hergestellten *TβH*-GAL4-Linien zeigen einen ethanolinduzierten Verhaltensphänotyp. Wenn Neurone der Linien 1.3*TβH*-GAL4 oder 6.2*TβH*-GAL4, die Expression im Zentral Komplex zeigen, mit einem *UAS-Kir2.1* Transgen inaktiviert werden, ist die Ethanol sensitivität dramatisch reduziert. Zwischen den Expressionsmustern gibt es dabei keinerlei Überlappung. Somit wäre möglich, dass jeweils unterschiedliche Zellen aus dem gleichen Netzwerk inaktiviert wurden und derselbe Phänotyp resultiert. Die Inhibition der Neurotransmitterausschüttung in den Neuronen des 1.3*TβH*-GAL4-Expressionsmusters mit Hilfe von Tetanustoxin zeigt hingegen keinen Phänotyp im ethanolinduzierten Verhalten. Allerdings kann nicht mit Gewissheit gesagt werden, ob das *UAS-TNT* Transgen in diesen Zellen funktionell ist, da im visuellen System gezeigt werden konnte, dass es in *Drosophila* TNT-sensitve und TNT-insensitive Synapsen gibt (RISTER and HEISENBERG 2006).

Die Inhibition der Neurotransmission mittels Tetanustoxin in Neuronen der 6.2*TβH*-GAL4-Linie resultiert in einer Erhöhung der Ethanol sensitivität. Damit kann gezeigt werden, dass das *UAS-TNT* Transgen in diesen Zellen getrieben wird und funktionell ist. Alle weiteren hergestellten GAL4-Linien (6.50*TβH*; 4.6*TβH*; 6.6*TβH*) zeigen mit *UAS-TNT* Transgen keinen Phänotyp in Bezug auf das ethanolinduzierte Verhalten. Bei Kreuzung dieser GAL4-Linien mit *UAS-Kir2.1* sind die Fliegen letal. Dies legt nahe, dass die Neurone während der Entwicklung eine wichtige Funktion besitzen.

Neurone der 6.2*TβH*-GAL4-Linie, die den Ellipsoid Körper innervieren könnten den R1-, R2- und R3- Ringneuronen entsprechen (HANESCH 1989; RENN *et al.* 1999; STRAUSS *et al.* 1992). Mittels Vergleich der relativen Lage des 6.2*TβH*-GAL4-Expressionsmusters, mit denen der analysierten Linien pwF22-6, c105 und 189Y, wurde die Zuordnung zu den Ringneuronengruppen durchgeführt (RENN *et al.* 1999; URIZAR *et al.* 2007).

Neurone der 4.6*TβH*-GAL4-Expression, die den Ellipsoid Körper innervieren, gehören hingegen wahrscheinlich zu den R1- und R4- Ringneuronen. Da die inhibierte Neurotransmitterfreisetzung in diesen Neuronen bei der 4.6*TβH*-GAL4-Linie keinen Einfluss auf Sensitivität bzw. Toleranz gegenüber Ethanol hatte, erscheint es unwahrscheinlich, dass die R1-Neurone der 6.2*TβH*-GAL4-Linie für die ethanolinduzierten Phänotypen verantwortlich sind. Dies korreliert mit Experimenten, bei denen die Expression von Tetanustoxin in R1-Neuronen mittels der c561 GAL4-Linie keinen Effekt auf das ethanolinduzierte Verhalten hat (SCHOLZ et al. 2000). Somit ist denkbar, dass Kombinationen aus den verschiedenen Ringneuronentypen für unterschiedliche ethanolinduzierte Verhaltensmuster zuständig sind.

Leider sind die Botenstoffe nicht bekannt, welche die Signaltransduktion der einzelnen Neurone vermitteln, die den Ellipsoid Körper innervieren. Oktopamin lässt sich zwar im Ellipsoid Körper nachweisen, jedoch kann keine Kolokalisation der Ringneurone nachgewiesen werden. (MONASTIRIOTI et al. 1995; SINAKEVITCH and STRAUSFELD 2006).

Es wird angenommen, dass Neuropeptid-exprimierende neurosekretorische Zellen in der PI und SOG in *Drosophila melanogaster* für eine normale Entwicklung von Ethanolsensitivität ebenfalls eine wichtige Rolle spielen (CORL et al. 2005; RODAN et al. 2002). Beide, PI und SOG Neurone, senden ihre Projektionen zum hypocerebralen Ganglion, der corpora cardiaca, einem neuroendokrinen Organ, das das adulte Derivat der larvalen Ringdrüse darstellt (NASSEL 1993; RAJASHEKHAR and SINGH 1994; SHIGA et al. 2000; THOMSEN 1969). Dies würde mit den gemessenen Daten der 1.3*TβH*-GAL4-Linie, mit Expression von putativ neurosekretorischen SOG Neuronen, und der 6.2*TβH*-GAL4-Linie, die Expression in PI Neuronen aufweist, korrelieren. Bei Inaktivierung dieser Zellen durch *UAS-Kir2.1* weisen die Fliegen eine geringere Sensitivität zu Ethanol auf. Somit wäre möglich, dass die 1.3*TβH*-GAL4 und 6.2*TβH*-GAL4 Neurone eventuell das endokrine System beeinflussen. Allerdings konnte nicht überprüft werden, ob die 1.3*TβH*-GAL4 und 6.2*TβH*-GAL4 Neurone tatsächlich neurosekretorisch sind. Die hierzu widersprüchlich erscheinenden Ergebnisse der Kreuzung der 6.2*TβH*-GAL4-Linie mit *UAS-TNT*, die eine erhöhte Ethanoltoleranz aufzeigen, lassen sich mit der uneinheitlichen Physiologie der untersuchten

Zellengruppen erklären. Neben den oben beschriebenen putativ neurosekretorischen Zellen findet sich eine große Vielzahl anderer – nicht neurosekretorischer – Neurone. Darunter können sich Neurone befinden, auf die die Expression von TNT kein Effekt hat, während die Signaltransduktion durch die Expression einwärts gerichteter Kaliumkanäle (Kir) in jedem Fall unterbunden wird.

Der Einfluss der PI auf die Ethanol sensitivität wurde des Weiteren durch (CORL et al. 2005) gezeigt. Inhibiert man mit Hilfe der PI-spezifischen *dilp*- (*Drosophila* insulin-like peptides) GAL4-Linie die Proteinkinase A (PKA) in Zellen der Pars Intercerebralis, führt dies zu einer erhöhten Ethanol sensitivität.

Eine eindeutige Aussage, welche Neurone in welchen ethanolinduzierten Phänotyp involviert sind, kann nicht getroffen werden. Dazu müsste eine größere Anzahl an Fliegenlinien mit unterschiedlichen Expressionsmustern im Zentralkomplex, PI und SOG Bereich getestet werden. Die bisherigen Studien legen jedoch nahe, dass die Inhibition der Neurotransmitter-Ausschüttung von Zentralkomplex-innervierenden Klein- und Großfeld Neuronen zur Entwicklung reduzierter Toleranz und erhöhter Sensitivität führt (SCHOLZ et al. 2000; URIZAR et al. 2007). Die Inhibition der PKA in Kleinfeld Neuronen führt zu einer reduzierten Ethanol sensitivität (RODAN et al. 2002). Die Inaktivierung von PI und SOG Neuronen mittels *UAS-Kir* führt wahrscheinlich zu einer reduzierten Ethanol sensitivität, und der Entwicklung einer erhöhten Ethanol toleranz (CORL et al. 2005; RODAN et al. 2002). Die Inhibition der katalytischen Untereinheit der PKA in Neuronen des PI resultiert schließlich in einer erhöhten Ethanol toleranz (CORL et al. 2005).

Aus diesen Daten lässt sich schlussfolgern, dass es mehrere zelluläre Mechanismen und/oder Netzwerke geben könnte, die zusammen in den Prozess für die Entwicklung von ethanolinduziertem Verhalten involviert sind. Bei einem Teil dieses Netzwerkes könnte sich dabei um den Zentralkomplex innervierende Neurone handeln, die über Synaptobrevin-abhängige Neurotransmitter-Ausschüttung kommunizieren. Demgegenüber ist möglich, dass das neurosekretorische System, welches die Hormonausschüttung reguliert, das zugehörige Pendant

darstellt (HOFFMAN and TABAKOFF 1981; RAJASHEKHAR and SINGH 1994; RODAN et al. 2002; SHIGA et al. 2000).

4.7 Verantwortlich für den Verlust der Fähigkeit Landmarken zu Fixieren sind etwa 10 Neurone der 1.3*TβH*-GAL4-Linie.

Es wurden 1.3*TβH*-GAL4, *UAS-Kir2.1* Fliegen im Buridan Paradigma analysiert (GOTZ 1980), bei denen unter anderem zwei Neurone inaktiviert werden, die den Zentralkomplex innervieren. Der Einfluss des Zentralkomplexes auf das Laufverhalten der Fliegen ist bekannt (STRAUSS 2002; STRAUSS and HEISENBERG 1993). 1.3*TβH*-GAL4; *UAS-Kir2.1* Fliegen haben keine Veränderungen der Laufaktivität, der Geschwindigkeit und der zurückgelegten Distanz, verglichen mit den Kontrollfliegen. Demzufolge scheinen diese Fliegen keinerlei Einschränkungen der Lokomotion aufzuweisen. Hingegen ist die Anzahl der unternommenen Läufe und die Fähigkeit Landmarken zu Fixieren bzw. Antifixieren der 1.3*TβH*-GAL4; *UAS-Kir2.1* Fliegen stark beeinträchtigt. Dies ist jedoch nicht auf visuelle Einschränkungen zurückzuführen, wie Experimente zur optomotorischen Kompensation gezeigt haben.

Es ist eventuell möglich, dass die visuelle Erkennung der Landmarken nicht verarbeitet werden kann, da Areale des Fächerförmigen Körpers ausgeschaltet sind. Denn es konnte gezeigt werden, dass der Fächerförmige Körper Teile eines Netzwerks zur visuellen Mustererkennung enthält (LIU et al. 2006).

Das Laufverhalten im Buridan Paradigma ist nicht direkt vergleichbar mit dem Laufverhalten der Fliegen im Inebriometer. Jedoch können unter anderem Rückschlüsse über die generelle Bereitschaft zu Laufen und über die generelle Aktivität gezogen werden. Folglich ist nicht Bestimmtheit zu sagen, dass der Verlust der posturalen Kontrolle, nach Ethanoleinfluss im Inebriometer, verantwortlich für die Elution der Fliegen ist und nicht ein Defekt der Lokomotorik.

5 Zusammenfassung

Es sollten neuronale Netzwerke in *Drosophila melanogaster* identifiziert werden, die in die Entwicklung von ethanolinduziertem Verhalten involviert sind.

Mittels der Tyramin-beta-Hydroxylase (*TβH*) wird der letzte Schritt der Biosynthese von Oktopamin aus Tyramin gewährleistet. *TβH^{M18}* Mutanten entwickeln eine reduzierte Ethanoltoleranz und haben keine nachweisbaren Oktopamin Konzentrationen (MONASTIRIOTI et al. 1996; SCHOLZ et al. 2000). Die molekulargenetische Ursache dieser Mutante wurde näher untersucht. Wahrscheinlich ist die Deletion von einem Teil des Intron 1, des Exon 2 und einem Teil des Intron 2 des *TβH*-Gens verantwortlich für den Verlust der Tyramin-beta-Hydroxylase. Die Deletion der kodierenden Sequenz führt jedoch nicht zu einem Leserasterschub in der Aminosäuresequenz. Demzufolge könnte ein verkürztes Protein hergestellt werden.

Ferner gibt es zwei Transkripte des *TβH*-Gens, woraus eventuell zwei Proteine exprimiert werden könnten. Ein Protein wäre die Tyramin-beta-Hydroxylase und das andere könnte eine Dopamin-beta-Hydroxylase sein.

Um möglicherweise spezifische putative Subsets von TβH-positiven Neuronen zu markieren, wurden verschiedene GAL4-Treiberlinien mit Hilfe unterschiedlicher Fragmente der Promoterregion des *TβH*-Gens hergestellt. Mittels des GAL4/*UAS* Systems konnte die Neurotransmitterausschüttung in putativen TβH-positiven Neuronen der *TβH*-GAL4-Linien inhibiert werden. Auf diese Weise sollte die Funktion der putativen TβH-positiven Neurone während der Entwicklung von Ethanol sensitivität und Toleranz untersucht werden.

Das Transgen Tetanustoxin wurde mit der 1.3*TβH*-GAL4 Treiberlinie in einem bestimmten Set von Neuronen exprimiert. Die Inhibition der Synaptobrevin-abhängigen Neurotransmission in den 1.3*TβH*-GAL4-positiven Neuronen beeinflusst nicht das ethanolinduzierte Verhalten. Hingegen das Ausschalten der Erregbarkeit der Zellen mit Hilfe eines *UAS-Kir2.1* Transgens resultiert in erhöhter Resistenz gegenüber Ethanol. Das heißt, dass Synaptobrevin-unabhängige zelluläre

Mechanismen der Zellen notwendig sind, um ethanolinduziertes Verhalten zu regulieren. Die 1.3*TβH*-GAL4-Linie exprimiert in einem sehr spezifischen Subset von Neuronen GAL4, bzw. Effektoren. Insgesamt werden ≈ 10 Zellen detektiert. Davon liegen die Somata zweier Neurone caudal und projizieren in die Region der ersten und vierten Bande des Fächerförmigen Körpers. Weitere kleine Ansammlungen von acht Zellen können um den Ösophagus und im Bereich des Subösophagialganglion verzeichnet werden. Die mit GFP markierten Neurone exprimieren wahrscheinlich kein Oktopamin. Ferner resultierte die Inhibition der synaptischen Transmission von 6.2*TβH*-GAL4-positiven Neuronen, mit Hilfe von Tetanustoxin, in einer erhöhten Ethanol sensitivität. Ebenfalls zu einer ethanolinduzierten Verhaltensänderung führt die Inaktivierung der 6.2*TβH*-GAL4 Zellen mittels eines *UAS-Kir2.1* Transgens. Dabei entwickeln die Fliegen eine erhöhte Ethanolresistenz. Somit wäre möglich, dass die Entwicklung von Ethanol sensitivität und Resistenz über verschiedene zelluläre Mechanismen reguliert werden. Die 6.2*TβH*-GAL4-Linie ermöglicht die Transgen-Expression in 65-70 Neuronen. Diese innervieren u.a. das Subösophagialganglion, den Ösophagus, den Ellipsoid Körper, das laterale und das dorso-laterale Protocerebrum. Fünf der Neurone, die sich durch die 6.2*TβH*-GAL4 Treiberlinie markieren lassen, exprimieren Oktopamin. Dazu gehört ein VUM-Neuron und vier große caudale Zellen. Eine weitere putativ oktopaminerge GAL4-Linie *Tdc2-GAL4* wurde mit der *UAS-Kir2.1* Effektorlinie gekreuzt und die Nachkommen im Inebriometer gemessen. Bei Inaktivierung der Erregbarkeit der *Tdc2*-positiven Neurone resultiert dies in einer erhöhten Ethanol sensitivität, hingegen in keiner Veränderung der Toleranz. Die reduzierten Levels an Oktopamin spielen dabei wahrscheinlich eine Rolle. Hingegen regulieren eventuelle neurosekretorische Zellen über andere Mechanismen die Ethanolresistenz, wie die 6.2*TβH*-GAL4, *UAS-Kir2.1* Fliegen zeigen.

Die Inhibition der Neurotransmission mit Hilfe von drei weiteren *TβH*-GAL4-Linien (600*TβH*-GAL4, 4.6*TβH*-GAL4, 6.6*TβH*-GAL4) zeigen keine Abweichung des ethanolinduzierten Verhaltens im Vergleich zu wildtypischen Fliegen. Dabei beinhaltet das spezifische Expressionsmuster der 600*TβH*-GAL4-Linie fünf Zellen in der Pars intercerebralis und eine das Hirn umgebenden Gliaschicht. Ferner ermöglicht die 6.6*TβH*-GAL4-Linie Effektorgene in acht

Zellkörpern und einer ebenfalls das Gehirn umgebenden Hülle zu treiben. Die Expression der 600*TβH*-GAL4-Linie und der 6.6*TβH*-GAL4-Linie überlappen in den Kolokalisationsstudien weitgehend nicht mit dem oktopaminergen Expressionsmuster. Die Expression von *UAS*-Effektorgenen mittels der 4.6*TβH*-GAL4 Treiberlinie wird in ≈67 Neuronen des adulten Gehirns ermöglicht. Die Strukturen des Ellipsoid Körpers, der Antennalloben, der Pars intercerebralis und letztendlich eine große Kommissur im Bereich des SOG werden mittels dieser GAL4-Linie innerviert. Caudal im Gehirn werden sieben Zellen detektiert, bei denen der Innervationsort nicht bekannt ist.

Es konnte gezeigt werden, dass unterschiedliche Neuronencluster für verschiedene ethanolinduzierte Verhaltensantworten verantwortlich sind. Da wahrscheinlich neurosekretorische Zellen des PI die Ethanolresistenz beeinflussen (RODAN et al. 2002), hingegen den Zentralkomplex-innervierende Zellen eher für die Entwicklung von Ethanolsensitivität und Toleranz notwendig sind (URIZAR et al. 2007).

6 Summary

We wanted to identify neuronal networks in *Drosophila melanogaster* that are involved in the development of ethanol sensitivity and/or tolerance.

The tyramine-beta-hydroxylase (TβH) catalyzes the last step in the biosynthesis of tyramine into octopamine. The *TβH^{M18}* mutant develops a reduced ethanol tolerance, because they have no concentrations of octopamine in their bodies (MONASTIRIOTI *et al.* 1996; SCHOLZ *et al.* 2000). We investigated the molecular reason of the mutant. Probably the deletion of a part of intron 1, exon 2 and a part of intron 2 of the *TβH* gene is responsible for the loss of the tyramine-beta-hydroxylase. The deletion of the coding sequence does not result in a frame shift of the amino acid sequence and because of this a truncated protein could be expressed. Further there are two transcripts of the *TβH* gene, from that two proteins could be expressed. One protein could be the tyramine-beta-hydroxylase and the other, a dopamine-beta-hydroxylase.

For possibly marking specific putative subsets of TβH-positive neurons, different GAL4 driver lines were generated with different promoter fragments out of the *TβH* gene. Via the GAL4/UAS system the neurotransmitter release could be inhibited in putative TβH-positive neurons. In this manner the function of the putative TβH-positive neurons should be analyzed during the development of ethanol sensitivity and tolerance.

The transgene tetanustoxin was expressed in a specific subset of 1.3*TβH*-GAL4 positive neurons. The ethanol induced behaviour is not influenced by inhibition of synaptobrevin-dependent neurotransmission in 1.3*TβH*-GAL4 positive neurons. Blocking the excitability of cells by using a *UAS-Kir2.1* transgene results in increased ethanol resistance. That means that synaptobrevin-independent cellular mechanisms of cells are necessary for regulating ethanol induced behaviour. The 1.3*TβH*-GAL4 line expresses GAL4 in a very specific subset of neurons as well as effectors. All in all about 10 cells can be detected. Two somata of these cells are located caudal which project to the first and fourth layer of the fan-shaped body. Eight more cells are localized frontal around the

esophagus and in the subesophageal region. Probably the GFP-marked neurons do not express octopamine. Furthermore the inhibition of synaptic transmission with tetanustoxin of 6.2*TβH*-GAL4 positive neurons results in an increased ethanol sensitivity. Also the inactivation of 6.2*TβH*-GAL4 cells with an *UAS-Kir2.1* transgene leads to an ethanol-induced change of behaviour and there the flies develop an increased ethanol resistance. It could be possible that the development of ethanol sensitivity and tolerance is regulated by different cellular mechanisms. The 6.2*TβH*-GAL4 line enables transgene expression in 65-70 neurons. These are innervating for example the SOG, esophagus, ellipsoid body, lateral and the dorsolateral protocerebrum. Five of these 6.2*TβH*-GAL4 driven neurons express octopamine, which include four big caudal cells and probably one VUM-neuron. An additional putative octopaminergic GAL4-line, the *Tdc2*-GAL4 line was crossed to the *UAS-Kir2.1* effector line and the offspring measured for ethanol sensitivity and tolerance in the inebriometer. Inactivation of the excitability of the *Tdc2*-positive neurons results in an increased ethanol sensitivity, but on the other hand to no change of ethanol tolerance. The reduced octopamine levels do probably play a role in this. However the potential neurosecretory cells regulate the ethanol resistance by different mechanisms, like 6.2*TβH*-GAL4, *UAS-Kir2.1* flies show.

The inhibition of neurotransmission with three other *TβH*-GAL4 lines (600*TβH*-GAL4, 4.6*TβH*-GAL4, 6.6*TβH*-GAL4) show no divergence of ethanol-induced behaviour compared to wildtype flies. There, the specific expression pattern of 600*TβH*-GAL4 line includes five cells in the pars intercerebralis and a brain surrounding glia layer. Further the 6.6*TβH*-GAL4 line enables expression of effector genes in eight cells and in a surrounding layer of the brain as well. The expression of 600*TβH*-GAL4 line and 6.6*TβH*-GAL4 line do not overlap with the octopaminergic expression pattern of our colocalization studies. The expression of *UAS*-effector genes driven by 4.6*TβH*-GAL4 line can be provided in approximately 67 neurons of the adult brain. With this GAL4-line the structures of the ellipsoid body, antennal lobes, pars intercerebralis and a big commissure are innervated. Seven cells can be detected caudal, but the region that they are projecting to is unknown.

It could be shown that different clusters of neurons are responsible for several ethanol-induced behavioural responses. Because neurosecretory cells of the pars intercerebralis seem to influence the ethanol resistance (RODAN *et al.* 2002), but central complex- innervating cells are necessary rather for the development of ethanol sensitivity and tolerance (URIZAR *et al.* 2007).

7 Literatur

1. AISTRUP, G. L., W. MARSZALEC and T. NARAHASHI, 1999 Ethanol modulation of nicotinic acetylcholine receptor currents in cultured cortical neurons. *Mol Pharmacol* **55**: 39-49.
2. AXELROD, J., 1977 Catecholaminergic systems in the brain. *Acta Neurol Scand Suppl* **64**: 85-89.
3. AXELROD, J., and J. M. SAAVEDRA, 1977 Octopamine. *Nature* **265**: 501-504.
4. BAINES, R. A., J. P. UHLER, A. THOMPSON, S. T. SWEENEY and M. BATE, 2001 Altered electrical properties in *Drosophila* neurons developing without synaptic transmission. *J Neurosci* **21**: 1523-1531.
5. BARGMANN, C., 1998 Molecular neurobiology. Making memories stick? *Nature* **391**: 435-436.
6. BATTELLE, B. A., and J. A. EVANS, 1984 Octopamine release from centrifugal fibers of the *Limulus* peripheral visual system. *J Neurochem* **42**: 71-79.
7. BELLEN, H. J., R. W. LEVIS, G. LIAO, Y. HE, J. W. CARLSON *et al.*, 2004 The BDGP gene disruption project: single transposon insertions associated with 40% of *Drosophila* genes. *Genetics* **167**: 761-781.
8. BERGER, K. H., U. HEBERLEIN and M. S. MOORE, 2004 Rapid and chronic: two distinct forms of ethanol tolerance in *Drosophila*. *Alcohol Clin Exp Res* **28**: 1469-1480.
9. BERKE, J. D., and S. E. HYMAN, 2000 Addiction, dopamine, and the molecular mechanisms of memory. *Neuron* **25**: 515-532.
10. BLAKELY, R. D., L. J. DE FELICE and H. C. HARTZELL, 1994 Molecular physiology of norepinephrine and serotonin transporters. *J Exp Biol* **196**: 263-281.
11. BLENAU, W., and A. BAUMANN, 2001 Molecular and pharmacological properties of insect biogenic amine receptors: lessons from *Drosophila melanogaster* and *Apis mellifera*. *Arch Insect Biochem Physiol* **48**: 13-38.
12. BRAND, A. H., and N. PERRIMON, 1993 Targeted gene expression as a means of altering cell fates and generating dominant phenotypes. *Development* **118**: 401-415.
13. BUSCH, S., 2006 Diplomarbeit.
14. CARLSSON, A., and B. WALDECK, 1963 Beta-Hydroxylation of Tyramine in Vivo. *Acta Pharmacol Toxicol (Copenh)* **20**: 371-374.
15. CHENG, Y., K. ENDO, K. WU, A. R. RODAN, U. HEBERLEIN *et al.*, 2001 *Drosophila* fasciclinII is required for the formation of odor memories and for normal sensitivity to alcohol. *Cell* **105**: 757-768.
16. CIBIC, O., 2007 Diplomarbeit.
17. CLARK, J., and A. B. LANGE, 2003 Octopamine modulates spermathecal muscle contractions in *Locusta migratoria*. *J Comp Physiol A Neuroethol Sens Neural Behav Physiol* **189**: 105-114.
18. COHAN, F. M. U. J.-D. G., 1985 Latitudinal Cline in *Drosophila melanogaster* for Knockdown Resistance to Ethanol Fumes and for Rates of Response to Selection for Further Resistance., pp. in *Evolution*,
19. 39:278-293.

20. COLE, S. H., G. E. CARNEY, C. A. MCCLUNG, S. S. WILLARD, B. J. TAYLOR *et al.*, 2005 Two functional but noncomplementing *Drosophila* tyrosine decarboxylase genes: distinct roles for neural tyramine and octopamine in female fertility. *J Biol Chem* **280**: 14948-14955.
21. CORL, A. B., A. R. RODAN and U. HEBERLEIN, 2005 Insulin signaling in the nervous system regulates ethanol intoxication in *Drosophila melanogaster*. *Nat Neurosci* **8**: 18-19.
22. COWMEADOW, R. B., H. R. KRISHNAN and N. S. ATKINSON, 2005 The slowpoke gene is necessary for rapid ethanol tolerance in *Drosophila*. *Alcohol Clin Exp Res* **29**: 1777-1786.
23. COWMEADOW, R. B., H. R. KRISHNAN, A. GHEZZI, Y. M. AL'HASAN, Y. Z. WANG *et al.*, 2006 Ethanol tolerance caused by slowpoke induction in *Drosophila*. *Alcohol Clin Exp Res* **30**: 745-753.
24. CRABBE, J. C., J. K. BELKNAP and K. J. BUCK, 1994 Genetic animal models of alcohol and drug abuse. *Science* **264**: 1715-1723.
25. CRABBE, J. C., H. RIGTER, J. UIJLEN and C. STRIJBOS, 1979 Rapid development of tolerance to the hypothermic effect of ethanol in mice. *J Pharmacol Exp Ther* **208**: 128-133.
26. CUNNINGHAM, C. L., J. C. CRABBE and H. RIGTER, 1983 Pavlovian conditioning of drug-induced changes in body temperature. *Pharmacol Ther* **23**: 365-391.
27. DACKS, A. M., T. A. CHRISTENSEN, H. J. AGRICOLA, L. WOLLWEBER and J. G. HILDEBRAND, 2005 Octopamine-immunoreactive neurons in the brain and subesophageal ganglion of the hawkmoth *Manduca sexta*. *J Comp Neurol* **488**: 255-268.
28. DANEMAN, R., and B. A. BARRES, 2005 The blood-brain barrier--lessons from moody flies. *Cell* **123**: 9-12.
29. DAVID, J. C., and J. F. COULON, 1985 Octopamine in invertebrates and vertebrates. A review. *Prog Neurobiol* **24**: 141-185.
30. DAVIES, M., 2003 The role of GABAA receptors in mediating the effects of alcohol in the central nervous system. *J Psychiatry Neurosci* **28**: 263-274.
31. DELACOUR, J., J. F. COULON, J. C. DAVID and C. GUENAIRE, 1983 Brain octopamine and strain differences in avoidance behavior. *Brain Res* **288**: 169-176.
32. DUDAI, Y., 1988 Neurogenetic dissection of learning and short-term memory in *Drosophila*. *Annu Rev Neurosci* **11**: 537-563.
33. DZITOEVA, S., N. DIMITRIJEVIC and H. MANEV, 2003a Gamma-aminobutyric acid B receptor 1 mediates behavior-impairing actions of alcohol in *Drosophila*: adult RNA interference and pharmacological evidence. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**: 5485-5490.
34. DZITOEVA, S., N. DIMITRIJEVIC and H. MANEV, 2003b Identification of a novel *Drosophila* gene, beltless, using injectable embryonic and adult RNA interference (RNAi). *BMC Genomics* **4**: 33.
35. ENNACEUR, A., J. F. COULON, J. DELACOUR and J. C. DAVID, 1986 High sensitivity of brain octopamine levels to stress. *Psychopharmacology (Berl)* **88**: 305-309.
36. ERSPAMER, V., 1952 Identification of octopamine as l-p-hydroxyphenylethanolamine. *Nature* **169**: 375-376.
37. ERSPAMER, V., and G. BORETTI, 1951 Identification and characterization, by paper chromatography, of enteramine, octopamine, tyramine, histamine and allied substances in extracts of posterior salivary glands of octopoda and in other tissue extracts of vertebrates

and invertebrates. *Arch Int Pharmacodyn Ther* **88**: 296-332.

38. EVANS, P. D., 1985 Regional differences in responsiveness to octopamine within a locust skeletal muscle. *J Physiol* **366**: 331-341.
39. EVANS, P. D., and B. MAQUEIRA, 2005 Insect octopamine receptors: a new classification scheme based on studies of cloned *Drosophila* G-protein coupled receptors. *Invert Neurosci* **5**: 111-118.
40. FADDA, F., and Z. L. ROSSETTI, 1998 Chronic ethanol consumption: from neuroadaptation to neurodegeneration. *Prog Neurobiol* **56**: 385-431.
41. FEATHERSTONE, D. E., and K. BROADIE, 2000 Surprises from *Drosophila*: genetic mechanisms of synaptic development and plasticity. *Brain Res Bull* **53**: 501-511.
42. FISCHER, L., and E. FLOREY, 1987 Octopamine action on the contractile system of crustacean skeletal muscle. *Comp Biochem Physiol C* **88**: 335-342.
43. FONTANA, E., N. MORIN, D. PREVOT and C. CARPENE, 2000 Effects of octopamine on lipolysis, glucose transport and amine oxidation in mammalian fat cells. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol* **125**: 33-44.
44. FORMAN, S. A., K. W. MILLER and G. YELLEN, 1995 A discrete site for general anesthetics on a postsynaptic receptor. *Mol Pharmacol* **48**: 574-581.
45. FUSSNECKER, B. L., B. H. SMITH and J. A. MUSTARD, 2006 Octopamine and tyramine influence the behavioral profile of locomotor activity in the honey bee (*Apis mellifera*). *J Insect Physiol* **52**: 1083-1092.
46. GOTZ, K. G., 1980 Visual guidance in *Drosophila*. *Basic Life Sci* **16**: 391-407.
47. GRUNTENKO, N. E., E. K. KARPOVA, A. A. ALEKSEEV, N. A. CHENTSOVA, E. V. BOGOMOLOVA *et al.*, 2007 Effects of octopamine on reproduction, juvenile hormone metabolism, dopamine, and 20-hydroxyecdysone contents in *Drosophila*. *Arch Insect Biochem Physiol* **65**: 85-94.
48. GUARNIERI, D. J., and U. HEBERLEIN, 2003 *Drosophila melanogaster*, a genetic model system for alcohol research. *Int Rev Neurobiol* **54**: 199-228.
49. GUNAWARDENA, S., and L. S. GOLDSTEIN, 2001 Disruption of axonal transport and neuronal viability by amyloid precursor protein mutations in *Drosophila*. *Neuron* **32**: 389-401.
50. HAMMER, M., and R. MENZEL, 1998 Multiple sites of associative odor learning as revealed by local brain microinjections of octopamine in honeybees. *Learn Mem* **5**: 146-156.
51. HAN, K. A., N. S. MILLAR and R. L. DAVIS, 1998 A novel octopamine receptor with preferential expression in *Drosophila* mushroom bodies. *J Neurosci* **18**: 3650-3658.
52. HANESCH, U., 1989 Neuronal architecture of the central complex in *Drosophila melanogaster*, pp. in *Cell Tissue Res*.
53. HILDEBRANDT, H., and U. MULLER, 1995 Octopamine mediates rapid stimulation of protein kinase A in the antennal lobe of honeybees. *J Neurobiol* **27**: 44-50.
54. HIRASHIMA, A., E. SUETSUGU, S. HIROKADO, E. KUWANO, E. TANIGUCHI *et al.*, 1999 Effect of octopamine on the activity of juvenile-hormone esterase in the silkworm *Bombyx mori* and the red flour beetle *Tribolium freemani*. *Gen Comp Endocrinol* **116**: 373-381.
55. HOFFMAN, P. L., and B. TABAKOFF, 1981 Centrally acting peptides and tolerance to ethanol. *Curr Alcohol* **8**: 359-378.
56. KALANT, H., A. E. LEBLANC and R. J. GIBBINS, 1971 Tolerance to, and dependence on, some

- non-opiate psychotropic drugs. *Pharmacol Rev* **23**: 135-191.
57. KAMACHI, T., N. KIHARA, Y. SHIOTA and K. YOSHIZAWA, 2005 Computational exploration of the catalytic mechanism of dopamine beta-monoxygenase: modeling of its mononuclear copper active sites. *Inorg Chem* **44**: 4226-4236.
 58. KINNAMON, S. C., L. W. KLAASSEN, A. E. KAMMER and D. CLAASSEN, 1984 Octopamine and chlordimeform enhance sensory responsiveness and production of the flight motor pattern in developing and adult moths. *J Neurobiol* **15**: 283-293.
 59. KRAVITZ, E. A., P. D. EVANS, B. R. TALAMO, B. G. WALLACE and B. A. BATTELLE, 1976 Octopamine neurons in lobsters: location, morphology, release of octopamine and possible physiological role. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* **40**: 127-133.
 60. KREISSL, S., S. EICHMULLER, G. BICKER, J. RAPUS and M. ECKERT, 1994 Octopamine-like immunoreactivity in the brain and subesophageal ganglion of the honeybee. *J Comp Neurol* **348**: 583-595.
 61. KUTSUKAKE, M., A. KOMATSU, D. YAMAMOTO and S. ISHIWA-CHIGUSA, 2000 A tyramine receptor gene mutation causes a defective olfactory behavior in *Drosophila melanogaster*. *Gene* **245**: 31-42.
 62. LEE, H. G., C. S. SEONG, Y. C. KIM, R. L. DAVIS and K. A. HAN, 2003 Octopamine receptor OAMB is required for ovulation in *Drosophila melanogaster*. *Dev Biol* **264**: 179-190.
 63. LEE, T., and L. LUO, 1999 Mosaic analysis with a repressible cell marker for studies of gene function in neuronal morphogenesis. *Neuron* **22**: 451-461.
 64. LEVINE, M., and R. TJIAN, 2003 Transcription regulation and animal diversity. *Nature* **424**: 147-151.
 65. LEWOHL, J. M., W. R. WILSON, R. D. MAYFIELD, S. J. BROZOWSKI, R. A. MORRISETT *et al.*, 1999 G-protein-coupled inwardly rectifying potassium channels are targets of alcohol action. *Nat Neurosci* **2**: 1084-1090.
 66. LIU, G., H. SEILER, A. WEN, T. ZARS, K. ITO *et al.*, 2006 Distinct memory traces for two visual features in the *Drosophila* brain. *Nature* **439**: 551-556.
 67. LOVINGER, D. M., 1997 Alcohols and neurotransmitter gated ion channels: past, present and future. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* **356**: 267-282.
 68. LOVINGER, D. M., G. WHITE and F. F. WEIGHT, 1989 Ethanol inhibits NMDA-activated ion current in hippocampal neurons. *Science* **243**: 1721-1724.
 69. MANEV, H., N. DIMITRIJEVIC and S. DZITOYEVA, 2003 Techniques: fruit flies as models for neuropharmacological research. *Trends Pharmacol Sci* **24**: 41-43.
 70. MASUOKA, D. T., A. ALCARAZ and E. HANSSON, 1964 Studies on the Formation of Octopamine in Mice and Rats. *Biochim Biophys Acta* **86**: 260-263.
 71. MCCAMAN, M. W., R. E. MCCAMAN and G. J. LEES, 1972 Liquid cation exchange--a basis for sensitive radiometric assays for aromatic amino acid decarboxylases. *Anal Biochem* **45**: 242-252.
 72. MIDDLETON, C. A., U. NONGTHOMBA, K. PARRY, S. T. SWEENEY, J. C. SPARROW *et al.*, 2006 Neuromuscular organization and aminergic modulation of contractions in the *Drosophila* ovary. *BMC Biol* **4**: 17.
 73. MIHIC, S. J., Q. YE, M. J. WICK, V. V. KOLTCHINE, M. D. KRASOWSKI *et al.*, 1997 Sites of

- alcohol and volatile anaesthetic action on GABA(A) and glycine receptors. *Nature* **389**: 385-389.
74. MOBIUS, P., and H. PENZLIN, 1993 Stress-induced release of octopamine in the American cockroach *Periplaneta americana* L. *Acta Biol Hung* **44**: 45-50.
 75. MONASTIRIOTI, M., 1999 Biogenic amine systems in the fruit fly *Drosophila melanogaster*. *Microsc Res Tech* **45**: 106-121.
 76. MONASTIRIOTI, M., 2003 Distinct octopamine cell population residing in the CNS abdominal ganglion controls ovulation in *Drosophila melanogaster*. *Dev Biol* **264**: 38-49.
 77. MONASTIRIOTI, M., M. GORCZYCA, J. RAPUS, M. ECKERT, K. WHITE *et al.*, 1995 Octopamine immunoreactivity in the fruit fly *Drosophila melanogaster*. *J Comp Neurol* **356**: 275-287.
 78. MONASTIRIOTI, M., C. E. LINN, JR. and K. WHITE, 1996 Characterization of *Drosophila* tyramine beta-hydroxylase gene and isolation of mutant flies lacking octopamine. *J Neurosci* **16**: 3900-3911.
 79. MOORE, M. S., J. DEZAZZO, A. Y. LUK, T. TULLY, C. M. SINGH *et al.*, 1998 Ethanol intoxication in *Drosophila*: Genetic and pharmacological evidence for regulation by the cAMP signaling pathway. *Cell* **93**: 997-1007.
 80. MOROZOVA, T. V., R. R. ANHOLT and T. F. MACKAY, 2006 Transcriptional response to alcohol exposure in *Drosophila melanogaster*. *Genome Biol* **7**: R95.
 81. NAKANO, J., T. ISHII, B. COLE and R. OLIVER, 1969 Effect of tyramine and octopamine on lipolysis in isolated fat cells of the rat. *J Pharm Pharmacol* **21**: 620-622.
 82. NASSEL, D. R., 1993 Neuropeptides in the insect brain: a review. *Cell Tissue Res* **273**: 1-29.
 83. PARK, S. K., S. A. SEDORE, C. CRONMILLER and J. HIRSH, 2000 Type II cAMP-dependent protein kinase-deficient *Drosophila* are viable but show developmental, circadian, and drug response phenotypes. *J Biol Chem* **275**: 20588-20596.
 84. PEOPLES, R. W., and F. F. WEIGHT, 1995 Cutoff in potency implicates alcohol inhibition of N-methyl-D-aspartate receptors in alcohol intoxication. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**: 2825-2829.
 85. PONTING, C. P., 2001 Domain homologues of dopamine beta-hydroxylase and ferric reductase: roles for iron metabolism in neurodegenerative disorders? *Hum Mol Genet* **10**: 1853-1858.
 86. QUINN, W. G., W. A. HARRIS and S. BENZER, 1974 Conditioned behavior in *Drosophila melanogaster*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **71**: 708-712.
 87. RAJASHEKHAR, K. P., and R. N. SINGH, 1994 Neuroarchitecture of the tritocerebrum of *Drosophila melanogaster*. *J Comp Neurol* **349**: 633-645.
 88. REDOUANE, K., and S. FUZEAU-BRAESCH, 1984 [Octopamine: distribution and role in the nervous system of invertebrates and vertebrates]. *Agressologie* **25**: 3-12.
 89. RENN, S. C., J. D. ARMSTRONG, M. YANG, Z. WANG, X. AN *et al.*, 1999 Genetic analysis of the *Drosophila* ellipsoid body neuropil: organization and development of the central complex. *J Neurobiol* **41**: 189-207.
 90. RISTER, J., and M. HEISENBERG, 2006 Distinct functions of neuronal synaptobrevin in developing and mature fly photoreceptors. *J Neurobiol* **66**: 1271-1284.
 91. RODAN, A. R., J. A. KIGER, JR. and U. HEBERLEIN, 2002 Functional dissection of

- neuroanatomical loci regulating ethanol sensitivity in *Drosophila*. *J Neurosci* **22**: 9490-9501.
92. ROEDER, T., 1999 Octopamine in invertebrates. *Prog Neurobiol* **59**: 533-561.
 93. ROEDER, T., 2005 Tyramine and octopamine: ruling behavior and metabolism. *Annu Rev Entomol* **50**: 447-477.
 94. ROEDER, T., and J. A. NATHANSON, 1994 Photoaffinity labeling of a neuronal octopamine receptor. *J Neurochem* **63**: 1516-1521.
 95. RUBIN, G. M., 1988 *Drosophila melanogaster* as an experimental organism. *Science* **240**: 1453-1459.
 96. SCHNEIDER, H., P. BUDHIRAJA, I. WALTER, B. S. BELTZ, E. PECKOL *et al.*, 1996 Developmental expression of the octopamine phenotype in lobsters, *Homarus americanus*. *J Comp Neurol* **371**: 3-14.
 97. SCHNEIDER, H., B. A. TRIMMER, J. RAPUS, M. ECKERT, D. E. VALENTINE *et al.*, 1993 Mapping of octopamine-immunoreactive neurons in the central nervous system of the lobster. *J Comp Neurol* **329**: 129-142.
 98. SCHOLZ, H., 2005 Influence of the biogenic amine tyramine on ethanol-induced behaviors in *Drosophila*. *J Neurobiol* **63**: 199-214.
 99. SCHOLZ, H., J. RAMOND, C. M. SINGH and U. HEBERLEIN, 2000 Functional ethanol tolerance in *Drosophila*. *Neuron* **28**: 261-271.
 100. SCHUSTER, C. M., 2006 Experience-dependent potentiation of larval neuromuscular synapses. *Int Rev Neurobiol* **75**: 307-322.
 101. SCHWAERZEL, M., M. MONASTIRIOTI, H. SCHOLZ, F. FRIGGI-GRELIN, S. BIRMAN *et al.*, 2003 Dopamine and octopamine differentiate between aversive and appetitive olfactory memories in *Drosophila*. *J Neurosci* **23**: 10495-10502.
 102. SHIGA, S., I. TOYODA and H. NUMATA, 2000 Neurons projecting to the retrocerebral complex of the adult blow fly, *Protophormia terraenovae*. *Cell Tissue Res* **299**: 427-439.
 103. SHIMADA, T., K. KATO and K. ITO, 2006 An Image Recognition Algorithm for Automatic Counting of Brain Cells of Fruit Fly, pp. 95-99 in *Computer Simulation Studies in Condensed-Matter Physics XVI*.
 104. SIEGMUND, T., and G. KORGE, 2001 Innervation of the ring gland of *Drosophila melanogaster*. *J Comp Neurol* **431**: 481-491.
 105. SIGGINS, G. R., M. ROBERTO and Z. NIE, 2005 The tipsy terminal: presynaptic effects of ethanol. *Pharmacol Ther* **107**: 80-98.
 106. SINAKEVITCH, I., M. NIWA and N. J. STRAUSFELD, 2005 Octopamine-like immunoreactivity in the honey bee and cockroach: comparable organization in the brain and subesophageal ganglion. *J Comp Neurol* **488**: 233-254.
 107. SINAKEVITCH, I., and N. J. STRAUSFELD, 2006 Comparison of octopamine-like immunoreactivity in the brains of the fruit fly and blow fly. *J Comp Neurol* **494**: 460-475.
 108. SNELL, G. D., and S. REED, 1993 William Ernest Castle, pioneer mammalian geneticist. *Genetics* **133**: 751-753.
 109. SOMBATI, S., and G. HOYLE, 1984 Generation of specific behaviors in a locust by local release into neuropil of the natural neuromodulator octopamine. *J Neurobiol* **15**: 481-506.
 110. SOSINSKY, A., B. HONIG, R. S. MANN and A. CALIFANO, 2007 Discovering transcriptional

- regulatory regions in *Drosophila* by a nonalignment method for phylogenetic footprinting. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**: 6305-6310.
111. SPORHASE-EICHMANN, U., H. G. VULLINGS, R. M. BUIJS, M. HORNER and F. W. SCHURMANN, 1992 Octopamine-immunoreactive neurons in the central nervous system of the cricket, *Gryllus bimaculatus*. *Cell Tissue Res* **268**: 287-304.
 112. STEVENSON, P. A., H. J. PFLUGER, M. ECKERT and J. RAPUS, 1992 Octopamine immunoreactive cell populations in the locust thoracic-abdominal nervous system. *J Comp Neurol* **315**: 382-397.
 113. STRAUSS, R., 2002 The central complex and the genetic dissection of locomotor behaviour. *Curr Opin Neurobiol* **12**: 633-638.
 114. STRAUSS, R., U. HANESCH, M. KINKELIN, R. WOLF and M. HEISENBERG, 1992 No-bridge of *Drosophila melanogaster*: portrait of a structural brain mutant of the central complex. *J Neurogenet* **8**: 125-155.
 115. STRAUSS, R., and M. HEISENBERG, 1993 A higher control center of locomotor behavior in the *Drosophila* brain. *J Neurosci* **13**: 1852-1861.
 116. STRAUSS, R., S. SCHUSTER and K. G. GOTZ, 1997 Processing of artificial visual feedback in the walking fruit fly *Drosophila melanogaster*. *J Exp Biol* **200**: 1281-1296.
 117. SWEENEY, S. T., K. BROADIE, J. KEANE, H. NIEMANN and C. J. O'KANE, 1995 Targeted expression of tetanus toxin light chain in *Drosophila* specifically eliminates synaptic transmission and causes behavioral defects. *Neuron* **14**: 341-351.
 118. TABAKOFF, B., N. CORNELL and P. L. HOFFMAN, 1986 Alcohol tolerance. *Ann Emerg Med* **15**: 1005-1012.
 119. TABAKOFF, B., and P. L. HOFFMAN, 1996 Alcohol addiction: an enigma among us. *Neuron* **16**: 909-912.
 120. THOMPSON, C. S., K. J. YAGI, Z. F. CHEN and S. S. TOBE, 1990 The effects of octopamine on juvenile hormone biosynthesis, electrophysiology, and cAMP content of the corpora allata of the cockroach *Diploptera punctata*. *J Comp Physiol [B]* **160**: 241-249.
 121. THOMSEN, M., 1969 The neurosecretory system of the adult *Calliphora erythrocephala*. IV. A histological study of the corpus cardiacum and its connections with the nervous system. *Z Zellforsch Mikrosk Anat* **94**: 205-219.
 122. TRUJILLO, K. A., and H. AKIL, 1995 Excitatory amino acids and drugs of abuse: a role for N-methyl-D-aspartate receptors in drug tolerance, sensitization and physical dependence. *Drug Alcohol Depend* **38**: 139-154.
 123. TULLY, T., and W. G. QUINN, 1985 Classical conditioning and retention in normal and mutant *Drosophila melanogaster*. *J Comp Physiol [A]* **157**: 263-277.
 124. URIZAR, N. L., Z. YANG, H. J. EDENBERG and R. L. DAVIS, 2007 *Drosophila homer* is required in a small set of neurons including the ellipsoid body for normal ethanol sensitivity and tolerance. *J Neurosci* **27**: 4541-4551.
 125. VENKEN, K. J., and H. J. BELLEN, 2007 Transgenesis upgrades for *Drosophila melanogaster*. *Development* **134**: 3571-3584.
 126. WEINER, J. L., L. ZHANG and P. L. CARLEN, 1994 Potentiation of GABAA-mediated synaptic current by ethanol in hippocampal CA1 neurons: possible role of protein kinase C. *J*

- Pharmacol Exp Ther **268**: 1388-1395.
127. WOLF, F. W., and U. HEBERLEIN, 2003 Invertebrate models of drug abuse. *J Neurobiol* **54**: 161-178.
 128. WOLF, F. W., A. R. RODAN, L. T. TSAI and U. HEBERLEIN, 2002 High-resolution analysis of ethanol-induced locomotor stimulation in *Drosophila*. *J Neurosci* **22**: 11035-11044.
 129. WRIGHT, J. M., R. W. PEOPLES and F. F. WEIGHT, 1996 Single-channel and whole-cell analysis of ethanol inhibition of NMDA-activated currents in cultured mouse cortical and hippocampal neurons. *Brain Res* **738**: 249-256.
 130. WU, G., P. H. TONNER and K. W. MILLER, 1994 Ethanol stabilizes the open channel state of the Torpedo nicotinic acetylcholine receptor. *Mol Pharmacol* **45**: 102-108.
 131. YURTTAS, L., B. E. DALE and W. R. KLEMM, 1992 FTIR evidence for alcohol binding and dehydration in phospholipid and ganglioside micelles. *Alcohol Clin Exp Res* **16**: 863-869.
 132. ZHANG, L., M. OZ, R. R. STEWART, R. W. PEOPLES and F. F. WEIGHT, 1997 Volatile general anaesthetic actions on recombinant nACh alpha 7, 5-HT3 and chimeric nACh alpha 7-5-HT3 receptors expressed in *Xenopus* oocytes. *Br J Pharmacol* **120**: 353-355.

8 Abkürzungen:

nm	Nanometer
µm	Mikrometer
µl	Mikroliter
ml	Milliliter
l	Liter
l/min	Liter pro Minute
pg	Picogramm
µg	Mikrogramm
mg	Milligramm
mM	Millimol
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
RNA	Ribonukleinsäure
DNA	Deoxyribonukleinsäure
ZNS	Zentrales Nervensystem
h	Stunde
min	Minute
sec	Sekunde
wt	Wildtyp
UAS	upstream activator sequenz
NHS	normal horse serum
ü.N.	über Nacht
RT	Raumtemperatur
Abb	Abbildung
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent
Assay	
MET	Mean Elution Time
EtOH	Ethanol
H ₂ O	Wasser
GAL4	Transkriptionsfaktor der Hefe
bzw.	beziehungsweise
z.B.	zum Beispiel
etc.	et cetera
et al.	et alii (und andere)

9 Anhang

9.1 Tabellen

	MET1	SEM	MET2	SEM	Toleranz %	SEM	Anzahl
w¹¹¹⁸	19,3	0,7	25,8	0,9	34,3	2,4	16
w¹¹¹⁸, TBH-M18	20,4	0,8	23,9	1,2	17,0	2,3	12
w+	19,3	0,8	25,1	1,0	30,1	2,5	12
w+, TBH-M18	20,6	0,7	24,3	0,6	18,3	3,1	10

Tabelle A 1: MET1, MET2 und Ethanoltoleranz der Kontrollgruppen w^{1118} und $T\beta H^{M18}$

	MET1	SEM	MET2	SEM	Toleranz %	SEM	Anzahl
1.3TbH-GAL4	21,0	0,5	27,8	0,7	33,0	3,8	7
UAS-PKAinh	20,2	0,7	27,6	0,4	36,9	3,4	7
1.3TbH-GAL4xPKAinh	19,6	0,2	27,0	0,7	37,5	3,9	7

Tabelle A 2: MET1, MET2 und Ethanoltoleranz der 1.3TbH-GAL4 Linie gekreuzt gegen *UAS-PKAinh*

	MET1	SEM	MET2	SEM	Toleranz %	SEM	Anzahl
AppI	23,3	0,6	27,8	0,6	19,8	2,4	12
UAS-TβH	23,2	0,5	24,1	0,5	4,2	1,2	12
AppIxUAS-TβH	22,3	0,5	25,0	0,4	12,4	1,9	12
AppIxTβH	22,7	0,4	25,9	0,6	14,1	2,1	12

Tabelle A 3: MET1, MET2 und Ethanoltoleranz der *AppI*-GAL4 Linie gekreuzt gegen $T\beta H^{M18}$, *UAS-TβH*

	MET1	SEM	MET2	SEM	Toleranz %	SEM	Anzahl
1.3TbH-GAL4	19,9	0,3	28,1	0,4	41,3	1,9	7
UAS-Kir	25,4	0,5	34,1	0,8	34,3	2,2	7
1.3TbH-GAL4xUAS-Kir	31,5	0,5	35,0	0,4	11,3	1,3	7

Tabelle A 4: MET1, MET2 und Ethanoltoleranz der 1.3TbH-GAL4 Linie gekreuzt gegen *UAS-Kir2.1* (T-Test MET1: 1.3TbH-GAL4/*UAS-Kir2.1* zu *UAS-Kir* $p \leq 7,8E-6$ // 1.3TbH-GAL4/*UAS-Kir2.2* zu 1.3TbH-GAL4 $p \leq 5,6E-7$ // *UAS-Kir* zu 1.3TbH-GAL4 $p \leq 5,0E-5$)

	MET1	SEM	MET2	SEM	Toleranz %	SEM	Anzahl
1.3TbH-GAL4	20,2	0,9	27,5	1,1	36,6	3,0	8
UAS-TNT	15,3	0,3	20,6	0,4	35,0	2,9	8
1.3TbH-GAL4xUAS-TN1	17,6	0,5	23,6	0,5	34,5	2,6	8

Tabelle A 5: MET1, MET2 und Ethanoltoleranz der 1.3TbH-GAL4 Linie gekreuzt gegen *UAS-TNT*

	MET1	SEM	MET2	SEM	Toleranz %	SEM	Anzahl
4.6TbH-GAL4	20,6	1,2	28,3	1,2	38,6	3,8	8
UAS-TNT	18,4	0,6	25,6	0,9	40,1	5,5	8
4.6TbH-GAL4xUAS-TNT	18,3	0,5	24,9	0,5	35,9	3,9	8

Tabelle A 6: MET1, MET2 und Ethanoltoleranz der 4.6*TbH*-GAL4 Linie gekreuzt gegen *UAS-TNT*

	MET1	SEM	MET2	SEM	Toleranz %	SEM	Anzahl
6.2TbH-GAL4	25,7	0,8	33,5	0,7	30,6	2,3	5
UAS-TNT	16,8	0,5	22,4	0,4	33,9	4,2	5
6.2TbH-GAL4xUAS-TNT	18,3	1,1	23,9	1,5	30,1	4,7	5

Tabelle A 7: MET1, MET2 und Ethanoltoleranz der 6.2*TbH*-GAL4 Linie gekreuzt gegen *UAS-TNT*

25 min	MET2	SEM	Anzahl
6.2TbH-GAL4	22,9	0,4	6
UAS-TNT	16,9	0,5	6
6.2TbH-GAL4xUAS-TNT	14,5	0,5	6

Tabelle A 8: MET1, MET2 und Ethanoltoleranz der 6.2*TbH*-GAL4 Linie gekreuzt gegen *UAS-TNT* nach 25min Begasung (T-Test: 6.2*TbH*-GAL4/*UAS-TNT* zu *UAS-TNT* $p \leq 0,02$ // 6.2*TbH*-GAL4/*UAS-TNT* zu 6.2*TbH*-GAL4 $p \leq 0,00003$)

	MET1	SEM	MET2	SEM	Toleranz %	SEM	Anzahl
6.6TbH-GAL4	22,8	0,8	30,4	0,9	33,6	4,2	8
UAS-TNT	16,2	0,6	22,8	1,2	40,6	4,0	8
6.6TbH-GAL4xUAS-TNT	19,5	0,6	28,1	0,8	43,9	1,8	8

Tabelle A 9: MET1, MET2 und Ethanoltoleranz der 6.6*TbH*-GAL4 Linie gekreuzt gegen *UAS-TNT*

	MET1	SEM	MET2	SEM	Toleranz %	SEM	Anzahl
650TbH-GAL4	22,3	0,5	28,0	0,7	25,3	2,2	7
UAS-TNT	16,2	0,5	22,5	0,7	39,5	3,3	7
650TbH-GAL4xUAS-TNT	18,6	0,6	24,6	0,9	32,4	1,8	7

Tabelle A 10: MET1, MET2 und Ethanoltoleranz der 650*TbH*-GAL4 Linie gekreuzt gegen *UAS-TNT*

	MET1	SEM	MET2	SEM	Toleranz %	SEM	Anzahl
TDC-GAL4	24,8	1,2	31,7	0,9	29,5	4,7	11
UAS-Kir	26,5	0,9	34,6	0,9	31,3	3,1	10
TDC-GAL4xUAS-Kir	21,9	0,9	29,3	1,1	34,4	4,8	8

Tabelle A 11: MET1, MET2 und Ethanoltoleranz der *Tdc2*-GAL4-Linie gekreuzt gegen *UAS-Kir2.1* (T-Test MET1: *Tdc2*-GAL4/*UAS-Kir2.1* zu *Tdc2*-GAL4 $p \leq 7,9E-14$ // *Tdc2*-GAL4/*UAS-Kir2.1* zu *UAS-Kir2.1* $p \leq 3,4E-3$ // *UAS-Kir2.1* zu *Tdc2*-GAL4 $p \leq 2,7E-1$)

20 min	MET2	SEM	Anzahl	
w+		25,1	0,9	5
hs-TbH+		21,8	1,0	5
w+ HS		24,8	0,6	5
hs-TbH+ HS		23,2	0,8	5

Tabelle A 12: MET2 nach 20 min Begasung von *hs-TβH;w¹¹⁸* und *hs-TβH;TβH^{M18}* mit bzw. ohne Hitzeschock (HS) nach 20 min Begasung (T-Test: *w⁺ HS⁻* zu *TβH^{M18}*; *hsp70-TβH HS⁻* $p \leq 0,01$ // *w⁺ HS⁺* zu *TβH^{M18}*; *hsp70-TβH HS⁺* $p \leq 0,01$ // *TβH^{M18}*; *hsp70-TβH HS⁻* zu *TβH^{M18}*; *hsp70-TβH HS⁺* $p \leq 0,12$)

	MET1	SEM	Anzahl
6.2-GAL4	29,06	0,76	4
UAS-Kir	30,22	1,08	4
6.2-GAL4xUAS-Kir	39,11	0,76	4

Tabelle A 13: MET1 der 6.2 *TβH-GAL4* Linie gekreuzt gegen *UAS-Kir2.1* (T-Test: 6.2 *TβH-GAL4/UAS-Kir2.1* zu *UAS-Kir2.1* $p \leq 0,001$ // 6.2 *TβH-GAL4/UAS-Kir2.1* zu 6.2 *TβH-GAL4* $p \leq 0,0007$)

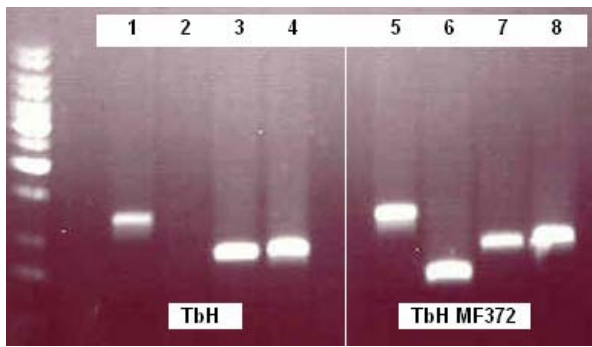
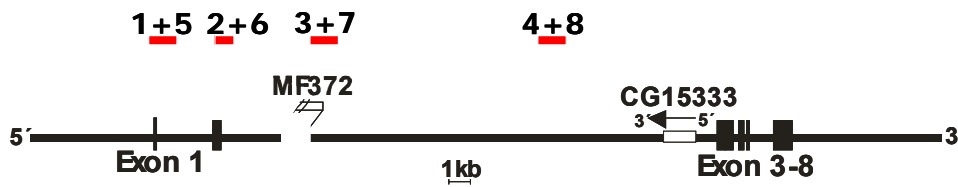


Abbildung A 2: Kartierung der Deletion der *TβH^{M18}* Mutante. (Links)

Gelfoto einer PCR. Die RT-PCR wurde an *TβH^{M18}* mutanten Fliegen und an der P-Element Insertionslinie *TβH^{MF372}* durchgeführt. (Unten) Schematische Zeichnung des *TβH* Gens. Die jeweiligen Nummern der Gelbanden von 1-8 sind in Form von roten Balken über der ihnen entsprechenden genomischen Region eingezeichnet. Gut erkennbar ist, dass die dem Exon 2 entsprechende Bande in Spur 2 der *TβH*-cDNA der *TβH^{M18}* Mutante fehlt. Demzufolge ist dieser Teil des *TβH* Gens deletiert.



10 Erklärung

Erklärung gemäß § 4 Absatz 3 der Promotionsordnung der Fakultät für Biologie der Bayerischen Julius-Maximilians-Universität zu Würzburg vom 15. März 1999.

Hiermit erkläre ich, die vorgelegte Dissertation selbständig angefertigt zu haben und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet zu haben. Alle aus der Literatur genommenen Stellen sind als solche kenntlich gemacht. Des Weiteren erkläre ich, dass die vorliegende Arbeit weder in gleicher noch in ähnlicher Form bereits in einem anderen Prüfungsverfahren vorgelegen hat. Zuvor habe ich keine akademischen Grade erworben oder zu erwerben versucht.

Ashburn, den 16. Oktober 2007

Stefanie Hampel

Mit dem Wissen wächst der Zweifel.

Johann Wolfgang von Goethe

11 Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Stefanie Hampel
Anschrift: Borngasse 15a
36460 Kieselbach
Deutschland

Tel.: 036963/63015
E-mail:hampels@janelia.hhmi.org
Geburtsdatum/-ort: 05.04.1981/ in Weimar
Geschlecht: weiblich
Nationalität: deutsch
Familienstand: ledig

Ausbildung

Weiterbildung

12/2005 Konferenz Berlin
02/2006 Konferenz Leipzig
09/2006 Konferenz „Neurofly“ Leuven
03/2007 Konferenz Göttingen

Hochschule

9/2004 - 8/2007 Universität Würzburg, Würzburg
Promotion Neurobiologie und Genetik

10/1999 - 05/2004 Universität Würzburg, Würzburg
Diplom Genetik, Virologie & Immunologie, Tierphysiologie,

Schule

08/1991 - 06/1999 Dr. Sulzberger Gymnasium, Bad Salzungen

Berufserfahrung

Forschung und Betreuung

2007 - Research Specialist (HHMI)
2003 – 2007 Betreuung F1-Praktikum Genetik
2006 Betreuung Diplomarbeit; Genetik und Neurobiologie
2004 - 2005 Betreuung F2-Praktikum Genetik
5/2004 – 8/2004 HiWi; Lehrstuhl für Genetik und Neurobiologie
9/2002 – 12/2002 Laborarbeit, Virologie Würzburg
2002 Tutor Methodenpraktikum Genetik

12 Danksagung

An erster Stelle möchte ich meinen Eltern danken! Für ihre emotionale und finanzielle Unterstützung seit nun 26 Jahren bei allem, was ich mir vorgenommen und letztendlich auch gemacht habe. Ohne Euch wäre ich nie soweit gekommen. Vielen vielen Dank!!!

Erich danke ich für seine Unterstützung und Hilfsbereitschaft, gerade auch bei schwierigen Angelegenheiten. Danke, dass ich Dich jederzeit um Rat fragen durfte!

Henrike Scholz möchte ich für die Finanzierung meiner Doktorarbeit danken.

Vielen Dank Herr Heisenberg für die Abende des gemeinsamen Philosophierens auf Schloss Reichenberg.

Weitere ganz liebe Dankeschöns bekommen:

Meine Kieselbacher Nachbarschaft mit meinem Patenkindchen Nils! Ich möchte mich bei euch dafür bedanken, dass ihr mir das Gefühl gebt jederzeit willkommen und zu Hause zu sein!

Ein riesengroßes Dankeschön geht an dieser Stelle an Arnim, der mir bei allen Problemen versucht hat zu helfen und jederzeit da war, wenn ich ihn brauchte! Vielen Danke auch an ihn für die Hilfe bei meiner Dr.-Arbeit! Zudem wäre ohne ihn die Formatierung der Arbeit eine Katastrophe geworden...

Meinen Freunden Andi, Anne, Antje, Arnim, Bessi, Dennis, Jana, Mareike, Mony und Stephan danke ich sehr, dass sie immer für mich da waren, in „guten und in schlechten Zeiten“.

Allen meinen lieben Laborkollegen bzw. Freunden Mirjam, Yvonne, Vanessa, Anne, André, Birgit, Franco, Tom V., Tom R., Jens, Osman, Benjamin, Rouven, Bertram und Suse möchte ich für die schöne Zeit im Labor danken! Vielen Dank für Eure Hilfsbereitschaft! Es war trotz der ...Umstände eine tolle Zeit!

Mareike vielen Dank für das Oktopamin-Protokoll!!! :o)

Und danke an Ron, der sich immer Zeit genommen hat, um Fragen zu beantworten und zu helfen!

Roland, Kirska und Tilman danke ich für ihre Hilfe bei den für mich „exotischen“ Laufverhaltens-Experimenten und deren Auswertungen! Und natürlich für die netten Gespräche im Fliegenlabor!

Burkhard danke ich für die Beantwortung fast aller Fragen und die Korrektur meiner Arbeit in nur 3 Tagen!!! :o) ...und natürlich für die tolle gemeinsame Zeit beim Betreuen der Praktika.

Den fleißigen Bienchen Gertrud, Susanne, Barbara, Conny, Silvia und Dieter gilt ein ganz liebes Dankeschön für ihre stetige Hilfsbereitschaft und für die Verbreitung einer so tollen Arbeitsatmosphäre.

Jessica und Margit bekommen auch ein ganz herliches Dankeschön für die stetige Hilfe in allen organisatorischen Bereichen und für die tolle Zusammenarbeit!