

Quelle Titelbild: <http://www.bio.utexas.edu/faculty/wallingford/pics/drosophila.gif>

Die Rolle des Neurotransmitters Serotonin bei der
Entwicklung von Ethanol sensitivität und Toleranz in
Drosophila melanogaster



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

vorgelegt von

Yvonne Ritze

Würzburg, 2007

Eingereicht am:

Mitglieder der Promotionskommission

Vorsitzender:	Prof. Dr. M. Müller
Gutachter:	Prof. Dr. E. Buchner
Gutachter:	Prof. Dr. G. Krohne

Tag der Promotionskolloquiums:

Doktorurkunde ausgehändigt am:

Meiner Mutter, Hiltrud Ritze

und

Meinem Vater, Helmut Ritze

Für mich, die besten Eltern.

Wer will, ist dem nicht alles möglich?

Johann Wolfgang Goethe

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	12
1.1. Alkoholabhängigkeit und die Wirkung von Ethanol auf das Gehirn	12
1.2. 5-Hydroxytryptamin (5-HT), ein Molekül und seine Geschichte	14
1.3. 5-Hydroxytryptamin und Alkohol	15
1.4. <i>Drosophila melanogaster</i> als Modell für die genetischen und neuronalen Grundlagen von Ethanol induziertem Verhalten	18
1.5. Das serotonerge System in <i>Drosophila melanogaster</i>	21
1.6. Der Serotonin Transporter: Aufbau und Funktion	23
1.7. Der Serotonin Rezeptor 1b: Aufbau und Funktion	26
1.8. Die Fragestellung	29
2. Material und Methoden	30
2.1. Material	30
2.1.1. Chemikalien	30
2.1.2. Enzyme	30
2.1.3. Antikörper	30
2.1.4. Primer, Nukleotide, Sequenzierungen	30
2.1.5. Vektoren	32
2.1.6. Bakterienstämme	32
2.1.7. <i>Drosophila melanogaster</i> Stämme	32
2.1.8. <i>Drosophila</i> Aufzucht und Haltung	33
2.1.9. Puffer und Lösungen	33
2.1.10. Medien und Platten	37
2.2. Methoden	38
2.2.1. DNA Isolierung und Klonierung	38
2.2.2. Plasmid-DNA Minipräparation	38
2.2.3. Fällung von DNA	39
2.2.4. Restriktionsverdau	39
2.2.5. Präparativer Verdau	40

2.2.6.	Transformation von hitzekompetenten Zellen	41
2.2.7.	Keimbahntransformation	41
2.2.8.	Klonierungsstrategie zur Herstellung eines <i>uasgfp-sert</i> Konstruktes	42
2.2.9.	Klonierungsstrategie zur Herstellung eines <i>uasgfp-sert^{DN}</i> Konstruktes	44
2.2.10.	Klonierungsstrategie zur Herstellung eines dSERT Antikörpers	46
2.2.11.	Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA)	51
2.2.12.	Antikörperfärbung von <i>whole-mount Drosophila</i> Köpfen	52
2.2.13.	Gefrierschnitte	52
2.2.14.	Elektronenmikroskopie	53
2.2.15.	P-Element Mutagenese	54
2.2.16.	DNA-Isolation aus Fliegen	55
2.2.17.	PCR	56
2.2.18.	Messung von Ethanolsensitivität und Toleranz	57
3.	Ergebnisse	59
3.1.	Einfluss von veränderten 5HT Konzentrationen auf Ethanolsensitivität und Toleranz	59
3.1.1.	Kurzfristige Veränderungen der 5HT Konzentrationen haben keinen Einfluss auf die Ethanolsensitivität oder Toleranz	60
3.1.2.	Veränderung der Signaldauer von 5HT hat einen Einfluss auf Ethanolsensitivität und Toleranz	64
3.1.3.	In Fliegenköpfen von <i>w¹¹¹⁸</i> Fliegen ist die 5HT Konzentration im Vergleich zu CantonS Fliegen nicht reduziert	68
3.1.4.	Überexpression des dSERTs in einem Großteil der Neurone hat keinen Einfluss auf Ethanolsensitivität oder Toleranz	69
3.1.5.	Die Expression eines putativ dominant negativen dSERT Konstruktes in einem Großteil der Neuronen verändert Ethanolsensitivität und Toleranz nicht	74
3.1.6.	Inhibition der Neurotransmitter Ausschüttung während der Entwicklung in einer Untergruppe von serotonergen und dopaminergen Neuronen beeinflusst weder Ethanolsensitivität noch Toleranz	79
3.1.7.	Inhibition der 5HT Ausschüttung während der Entwicklung in einer Untergruppe von serotonergen Neuronen erhöht die Ethanolsensitivität	82

3.1.8.	Überexpression des dSERTs während der Entwicklung in einer Untergruppe von serotonergen Neuronen beeinflusst weder Ethanol sensitivität noch Ethanol toleranz	83
3.1.9.	Inhibition der Neurotransmitterausschüttung mit einer 5HT1b Rezeptor GAL4 Linie beeinflusst die Ethanol sensitivität und die Toleranz	85
3.1.10.	Eine Gruppe von Dopamin positiven Neuronen vermittelt Ethanol sensitivität, nicht aber Toleranz	88
3.2.	Identifizierung von serotonergen und dopaminergen Neuronen im adulten Gehirn von <i>Drosophila melanogaster</i> und Charakterisierung von zwei putativ serotonergen GAL4 Treiberlinien <i>sert1+2</i> -GAL4 und <i>5htr1b</i> -GAL4	90
3.2.1.	Bestimmung der serotonergen Neurone im adulten Gehirn von <i>Drosophila melanogaster</i>	90
3.2.2.	Die <i>sert1+2</i> -GAL4 Treiberlinie ermöglicht die Expression von <i>uas</i> -Transgenen in 40 serotonergen Neuronen im adulten Gehirn	93
3.2.3.	Die <i>5htr1b</i> -GAL4 Linie exprimiert in 20 serotonergen Neuronen GFP	95
3.2.4.	Die <i>5htr1b</i> -GAL4 Linie exprimiert in elf dopaminergen Neuronen GFP	98
3.3.	P-Element Mutagenese zur Herstellung einer <i>dsert</i> Mutante	102
4.	Diskussion	107
4.1.	Pharmakologische Manipulation der 5HT Konzentrationen in <i>Drosophila</i>	107
4.2.	Genetische Manipulation der 5HT Konzentrationen mit dem dSERT in <i>Drosophila</i>	111
4.3.	Inhibition der Neurotransmission von serotonergen und dopaminergen Neuronen	113
4.4.	Neuroanatomische Studien von serotonergen und dopaminergen Neuronen zweier GAL4 Linien	114
4.5.	Gehirnregionen und Neurone, die möglicherweise Ethanol sensitivität oder Toleranz vermitteln	117
4.6.	Perspektiven	118
5.	Zusammenfassung	120
6.	Summary	123
7.	Literaturverzeichnis	126
8.	Abkürzungen	139

A. Anhang: Tabellen	141
B. Anhang: Bilder	145

1. Einleitung

1.1. Alkoholabhängigkeit und die Wirkung von Ethanol auf das Gehirn

Etwa 10,4 Millionen Menschen konsumieren in Deutschland Alkohol in gesundheitlich riskanter Form, 1,7 Millionen davon gelten als Alkohol abhängig. Des Weiteren trinken 20% der Jugendlichen zwischen 12 und 25 Jahren regelmäßig Alkohol (BMG 2007).

Alkoholabhängigkeit ist eine komplexe Krankheit die von genetischen Parametern und Umweltfaktoren beeinflusst wird. Die für Alkoholabhängigkeit verantwortlichen Auslöser, wie zum Beispiel Alter, Persönlichkeit und psychischer Stress, variieren von Individuum zu Individuum. Dennoch wird versucht die Alkoholabhängigkeit verschiedenen Typologien zuzuordnen (EPSTEIN et al. 2002). Es wird unterschieden zwischen eindimensionalen Typologien, wenn sie auf einer einzigen Variablen basieren oder multidimensionalen, die auf zwei oder mehr Variablen basieren (BABOR et al. 1992a; LITT et al. 1992). Eindimensionale Typologien charakterisieren einen Patienten auf Grund der Erhebung eines einzelnen Faktors wie z.B. dem Alter bei Beginn der Alkoholabhängigkeit. Multidimensionale Typologien ziehen jedoch mehrere Faktoren heran, z. B. psychische Faktoren und Familienhintergrund (Übersicht, VERHEUL 2001; PENICK et al. 1999). Eine viel versprechende multidimensionale Typologie ist das Typ A/B Schema, das viele wichtige Kriterien einschließt, wie zum Beispiel Alter und Beginn der Abhängigkeit (BABOR et al. 1992b). Es stellt sich jedoch die Frage, ob dichotome Typologien komplex genug sind, um eine Alkoholabhängigkeit klinisch sinnvoll zu kategorisieren (EPSTEIN et al. 2002).

In Familien- wie auch in Populationsstudien wurden Gene identifiziert, die mit Alkoholabhängigkeit in Verbindung gebracht werden, indem familiärer und genetischer Hintergrund der Probanden untersucht wurde (HINCKERS et al. 2006).

Es wurden verschiedene Gene sowie Genvarianten gefunden, die ein Risiko für Alkoholabhängigkeit darstellen (Übersicht, ENOCH 2006; THOME et al. 2000). Die meisten dieser Gene werden mit Neurotransmittersystemen und mit Ethanol Metabolismus assoziiert (Übersicht, QUICKFALL und EL GUEBALY 2006). Beispiele für diese Gene sind unter anderem dopa-

minerger Rezeptoren, der Serotonin Transporter und Dehydrogenasen (Überblick, THOME et al. 2000).

Es gibt Hinweise, dass eine genetische Prädisposition ein etwa 50%iges Risiko für eine Alkoholabhängigkeit mit sich bringt (BUTTON et al. 2007; SCHUCKIT und SMITH 2000). Der genaue Mechanismus, der von normaler Alkoholaufnahme zu chronischer Alkoholabhängigkeit führt, ist jedoch noch nicht entschlüsselt.

Des Weiteren löst Ethanol eine Reihe von neurochemischen Effekten im Gehirn aus, die inhibitorische und excitatorische Neurotransmittersysteme betreffen (Übersicht, DAVIES 2003; NIE et al. 1994). Der Neurotransmitter γ -Aminobuttersäure (GABA) z. B. wirkt inhibitorisch, wobei Ethanol die GABA-A Rezeptor Funktion potenziert, indem er Ligandenspezifische Ströme direkt beeinflusst (WEINER et al. 1994). Auf der anderen Seite inhibiert Ethanol den excitatorischen Liganden-gesteuerten N-Methyl-D-Aspartat (NMDA) Rezeptor. Der Einfluss von Alkohol auf die Erregbarkeit der Neuronen führt auf lange Sicht zu neuronalen Anpassungen der betroffenen Neurotransmittersysteme (SIGGINS et al. 2005; Übersicht, DAVIES 2003).

Studien an Menschen, sowie in verschiedenen Tiermodellen konnten zeigen, dass Ethanol einen Anstieg der extrazellulären Dopamin Konzentrationen im limbischen System bewirkt und dass dieser Effekt kritisch für eine Suchtentwicklung sein kann. Dabei verursacht Dopamin einen Zustand der Erregung. Dies kann nach wiederholtem Ethanolkonsum zu abnormalen motivierenden Zuständen, wie z.B. das unwiderstehliche Verlangen die Droge zu beschaffen und zu konsumieren, führen. Dieses Verhalten wird auch bei alkoholabhängigen Menschen beobachtet (CHIARA et al. 2004; BOILEAU et al. 2003; BRADBERRY 2002).

Zusätzlich interagiert Ethanol mit einer Reihe von anderen Neurotransmitter Rezeptoren. Auf diese Interaktion wird bei Nicotin-Acetylcholin (nACh) Rezeptoren, wie z.B. *Torpedo* die Verschiebung des offen/zu Gleichgewichtes nach offen hin zurückgeführt (AISTRUP et al. 1999; WU et al. 1994; LOVINGER et al. 1989). Weitere von Ethanol beeinflusste neuronale Rezeptoren sind Serotonin Rezeptoren, z. B. der 5-HT₃ Rezeptor und Glycin Rezeptoren, wobei vermutet wird, dass Ethanol den 5-HT₃ Rezeptor ähnlich beeinflusst wie den *Torpedo* nACh Rezeptor (LOVINGER et al. 2000). Glycin Rezeptoren werden aktiviert indem Ethanol an spezifische Aminosäuren bindet (MIHIC 1999). Die genaue Wirkung von Ethanol im Bezug auf Pharmakologie und Alkoholabhängigkeit ist jedoch unklar.

Maßgebende Kriterien für Alkoholabhängigkeit und -missbrauch werden im wichtigsten

psychiatrischen Diagnosehandbuch DSM-IV (ASSOCIATION 2000) definiert. Ein Kriterium für Alkoholabhängigkeit lautet Toleranz, das heißt eine reduzierte Sensitivität gegenüber einer Alkoholintoxikation. Demnach führt erhöhter Alkoholkonsum zu einer Toleranz gegenüber den aversiven Effekten einer Alkoholintoxikation (CUNNINGHAM et al. 2002). Außerdem wurde gezeigt, dass für Menschen, die nach Ethanolgabe mehr angenehme und stimulierende als negative Effekte, wie z.B. Angst oder Depression, angaben, ein erhöhtes Risiko einer Alkoholabhängigkeit besteht. Diese Beobachtung wurde bei Söhnen von Alkoholikern und mittleren bis starken Trinkern gemacht und korreliert demnach unter anderem mit Alkoholismus in der Familie (HOLDSTOCK et al. 2000; NEWLIN und THOMSON 1999). Eine erhöhte Alkoholtoleranz wird auch mit einem Polymorphismus im Serotonin Transporter (SERT) in Verbindung gebracht. Festgestellt wurde, dass junge Erwachsene (<26 Jahre) erhöhte Alkoholtoleranz zeigen, wenn sie homozygot für das kurze Allel des SERT sind (TUERKER et al. 1998). Eine Studie in Ratten untersuchte die Entwicklung von Ethanoltoleranz im Bezug auf Serotonin. In dieser Studie wurde gezeigt, dass in Ratten mit einer Serotonin Depletion im gesamten Gehirn die Toleranzentwicklung verzögert ist und wenn zusätzlich Norepinephrin dezimiert wird keine Ethanoltoleranzentwicklung mehr stattfindet (LE et al. 1981).

Die vorliegende Arbeit untersucht den Einfluss des serotonergen Systems auf Ethanoltoleranz und Ethanol sensitivität in *Drosophila melanogaster*.

1.2. 5-Hydroxytryptamin (5-HT), ein Molekül und seine Geschichte

In den frühen 30er Jahren des letzten Jahrhunderts isolierte Vittorio Erspamer aus Darmzellen einen Stoff, der die Kontraktion von glatter Muskulatur auslöste. Diesen Stoff nannte er Enteramin (ERSPAMER und VIALLI 1937).

Mehr als 10 Jahre später wurde eine Venenkontraktion auslösende Substanz aus Serum isoliert und Serotonin genannt (RAPPORT et al. 1948a; RAPPORT et al. 1948b). Der Name Serotonin leitet sich von seiner Wirkung auf den Blutdruck ab. Serotonin ist die Komponente des Serums, die den Tonus (Druck) in den Blutgefäßen reguliert (RAPPORT et al. 1948a). Erst 1952 stellte man fest, dass Enteramin identisch mit Serotonin ist. Betty Twarog untersuchte zu der Zeit einen damals noch unbekanntes Neurotransmitter, der für die Muskelkontraktion in der Muschel (*Mytilus edulis*) verantwortlich ist. Sie

wurde auf Enteramin aufmerksam, weil Studien von Erspamer zeigten, dass Enteramin die Herzschlagfrequenz von Tintenfischen beeinflusst. Der unbekannte Neurotransmitter hatte demnach eine ähnliche Funktion wie Enteramin und außerdem eine chemische Struktur ähnlich dem Serotonin. Dies führte zu der Erkenntnis, dass es sich bei dem unbekanntem Neurotransmitter um Serotonin handelt und dass Serotonin identisch mit Enteramin ist (TWAROG und PAGE 1953).

Chemisch gesehen ist Serotonin ein Indolamin und wird 5-Hydroxytryptamin (5HT) genannt. 5HT gehört gemeinsam mit Dopamin, Noradrenalin und Adrenalin zur Gruppe der Monoamine. Der Syntheseweg von 5HT ist in Abb. 1.1 dargestellt. Synthetisiert wird 5HT aus der Aminosäure Tryptophan. Im ersten Schritt wird Tryptophan zu 5-Hydroxytryptophan hydroxyliert. Verantwortlich dafür ist das, die Syntheserate bestimmende, Enzym Tryptophan Hydroxylase (TPH). Zwei verschiedene Gene kodieren für die TPH. TPH1 ist für die 5HT Synthese in der Peripherie zuständig, während TPH2 für die 5HT Synthese im zentralen Nervensystem (ZNS) verantwortlich ist (WALTHER und BADER 2003). Im zweiten Schritt wird 5-Hydroxytryptophan von einer L-aromatischen Aminosäure Decarboxylase decarboxyliert. Diese Carboxylase ist auch in die Synthese von Catecholaminen wie z. B. Dopamin involviert, also nicht 5HT spezifisch. Das Endprodukt ist 5-Hydroxytryptamin (5HT) oder Serotonin. Die Signaltransduktion von 5HT im Vertebraten Gehirn erfolgt über 14 prä- und postsynaptische Serotonin Rezeptoren (siehe 1.7)(NESTLER et al. 2001).

5HT ist in eine Vielzahl von Prozessen involviert, wie z. B. Emotion, Schlaf, Nahrungsaufnahme etc. (HEILS et al. 1996). Eine Veränderung der 5HT Konzentration bzw. 5HT Signaltransduktion kann zu Krankheitsbildern wie Depression, Ängsten, Impulsivität etc. führen (LESCH et al. 1996; VIRKKUNEN und LINNOILA 1997). Des Weiteren wird eine veränderte 5HT Konzentration bzw. 5HT Signaltransduktion im Gehirn von Menschen und Nagetieren mit einer erhöhten Alkoholaufnahme assoziiert (MCBRIDE et al. 1989; MURPHY et al. 1982; BALLENGER et al. 1979).

Der Zusammenhang zwischen 5HT und Alkoholabhängigkeit soll im Folgenden näher erläutert werden.

1.3. 5-Hydroxytryptamin und Alkohol

Viele klinische Studien wurden durchgeführt, die den Zusammenhang zwischen einem veränderten serotonergen System und Alkoholabhängigkeit untersuchten. Dabei gibt es zwei

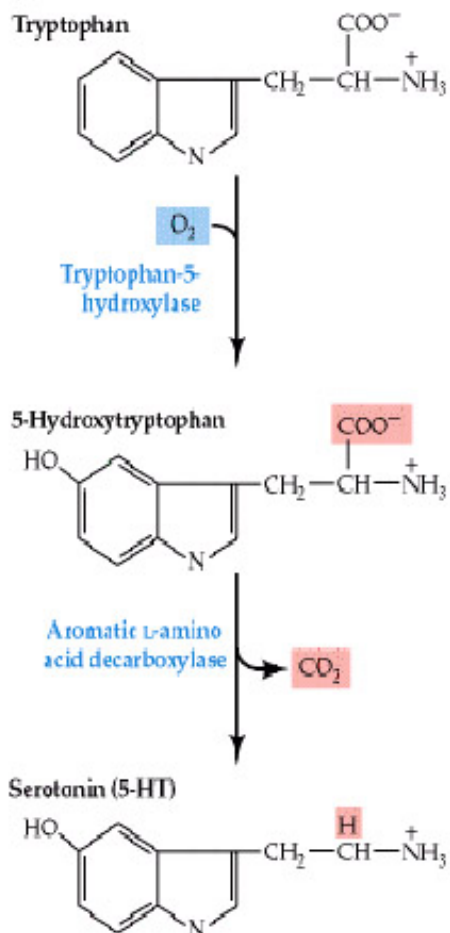


Abb. 1.1.: **Serotonin Syntheseweg.** Serotonin (5HT) wird aus der Aminosäure Tryptophan gebildet. Im ersten Schritt wird Tryptophan hydroxiliert zu 5-Hydroxytryptophan. Im zweiten Syntheseschritt wird 5-Hydroxytryptophan decarboxyliert zu 5-Hydroxytryptamin. Die zwei involvierten Enzyme sind eine Tryptophan-5-Hydroxylase und eine aromatische L-Aminosäure Decarboxylase.

Ansätze: einerseits werden die Auswirkungen von akuter Alkoholgabe auf das serotonerge System untersucht (LOVINGER 1997) und andererseits die Veränderungen des serotonergen Systems bei alkoholabhängigen Patienten (BANKI 1981; BECK et al. 1983).

Akuter Alkoholeinfluss z.B. führt zu einer erhöhten 5HT Aktivität im Gehirn. Nach Alkoholkonsum konnten erhöhte Konzentrationen von 5HT Abbauprodukten im Blut und Urin nachgewiesen werden (LOVINGER 1997). Bei alkoholabhängigen Probanden sind die stärksten Indizien für eine Rolle von 5HT ebenfalls 5HT Abbauprodukte, z.B. reduzierte 5-Hydroxyindolessigsäure (5-HIAA) Werte in der Zerebrospinalflüssigkeit (BORG et al. 1985; BANKI 1981) und reduzierte Tryptophan Werte im Plasma (BUYDENS-BRANCHEY et al. 1989; BECK et al. 1983; BRANCHEY et al. 1981). Postuliert wird, dass chronische Alkoholaufnahme im Menschen, die zu messbar weniger Abbauprodukten von Serotonin in der Zerebrospinalflüssigkeit führt, auf einer Reduktion der serotonergen Funktionen beruht (BALLENGER et al. 1979). Des Weiteren gibt es eine Prädisposition für reduzierte 5HT-Werte bei nicht alkoholabhängigen Menschen mit starkem Alkoholismus in der Familie (LINNOILA et al. 1989; ROSENTHAL et al. 1980).

Der Nachteil von klinischen Studien am Menschen ist die hohe Variabilität und die Limitation in der Durchführung. Kritische Aspekte sind: a) die sehr unterschiedliche Durchführung einzelner Studien (verschiedene Fragebögen zum Krankheitsverlauf etc.) b) die hohe Variabilität der Genpools von verschiedenen Populationen auf unterschiedlichen Kontinenten (KRANZLER et al. 2002; GELERNTER et al. 1999) c) die oft sehr kleine Anzahl an Patienten (NARANJO und BREMNER 1994). Erschwerend kommt hinzu, dass Alkoholabhängigkeit meist als komorbide Erkrankung mit Depression, Angst, Impulsivität, etc. einher geht, Krankheiten, die ebenfalls mit dem serotonergen System assoziiert werden (LESCH 2005, LESCH et al. 1996; JOORDENS et al. 1998; LINNOILA 1989).

Um die serotonerge Kontrolle der Alkoholaufnahme auf Basis von neurochemischen Interaktionen und neuroanatomischen Signalwegen zu untersuchen, muss auf Tiermodelle zurückgegriffen werden. Eine Reduktion von 5HT und 5-HIAA wurde z. B. in verschiedenen Gehirnregionen von Nagetieren gemessen, die eine Präferenz für Alkohol zeigen (GONGWER et al. 1989; BADAWY et al. 1989). Ein Großteil der Studien in Ratten und Mäusen konnte außerdem zeigen, dass 5HT Vorstufen, Agonisten und 5HT Wiederaufnahmehemmer die Alkoholaufnahme reduzieren (MAUREL et al. 1999; ZABIK et al. 1994).

Problematischer ist die Wirkung von 5HT Vorstufen und Wiederaufnahmehemmern im Menschen, da sie eine Reduktion der Alkoholaufnahme fördern, aber nicht notwendiger

Weise zur Heilung der Alkoholabhängigkeit beitragen (Diskutiert in NARANJO und KNOKE 2001).

Abschließend kann man sagen, dass eine erhöhte Alkoholaufnahme mit einer Reduktion der 5HT Neurotransmission assoziiert wird. Ein biphasischer Effekt der 5HT Neurotransmission wird postuliert, der nach erstem Ansteigen direkt nach Alkoholaufnahme auf längere Sicht zu einer Abnahme der 5HT Neurotransmission führt.

1.4. *Drosophila melanogaster* als Modell für die genetischen und neuronalen Grundlagen von Ethanol induziertem Verhalten

Drosophila melanogaster wurde 1830 das erste Mal von Johann Wilhelm Meigen beschrieben (MEIGEN 1830) (Abb. 1.2). 1901 arbeitete der Zoologe und Vererbungsforscher William Ernest Castle als erster mit *Drosophila* als Modellorganismus (SNELL und REED 1993). Castles Einfluss machte *Drosophila* bei Genetikern, wie z.B. Thomas Hunt Morgan bekannt, der ab 1910 *Drosophila* als Modellorganismus zum Studium der Embryogenese verwendete. 1933 bekam Thomas Hunt Morgan den Nobelpreis für seine herausragenden Arbeiten an *Drosophila* (SNELL und REED 1993).

In dieser Arbeit wurde *Drosophila melanogaster* als neurogenetisches Modell verwendet, weil das *Drosophila* Gehirn mit relativ wenigen Neuronen eine komplexe, aber dennoch vereinfachte Struktur im Vergleich zum menschlichen Gehirn mit ca. 10^{10} Neuronen darstellt. Untersucht wurde der Einfluss des serotonergen Systems auf Ethanol induziertes Verhalten. Dies ist möglich, weil Alkoholintoxikation auch in *Drosophila* beobachtet wird. Das Verhalten von *Drosophila* nach akuter Ethanolgabe ähnelt dem Verhalten in Säugetieren, dass bedeutet geringe Ethanoldosen führen zu erhöhter Aktivität und hohe Dosen wirken sedierend (Übersicht, WOLF und HEBERLEIN 2003; PARR et al. 2001; SINGH und HEBERLEIN 2000). Nach einer oder mehreren Ethanolgaben entwickelt auch *Drosophila* Ethanoltoleranz. Dabei lassen sich zwei Formen der Ethanoltoleranz unterscheiden. Die metabolische Ethanoltoleranz, die auf Absorption, Exkretion und Metabolismus beruht und die funktionale, die für Resistenz auf zellulärer Ebene verantwortlich ist. Die funktionale Ethanoltoleranz entsteht zum Teil durch adaptive Veränderungen im zentralen Nervensystem (SCHOLZ et al. 2000; Übersicht, TABAKOFF et al. 1986). Es wird vermutet, dass diese Veränderungen im Zusammenhang mit der Entwicklung einer Alkoholabhängigkeit im Menschen stehen (Übersicht, FADDA und ROSSETTI 1998). In *Drosophila* wurde gezeigt, dass funktionale Ethanoltoleranz weder auf Absorptionsraten beruht noch auf den Metabolismus zurück zu führen ist, sondern



Abb. 1.2.: *Drosophila melanogaster*, Weibchen und Männchen. *Drosophila* Weibchen sind größer als die männlichen Tiere und haben ein helleres Hinterteil. Die Männchen haben im Gegensatz zu den Weibchen zwei schwarze Borstenfelder an den Tarsen der Vorderbeine, die so genannten Geschlechtskämme, die zur zusätzliche Verankerung bei der Kopulation dienen. (Bildquelle: <http://jedn.ipmc.cnrs.fr/siteJEDN2004/images/BioDev/Drosophila.jpg>).

auf funktionale und strukturelle Veränderungen von zentralen Gehirnregionen der Fliege (SCHOLZ et al. 2000). Die Ethanol toleranz in Fliegen wird mit Hilfe des Inebriometers gemessen. Das Inebriometer misst den Effekt von Ethanol auf das Körpergleichgewicht der Fliege. Entwickelt wurde dieses Verhaltensparadigma ursprünglich von COHAN und GRAF 1985 und zwar für Selektionsstudien von ethanolresistenten *Drosophila* Stämmen.

Weiterhin konnten zwei Formen von Ethanol toleranz in *Drosophila* gezeigt werden, schnelle und chronische Toleranz (BERGER et al. 2004). Die schnelle Ethanol toleranz entsteht nach Gabe einer hohen Alkoholkonzentration, während die chronische Toleranz sich nach kontinuierlicher Gabe von geringen Alkoholdosen über einen längeren Zeitraum hin entwickelt. Gezeigt wurde, dass die chronische Toleranz sich von der schnellen Toleranz unterscheidet, da sie mehr als doppelt so lange anhält und die Synthese von Proteinen nötig ist. Beide Formen der Toleranz haben keinen Einfluss auf die Ethanolabsorption, oder den Ethanol Metabolismus (BERGER et al. 2004).

Des Weiteren ist *Drosophila* geeignet, um Moleküle und Signalwege zu beschreiben, die mit akuter Ethanolintoxikation in Verbindung stehen (Übersicht, GUARNIERI und HEBERLEIN 2003). Veränderte ethanolabhängige Verhaltensantworten wurden mit verschiedenen Genen in der Fliege in Verbindung gebracht, z.B.: a) dem Gen für die regulierende Untereinheit der Proteinkinase A (PARK et al. 2000; THIELE et al. 2000), b) ein *hangover* Gen, das für ein

Zinkfingerprotein kodiert und wichtig für die Toleranzentwicklung in *Drosophila* ist (SCHOLZ et al. 2005) sowie c) das Gen für ein Neuropeptid des zyklischen Adenosin-Mono-Phosphat (cAMP) Signaltransduktionsweges, das die Ethanol sensitivität beeinflusst (*Drosophila* Mutanten *amnesiac* und *cheapdate*) (MOORE et al. 1998). Ein anderes Neuropeptid, das Neuropeptid F, ein Homolog des Säugetier Neuropeptids Y und der dazugehörige Rezeptor sind wichtig für die Entwicklung von Ethanol sensitivität (WEN et al. 2005). Die RhoGAP18B Guanosin-Tri-Phosphatase (GTPase) ist verantwortlich für eine erhöhte Ethanol resistenz (ROTHENFLUH et al. 2006). Das *slowpoke* Gen, welches für einen Kaliumkanal kodiert, ist notwendig für die Entwicklung einer schnellen Ethanol toleranz (COWMEADOW et al. 2006; COWMEADOW et al. 2005).

Eine Mutante im *homer* Gen zeigt eine erhöhte Sensitivität und das Fehlen einer schnellen Toleranzentwicklung. Das *homer* Gen in *Drosophila* ist homolog zu den *homer1* Genen in Säugetieren. Postuliert wird, dass es verantwortlich für die Regulation und Erhaltung synaptischer Strukturen und/oder 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 calmodulinabhängige 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. 2003).

Des Weiteren wurden Microarrays mit *Drosophila* RNA nach akuter Ethanolgabe durchgeführt, um veränderte Transkriptionsraten festzustellen. Veränderte Transkriptionsraten wurden festgestellt für Gene, die wichtig sind für den Geruchssinn, z. B. *lush*, das ein Duftbindungsprotein kodiert und Gene die für Enzyme von Signalkaskaden kodieren, wie Proteinkinase C, und Transkriptionsregulatoren (*caput*, *aly* und *drop*) (MOROZOVA et al. 2006).

Die vorliegende Arbeit untersucht, ob Gene des serotonergen Systems in *Drosophila* ebenfalls die Ethanol sensitivität und Toleranz beeinflussen und ob Homologien zu Vertebratengenen bestehen. Deshalb soll im Folgenden das serotonerge System von *Drosophila* näher beschrieben werden.

1.5. Das serotonerge System in *Drosophila melanogaster*

Serotonin ist phylogenetisch ein alter Neurotransmitter und findet sich auch bei Invertebraten (VALLES und WHITE 1988). Allgemein gibt es in Vertebraten (mehrere 100.000), sowie in *Drosophila* (ca. 100) eine relativ kleine Anzahl an serotonergen Zellkörper im Vergleich zu der Gesamtzahl der Neurone (NESTLER et al. 2001; VALLES und WHITE 1988). Die serotonergen Neurone in *Drosophila* entwickeln sich während der Embryogenese. Dabei spielen Transkriptionsfaktoren, die durch die Gene *eagle*, *huckebein* und *engrailed* kodiert werden, eine Rolle. Vermutet wird, dass *eagle* und *huckebein* gemeinsam agieren und verantwortlich für die Zelldifferenzierung von Neuroblasten 7-3 in serotonergen Zellen sind, während *engrailed* die *eagle* Expression aktiviert (LUNDELL und HIRSH 1998, LUNDELL et al. 1996; BOSSING et al. 1996). Ein weiterer wichtiger Schritt wird eingeleitet, wenn sich erste axonale Fortsätze bilden und über die Mittellinie wandern. Dann interagieren die wegweisenden Axonmoleküle *roundabout 2* und *3* (*robo2/3*) mit *eagle* und sind unter anderem verantwortlich für die 5HT Transporter (SERT) Expression (COUCH et al. 2004). Erste 5HT Immunoreaktivität ist während der Embryogenese nach 16-18 h zu sehen. In *Drosophila* Larven sind 84 serotonerge Neuronen beschrieben, die aus Zellgruppen mit 1-10 Zellen bestehen (Abb. 1.3 A)(VALLES und WHITE 1988). In Larven mit einer Mutation im Gen der Dopamin Decarboxylase, das Enzym, welches wichtig für den letzten Schritt der 5HT Synthese ist, wird keine 5HT Immunoreaktivität detektiert. Trotzdem sind die serotonergen Zellen fähig 5HT aufzunehmen (VALLES und WHITE 1990, VALLES und WHITE 1986). Während der Morphogenese bleiben die serotonergen Zellgruppen erhalten, werden aber um strukturiert. Dazu kommen zwei neue Zellgruppen LP1/2, welche die optischen Loben innervieren (Abb. 1.3 B). In der adulten Fliege lassen sich insgesamt 106 serotonerge Neuronen nachweisen (VALLES und WHITE 1988).

Auch wenn die serotonergen Zellen weitgehend bestimmt wurden, sind die Projektionen dieser Zellen nur teilweise bekannt. Ein Neuron, das in die Antennalloben projiziert und in *Manduca sexta* und anderen Insekten beschrieben wurde, ist das contralateral projizierende 5HT immunoreaktive deutocerebrale (CSD) Neuron. In *Drosophila* wird dieses Neuron SE2 genannt (DACKS et al. 2006).

Wie schon erwähnt wird 5HT in den synaptischen Spalt ausgeschüttet und interagiert dort mit prä- und postsynaptischen Rezeptoren. Überschüssiges 5HT wird von einem Transporter wieder aufgenommen, wodurch die 5HT Signaltransduktion reguliert wird. Bei diesem Transporter handelt es sich um den 5HT Transporter.

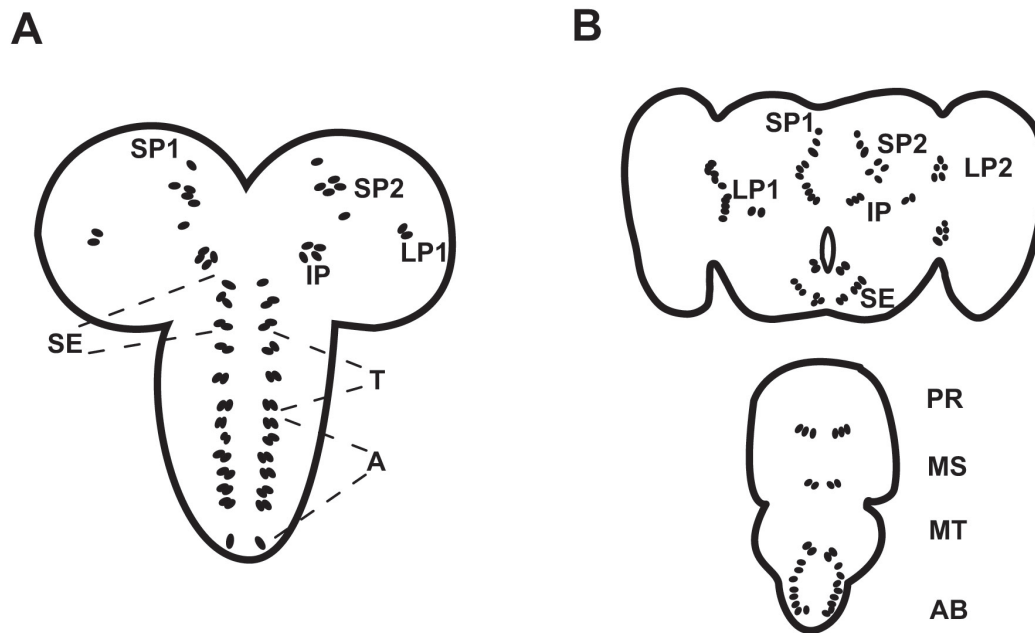


Abb. 1.3.: Schematische Darstellung von serotonergen Neuronen im larvalen (A) und adulten (B) ZNS. Frontale Ansicht des larvalen ZNS (A) und des adulten ZNS (B). Serotonerge Neurone sind in unterschiedlich großen Zellgruppen angeordnet. SP und SE (supra- und subösophageale Ganglien), LP und IP (laterales und inferiores mediales Protocerebrum), T und A (thorakale und abdominale Segmente), PR und MS und MT (Pro- und Meso- und Metathorax) (verändert nach VALLES und WHITE 1988).

1.6. Der Serotonin Transporter: Aufbau und Funktion

Der Serotonin Transporter (SERT) ist verantwortlich für die Wiederaufnahme von 5HT aus dem synaptischen Spalt und das *sert* Gen gilt als Kandidatengen für Alkoholabhängigkeit (GORWOOD et al. 2000; HINCKERS et al. 2006). Eingeordnet wird der SERT in die Na⁺/Cl⁻-Symporter Superfamilie. Aufgebaut ist der SERT aus 12 Transmembran Domänen mit sechs extrazellulären und fünf intrazellulären Schleifen. An der extrazellulären Schleife zwischen TMD drei und vier befinden sich N-Glykosylierungsstellen. Außerdem wurden putative Phosphorylierungsstellen gefunden (LESCH et al. 1993; DEMCHYSHYN et al. 1994). Lokalisiert ist der SERT in der präsynaptischen Membran, wobei das N- und das C-Terminale Ende im Zytoplasma lokalisiert sind (BLAKELY et al. 1991; HOFFMAN et al. 1991).

SERT wird als Glykoprotein synthetisiert und tritt in unterschiedlich glykosylierten Zuständen auf. Die N-Glykosylierung scheint nicht für Substraterkennung oder -affinität wichtig zu sein, sondern für die Integration und Stabilität in der Zellmembran (TATE und BLAKELY 1994). Mit Substrat- sowie Antagonistenbindung wird die erste Transmembran Domäne assoziiert (TMD1) (rote AS, Abb. 1.4) (BARKER et al. 1998; ADKINS et al. 2001).

Die Funktion des Säugetier SERT ist von der 5HT Signalstärke abhängig. Zwei Arten des Transportes sind möglich, einmal funktioniert der SERT als Transporter und einmal als Kanal. Entsprechend kann der Transporter 5HT Moleküle einzeln in die Zelle befördern oder ca. 500 5HT Moleküle werden auf einmal transportiert via Ionenkanal (ADAMS und DEFELICE 2003; GALLI et al. 1997). Postuliert wird, dass der humane SERT aus mehreren Untereinheiten besteht und als Dimer oder Tetramer vorliegt (JUST et al. 2004; FELICE und ADAMS 2001; KILIC und RUDNICK 2000; CHANG et al. 1998).

Die Genexpression des humanen SERT (hSERT) wird unter anderem durch einen Polymorphismus oberhalb des Transkriptionsstarts reguliert, der nur in Menschen und höher entwickelten Affen vorkommt. Die Längenvariation eines repetitiven Elements mit 14 bzw. 16 Elementen beeinflusst die Aktivität des hSERT Promotors. Dabei wird das S (short) Allel mit einer reduzierten Expression und Funktion des humanen SERT assoziiert (MORTENSEN et al. 1999; GREENBERG et al. 1999; LITTLE et al. 1998). Die reduzierte hSERT Aktivität

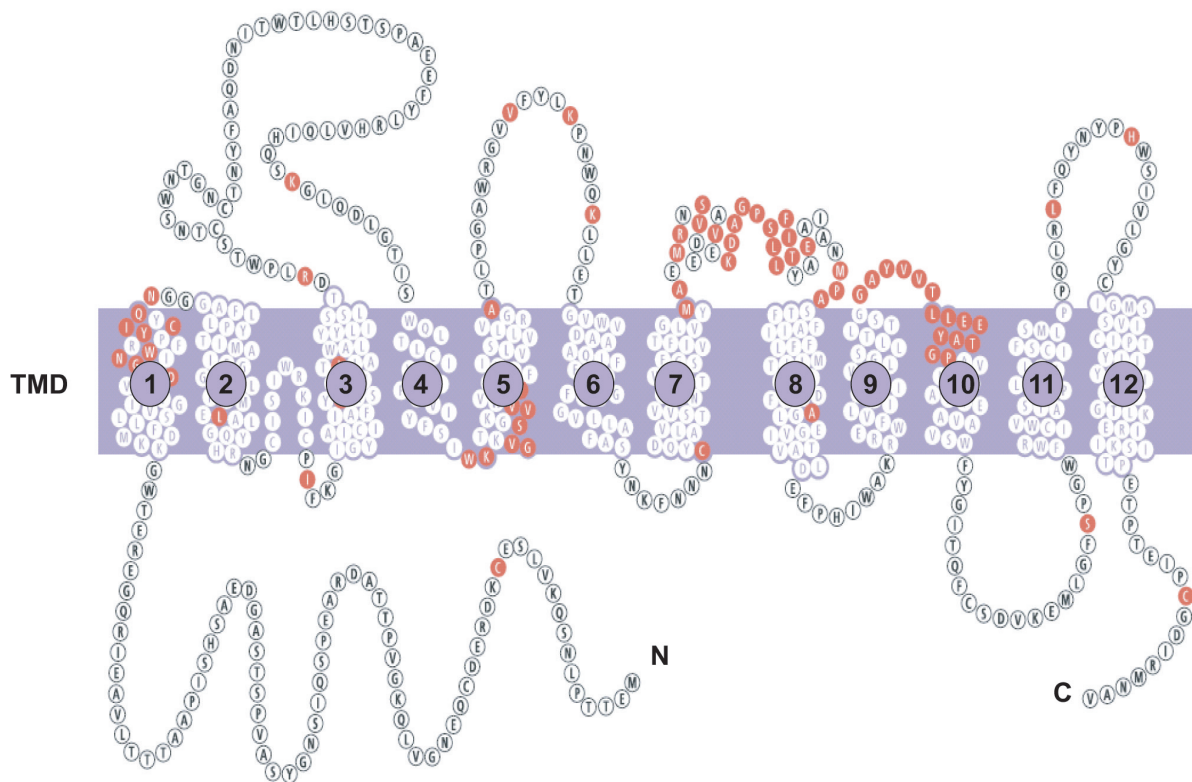


Abb. 1.4.: **Strukturdiagramm des Serotonin Transporters.** Das Strukturdiagramm zeigt die Aminosäuresequenz (AS) und die Transmembran Domänen (TMD) eines SERT, wobei jeder Buchstabe für eine bestimmte AS steht und jede Nummer für eine TMD. N- und C-terminales Ende sind ebenfalls mit Buchstaben gekennzeichnet und befinden sich im Zytoplasma. Die Struktur des SERT wurde abgeglichen mit einer durch hohe Auflösung erreichten Struktur des LeuT Transporters von *Aquifex aeolicus*, einem bakteriellen Homolog des Vertebraten SERT. Die schattierten Regionen stehen für Aminosäuren, die wenn mutiert zu Cystein, oder Lysin Reaktivität mit hydrophilen Substanzen zeigten. Glykolisiert wird der Transporter an der extrazellulären Schleife zwischen TMD drei und vier (verändert nach RUDNICK 2006).

der S Variante des Polymorphismus wird mit Angststörungen und Depression sowie mit Alkoholabhängigkeit in Zusammenhang gebracht (LESCH et al. 1996). Die meisten Studien konnten jedoch keinen Zusammenhang zwischen der SS Variante des hSERT und Alkoholabhängigkeit feststellen (GELERENTER et al. 1997; ISHIGURO et al. 1999; GORWOOD et al. 2000). Dennoch wurde gezeigt, dass die S Variante des SERT Polymorphismus mit einer erhöhten Ethanoltoleranz korreliert und dass eine erhöhte Ethanoltoleranz zu einer Alkoholabhängigkeit führen kann (TUERKER et al. 1998). Eine andere Studie, in der Söhne von Alkoholikern untersucht wurden, unterstützt die Annahme, dass eine erhöhte Alkoholtoleranz ein Risikofaktor für die Entstehung einer Alkoholabhängigkeit ist (SCHUCKIT 1998).

Die chronische Inhibition des SERT wurde im Tiermodell näher untersucht. SERT defiziente Mäuse trinken im Vergleich zu wildtypischen Mäusen weniger Alkohol (KELAI et al. 2003). Gibt man Menschen mit Alkoholabhängigkeit SERT Inhibitoren (SSRIs) wird der Alkoholkonsum in den meisten Fällen kurzfristig reduziert (NARANJO et al. 1990, NARANJO und BREMNER 1994; LEJOYEUX 1996).

Der SERT in *Drosophila* (dSERT) ist ebenfalls ein Na⁺/Cl⁻-abhängiger Transporter, der hohe Affinität und Substratspezifität für 5HT zeigt (COREY et al. 1994). Die transkribierte Sequenz des *dsert* Gens ist 3.1 kb lang und das Protein besteht aus 622 Aminosäuren. Lokalisiert ist das *dsert* Gen auf Position 60C auf dem rechten Arm des zweiten Chromosoms (Demchyshyn et al., 1994). Mit dem humanen SERT (hSERT) besteht eine Homologie von ca. 50% (DEMCHYSHYN et al. 1994; COREY et al. 1994). Der dSERT ist sensitiver gegenüber Kokain, aber weniger sensitiv gegenüber Antidepressiva als der hSERT (COREY et al. 1994). Die pharmakologischen Eigenschaften ähneln daher eher dem Dopamin Transporter (DAT) und Norepinephrin Transporter (NET) der Säugetiere (COREY et al. 1994).

Obwohl der dSERT in geringerer Dichte auf der Zelloberfläche exprimiert wird als der hSERT, ist der 5HT Transport ins Zellinnere doppelt so schnell (RODRIGUEZ et al. 2003), wobei der *Drosophila* SERT spannungsabhängig 5HT über einen SERT Ionenkanal aufnimmt (PETERSEN und DEFELICE 1999).

Der dSERT kann mit Psychopharmaka sowie gentechnisch manipuliert werden. Um Expression speziell in serotonergen Zellen zu erreichen, wurden verschiedene *sert*-GAL4 Linien hergestellt (Abb. 1.5). Dafür wurden unterschiedlich lange Promotorfragmente des *dsert* Gens in einen GAL4 Vektor kloniert (HERB 2005). Die *sert*-GAL4 Linien wurden mit *uas-mCD8gfp* transgenen Fliegen verkreuzt, um die Expression dieser Linien zu



Abb. 1.5.: Verwendete Promotorfragmente der drei verschiedenen *sert*-GAL4 Linien. Um möglichst viele serotonerge Neuronen anzusprechen wurden *sert*-GAL4 Treiberlinien mit drei verschieden großen Promotorfragmenten hergestellt (Funk 2003; HERB 2005). Die Länge der Promotorfragmente beträgt 2,3kb, 4,6kb und 7,2kb. Während die *sert1*-GAL4 und *sert3*-GAL4 Linien mit 2,3 kb und 7,2 kb nur 1-2 vereinzelte, einseitige Neurone zeigen (Daten nicht aufgeführt), exprimiert die *sert1+2*-GAL4 Linie mit dem 4,6 kb Promotorfragment in ca. 46% der serotonergen Neuronen.

untersuchen. Die *sert1*-GAL4 sowie die *sert3*-GAL4 Linie mit dem 2,3 kb bzw. 7,2 kb großem Promotorfragment zeigen wenig oder keine Färbung, das heißt manchmal waren einzelne Neurone einseitig in der Larve bzw. im adulten Gehirn an gefärbt (Daten nicht gezeigt).

Hier konnte gezeigt werden, dass die *sert1+2*-GAL4 Linie mit dem 4,6 kb Promotorfragment Färbung in ca. 46% der serotonergen Neurone zeigt (siehe Ergebnisteil 3.2). Diese *sert1+2*-GAL4 Linie konnte für die genetische Manipulation der 5HT Signaltransduktion eingesetzt werden. Eine andere viel versprechende GAL4 Linie enthält das Promotorfragment eines 5HT Rezeptors.

1.7. Der Serotonin Rezeptor 1b: Aufbau und Funktion

Die Signaltransduktion von 5HT erfolgt mit der Bindung von Serotonin an 5HT-Rezeptoren. Serotonin Rezeptoren unterscheiden sich durch ihre Lokalisation, Signalweiterleitung und pharmakologischen Eigenschaften voneinander. Bis heute sind sieben Untergruppen von 5HT Rezeptoren in Säugetieren, mit insgesamt 14 5HT-Rezeptoren (5HT1a, b, d, e, f; 5HT2a, b, c; 5HT3; 5HT4; 5HT5a, b; 5HT6; 5HT7) bekannt. Die 5HT Rezeptoren sind in unterschiedlichen Regionen im Gehirn verteilt. Die meisten Rezeptoren sind postsynaptisch lokalisiert und wirken entweder depolarisierend (5HT2a, 5HT2c, 5HT3, 5HT4) oder hyperpolarisierend (5HT1a). Einige 5HT Rezeptor Subtypen sitzen auch auf serotonergen

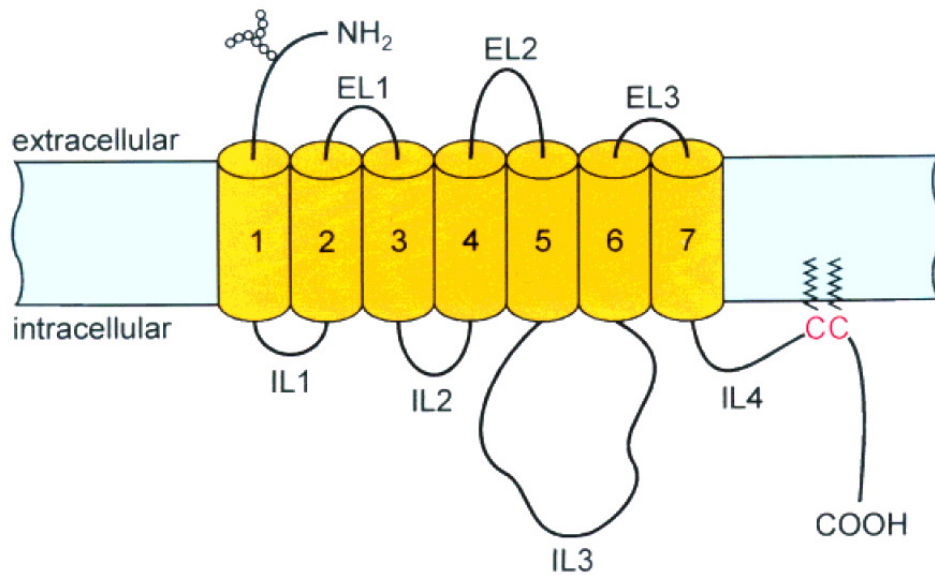


Abb. 1.6.: **Schematische Darstellung eines biogenen Aminrezeptors.** Der Rezeptor besteht aus sieben Transmembran Domänen (gelbe Zylinder), die über drei extrazellulären Schleifen (EL) und drei bis vier intrazellulären Schleifen (IL) verbunden sind. Der extrazelluläre N-Terminus (NH₂) wird oft glykosiliert. Der C-Terminus (COOH) liegt im Zytoplasma (verändert nach BLENAU und BAUMANN 2001).

Neuronen, wo sie als Autorezeptoren fungieren (5HT1a, 5HT1b und evtl. 5HT1d). Andere 5HT Rezeptoren sitzen auf Nervenendigungen von nicht serotonergen Neuronen, wo sie wahrscheinlich die Neurotransmitterausschüttung regulieren (5-HT1b, d; 5HT2a, c; 5HT3; 5HT4)(Übersicht, BARNES und SHARP 1999).

In Vertebraten sind die 14 verschiedenen 5HT-Rezeptoren fast alle mit G-Proteinen gekoppelt und gehören somit zur Superfamilie der G-Protein gekoppelten Rezeptoren (GPCRs)(BRODY und CRAVCHIK 2000). Diese Rezeptoren besitzen sieben Transmembran Domänen und werden der Rhodopsin-ähnlichen Rezeptorfamilie zugeordnet (Abb. 1.6). Nur der 5HT3-Rezeptor ist ein Liganden-gesteuerter Ionenkanal (MARICQ et al. 1991). Außerdem wurde gezeigt, dass einige 5HT Rezeptor Subtypen postsynaptische Effekte auslösen, die über die einfache Neurotransmitterausschüttung hinausgehen. Dabei werden Kaskaden wichtig für intrazelluläre Abläufe in Gang gesetzt, die zu einer veränderten Genexpression führen können (5HT2a, evtl. 5HT2c, 5HT4, 5-HT6)(Übersicht, BARNES und SHARP 1999).

Einige dieser 5HT Rezeptoren werden mit Alkoholabhängigkeit assoziiert. Dabei handelt es sich um die Rezeptoren: 5HT1b, 5HT2, 5HT3 und 5HT4. Antagonisten dieser Rezeptoren

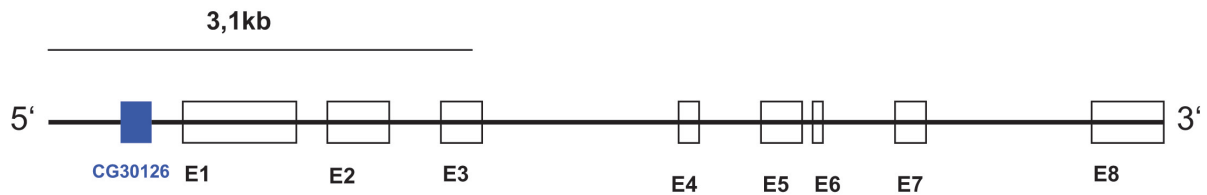


Abb. 1.7.: **Promotorfragment der *5htr1b*-GAL4 Linie.** Zur Herstellung einer serotonergen GAL4 Treiberlinie wurde ein Promotorfragment des *5htr1b* Gens in den GAL4 Vektor kloniert und transgene Fliegen hergestellt (HERB 2005). Die Länge des Promotorfragmentes beträgt 3,1 kb.

reduzieren die Ethanolaufnahme (FADDA et al. 1991; PANOCCA et al. 1995; ROBERTS et al. 1998; TOMKINS und O'NEILL 2000). In klinischen Studien konnten Antagonisten von 5HT₃ Rezeptoren effektiv das Risiko eines Rückfalls in die Alkoholabhängigkeit reduzieren (JOHNSON et al. 2000).

In *Drosophila* sind vier 5HT Rezeptoren bekannt, 5HT_{dro1}, 5HT1a (5HT_{dro2a}), 5HT1b (5HT_{dro2B}), 5HT2 und 5HT7. Diese Rezeptoren gehören alle zu den GPCRs und wirken inhibierend (BRODY und CRAVCHIK 2000). Die *Drosophila* 5HT1a und 5HT1b Rezeptoren sind beide homolog zu dem 5HT1a Rezeptor in Vertebraten. Dabei hat der 5HT1b-Rezeptor ca. 40% Sequenzhomologie mit dem 5HT1a Rezeptor der Vertebraten (YUAN et al. 2005). In *Drosophila* wird dieser Rezeptor (5HT1b) in clock Neuronen exprimiert und ist wichtig für die zirkadiane Rhythmik. Fliegen, die reduzierte Mengen an 5HT1a Rezeptoren aufweisen, zeigen reduzierte Schlafzeiten. Dies ist jedoch nicht der Fall, wenn die Rezeptoren 5HT1b und 5HT2 reduziert sind (YUAN et al. 2006).

In Vertebraten fungiert der 5HT1a Rezeptor als somatodentritischer Autorezeptor (NESTLER et al. 2001). Promotorfragmente dieses Gens sollten demnach die Expression von Transgenen in 5HT positiven Neuronen ermöglichen. Aus diesem Grund wurde eine GAL4 Linie mit dem Promotorfragment des 5HT1b Rezeptors hergestellt (HERB 2005) (Abb. 1.7).

Die vorliegende Arbeit untersucht die Neuroanatomie sowie die Funktionalität dieser *5htr1b*-GAL4 Linie.

1.8. Die Fragestellung

In dieser Arbeit sollte untersucht werden, ob veränderte 5HT Konzentrationen bzw. eine veränderte 5HT Signaltransduktion die Ethanoltoleranz und/oder Ethanolsensitivität in *Drosophila melanogaster* verändert.

5HT Konzentrationen werden gentechnisch während und pharmakologisch nach Abschluss der Entwicklung in *Drosophila* verändert. Mit Hilfe von Psychopharmaka können 5HT Konzentrationen kurzzeitig hoch bzw. herunter reguliert werden. Um dies zu erreichen wurde eine 5HT Vorstufe und ein 5HT Syntheseinhibitor gefüttert. Außerdem wurde durch Füttern eines SERT Inhibitors die 5HT Wiederaufnahme in die Präsynapse verhindert. Nach Gabe der verschiedenen Psychopharmaka wurden die 5HT Konzentrationen in den Köpfen der Fliegen gemessen.

Des Weiteren wurde der dSERT eingesetzt, um die 5HT Signaltransduktion gentechnisch zu manipulieren. Im Vorfeld wurde deshalb untersucht, wo der dSERT im *Drosophila* Gehirn exprimiert wird und ob der dSERT mit serotonergen Neuronen kolokalisiert. Die folgenden Werkzeuge wurden dafür hergestellt: ein dSERT Antikörper, ein *uas-sert* Konstrukt, das ermöglicht den dSERT in *Drosophila* ektopisch zu exprimieren, und ein dominant negatives *uas-sert* Konstrukt, das für einen inaktiven dSERT kodiert. Um die Expression der hier beschriebenen dSERT Konstrukte verfolgen zu können, wurde das *gfp* Gen im Vorfeld in den UAS-Vektor kloniert. Die Überexpression des wildtypischen dSERTs sollte zu einer reduzierten 5HT Signaltransduktion führen, da 5HT vermehrt aus dem synaptischen Spalt aufgenommen wird. Im Gegensatz dazu, sollte die Überexpression eines inaktiven dSERTs eine verlängerte 5HT Signaltransduktion bewirken. Die 5HT Konzentration in den Köpfen dieser Fliegen wurde gemessen und die mit Pharmaka gefütterten sowie gentechnisch veränderten Fliegen wurden auf Ethanolsensitivität und Toleranz getestet. Zusätzlich wurden zwei putativ serotonerge GAL4 Linien neuroanatomisch untersucht. Des Weiteren wurde die Neurotransmission von GAL4 exprimierenden Neuronen inhibiert und die Fliegen wurden ebenfalls auf ethanolinduziertes Verhalten untersucht. Mit dieser Vielzahl an genetischen Werkzeugen und der pharmakologischen Behandlung sollten serotonerge Netzwerke identifiziert werden, die in eine Ethanolantwort involviert sein können.

2. Material und Methoden

2.1. Material

2.1.1. Chemikalien

Die verwendeten Chemikalien und das Verbrauchsmaterial wurden bei folgenden Firmen bezogen Roth, AppliChem, Sigma, Serva, GibcoBRL, BIOzym, Merck, Eppendorf, Greiner, Kodak, Schleicher-Schüll, American National Can, Peqlab, Voltaleff.

2.1.2. Enzyme

Alle Enzyme wurden nach Herstellerangaben verwendet.

Enzyme folgender Firmen wurden verwendet:

Fermentas (MBI), New England Biolabs (NEB), Roche, Sigma.

2.1.3. Antikörper

5HT(monoclonal) α -mouse	1:200	Chemicon
5HT (polyklonal) α -rat	1:100	Chemicon
5HT (polyklonal) α -rabbit	1:1000	JacksonImmuno
GFP (polyclonal) α -mouse	1:200	Invitrogen
TH (polyklonal) α -rabbit	1:1000	Neckameyer
Alexa488 Fluor [®] -Goat α -mouse	1:200	Invitrogen
Alexa488 Fluor [®] -Goat α -rabbit	1:200	Invitrogen
Alexa488 Fluor [®] -Goat α -rat	1:100	Invitrogen
Cy TM 3-Goat α -rabbit	1:200	Dianova
Cy TM 3-Goat α -mouse	1:200	Invitrogen
HRP-Conjugate α -rabbit	1:200	Sigma

2.1.4. Primer, Nukleotide, Sequenzierungen

Pimer für SERT Antikörper Fragment:

T7 5' TAA TAC GAC TCA CTA TAG GG-3' Invitrogen
T3 5' CAA TTA ACC CTC ACT AAA G-3' Invitrogen

Es ist die Position des 5'-Endes relativ zum Translationsstartpunkt angegeben.

P5HTT500sense 5' AAA GAA TTC AAA TGG ACC GCA GCG GG 3' (+4978)
P5HTT500anti 5' TTT CTC GAG CTC CGC CTT CTG TCC 3' (+4586)

Linker Primer für *uas-sert*^{DN}:

Xbal sense 5' CTG GGC CAG TTC TAT TCT AGA GGT TGC CTC AGC 3' (+4432)
Xbal anti 5' GCT GAG GCA ACC TCT AGA ATA GAA CTG GCC CAG 3' (+4399)

Kartierung lokale Insertion im dSERT nach P-Element Mutagenese:

PCR1sense 5' TTT TCC TTG ATT GAG ATG ATT TTA 3' (+9582)
PCR1anti 5' TGT GAA GTG GAG GAC TAG TTA CAT 3' (+7832)

PCR2sense 5' TGC TTG GAG TCT GTC AAT CG 3' (+6200)
PCR2anti 5' CCA TGT AGA ACA GGG GCA GT 3' (+4460)

PCR3sense 5' GCA GAT TTC GCT TTT TCT GG 3' (+5095)
PCR3anti 5' ACG TAG GTC ATC GTG GGA AG 3' (+1927)

PCR4sense 5' ACA TGG CCT ACG TCC AAA AG 3' (+2223)
PCR4anti 5' GAA TAA GGA TAG CAA GGA TAA GGA 3' (-436)

Invers Primer 5' GAC GGG ACC ACC TTA TGT TAT T 3'

dNTPs und Primer: Metabion

Sequenzierung 80 ng/ μ l template DNA (in 10 μ l ddH₂O)
+ 5 pmol/ μ l Primer (4 μ l) Agowa

2.1.5. Vektoren

pBlueskript II KS (+/-)	Stratagene
RE 10485 (pFLCI+dSERT)	Berkeley Drosophila Genome Project
pCRII [®] -TOPO [®] -Vektor	Invitrogen
pUAST-Vektor	Brand and Perrimon, 1993
pUASTGFP-Vektor	Nieratschka, 2004
pGEX-Vektor	GE Healthcare Life Science

2.1.6. Bakterienstämme

<i>E. coli</i> XL1-blue	Stratagen
<i>E. coli</i> BL21	Novagen

2.1.7. *Drosophila melanogaster* Stämme

<i>w</i> ¹¹¹⁸	Lindsley & Zimm
Cyo/sp, TM2/TM6	Klämbt
<i>th</i> -GAL4	Friggi-Grelin et al., 2003
<i>appl</i> -GAL4/Cyo	Gunawardena and Goldstein, 2001
<i>uas-tnt</i>	Sweeney et al., 1995
P(lacW)Mov34 ^{K08003} /CyO	Bier et al., 1989; Bloomington (12203)
P(EPgy2)CG30164 ^{EY08306}	Bellen et al., 2004; Bloomington (17450)
<i>uas-mCD8-gfp</i>	Lee und Luo, 1999
<i>ddc</i> -GAL4	Li et al., 2000 (2. Chromosom)
hypomorph <i>dsert55</i>	Hirsh, 2006
Canton S	

2.1.8. *Drosophila* Aufzucht und Haltung

Standardmedium *Drosophila*

212 g Maismehl
750 ml Wasser aufkochen ü. N. quellen lassen
40 ml Zuckersirup
40 ml Malz
Aufkochen

18,5 g Trockenhefe
7,0 g Agar
10 g Sojamehl
in 150 ml Wasser lösen und in kochenden Brei rühren
Abkühlen auf 80°C
Fungizid (Methyl-4-hydroxybenzoat) 100g auf 40 l
Brei ca. 2 cm hoch in Plexiglasgefäße füllen
Lagerung bei 4°C

Haltungsbedingungen *Drosophila*

Die *Drosophila* Stämme wurden in Plexiglasgefäßen auf Standardmedium (siehe 2.1.8) und definierten Licht-Dunkel-Zyklus von 17 h Licht und 9 h Dunkelheit bei 18°C, bzw. bei 25°C gehalten.

2.1.9. Puffer und Lösungen

Plasmid-Minipräparationen

GTE-Puffer	50 mM Glukose 25 mM Tris/HCl pH 8,0 10 mM EDTA steril filtrieren
Alkalischer Lyse-Puffer	0,2 N NaOH 1% SDS vor Gebrauch frisch ansetzen

Kaliumacetatlösung 5 M KAc mit 5 M Eisessig auf pH 4,8 einstellen

TE 100 mM Tris/HCl pH 8,0
 10 mM EDTA pH 8,0
 ad 1 l H₂O, pH 8,0

Isolation genomischer DNA

Homogenisierungspuffer 100 mM Tris/HCl pH 8,0
 100 mM EDTA
 0,5% SDS

Antikörperfärbungen

Drosophila Ringer 46 mM NaCl
 182 mM KCl
 3 mM CaCl₂
 10 mM Tris HCl
 pH 7,2

PBS (1x) 137 mM NaCl
 10,14 mM Na₂HPO₄
 1,76 mM KH₂PO₄
 2,68 mM KCl
 pH 7,2

PBT 0,5% Triton X-100 in PBS

Puffer und Lösungen für Westernblot

Laemmli Puffer 2x 125 mM Tris pH 6,8
 6% Glycerol
 2% SDS
 0,025% Bromphenolblau
 5% β -Mercaptoethanol

SDS Laufpuffer (1l, 5x) 0,025 M Tris
 0,192 M Glycine
 0,1% SDS
 ad dH₂O auf 1 l
 pH 8,9

Western Transferpuffer 25 mM Tris
 150 mM Glycine
 10% Methanol
 dH₂O

TBST (10 x) 100 mM Tris
 1,5 M NaCl
 0,5% Tween-20
 dH₂O
 pH 7,6

Lösungen für die Herstellung von hitzekompetenten Zellen

RF1
100 mM RbCl
50 mM MnCl₂
30 mM KOAc
10 mM CaCl₂
15% Glycerin
pH 5,8
steril filtrieren

RF2
10 mM Mops
10mM RbCl
75 mM CaCl₂
15% Glycerin
pH 6,8
steril filtrieren

Sonstige Puffer und Lösungen

TBE (10x)
500 mM Tris/HCl pH 8,0
500 mM Borsäure H₃BO₃
25 mM EDTA pH 8,0

Beladungspuffer (6x)
0,25% Bromphenolblau
0,25% Xylencyanol
30% Glycerol
1% SDS

Injektionspuffer
5 mM KCl
80,95 mM Na₂HPO₄
19,05 mM NaH₂PO₄
pH 7,5

Stammlösungen in ddH₂O gelöst

Ampizillin	50 mg/ml
Ethidiumbromid	1 mg/ml
RNase A	10 mg/ml

2.1.10. Medien und Platten

LB-Medium	1% Trypton 0,5% Hefeextrakt 1% NaCl ddH ₂ O pH 7,5 autoklavieren Ampizillin (Endkonz. 50µg/ml)
-----------	---

Agarplatten	LB-Medium 1,5% Agar zugeben, Autoklavieren Abkühlen, ca. 50°C Platten gießen
-------------	--

SOC	2% Trypton 0,5% Hefeextrakt 10 mM NaCl 2,5 mM KCl 10 mM MgCl ₂ 10 mM MgSO ₄ Autoklavieren Glucose (20 mM Endkonz.) steril filtriert
-----	--

Apfelsaftplatten	3% Agar in H ₂ O aufkochen 3 M Saccharose in Apfelsaft lösen Kalten Apfelsaft mit Saccharose in heißen Agar Platten gießen
------------------	--

2.2. Methoden

2.2.1. DNA Isolierung und Klonierung

Folgende Kits wurden nach Herstellerangaben verwendet:

QIAGEN [®] Plasmid Midi Kit	QIAGEN
QIAEX [®] II Gel Extraction Kit	QIAGEN
QIAGEN Plasmid Mega Kit	QIAGEN
QIAquick PCR Purification Kit	QIAGEN
NucleoBond [®] PC 100	Macherey-Nagel
TOPO TA Cloning [®]	Invitrogen

2.2.2. Plasmid-DNA Minipräparation

(Birnboim und Doly, 1979)

- 2,5 ml einer Übernackkultur mit transformierten E. coli XL1 blue 20 sec bei 13.000 rpm zentrifugieren
- Bakterienpellet in 100 μ l GTE-Puffer resuspendieren (vortexen)
- 200 μ l alkalischer SDS-Lösung zugeben, vortexen
- 5 min auf Eis inkubieren
- 150 μ l Kaliumacetatlösung zugeben, vortexen
- 2 min abzentrifugieren bei 13.000 rpm
- Überstand in ein frisches 1,5 ml Reaktionsgefäß übertragen
- EtOH 100% (ca. 1 ml) dazugeben, Reaktionsgefäß invertieren
- 10 min bei 13.000 rpm und 4°C zentrifugieren
- Pellet mit 500 μ l EtOH 70% waschen
- Pellet in 50 μ l TE lösen
- 1 μ l RNAse A (10 mg / ml) zugeben

2.2.3. Fällung von DNA

Isopropanolfällung

- + 1 Vol. Isopropanol
- 30 min bei 13.000 rpm zentrifugieren
- Überstand abgießen
- Pellet + 250 μ l EtOH 70%
- 10 min bei 13.000 rpm zentrifugieren

Ethanol-fällung für die Keimbahntransformation

- ad ddH₂O auf 100 μ l
- + 30 μ l 3M NaOAc
- + 750 μ l EtOH 100%
- mind. 10 min bei -80°C
- 1h bei 4°C und 13.000 rpm zentrifugieren
- Pellet mit 400 μ l EtOH 70% waschen
- 10 min bei 4°C und 13.000 rpm zentrifugieren
- Pellet trocknen
- + 50 μ l Injektionspuffer, vortexen

2.2.4. Restriktionsverdau

- 1 μ g DNA
- 2 μ l Puffer (10x)
- 5 u Restriktionsenzym

- ad ddH₂O auf 20 μ l
- 2h bei 37°C

2.2.5. Präparativer Verdau

Zur Isolation ausreichender Mengen DNA für Klonierungen, wird ein präparativer Verdau des *puas-gfp*-Vektors und der zu klonierenden Fragmente im pBII-KS-Vektor durchgeführt.

- pBII-KS-Vektor mit dSERT Fargment in Bakterien vermehren und DNA extrahieren
- pBII-KS-Vektor mit dSERT Fargment verdauen mit Asp718 und NotI
- 10 μ g dSERT Fragment
- 3 μ g pUASTGFP-Vektor
- 4 μ l 10x Puffer für Asp718
- 10 u Asp718
- ad ddH₂O auf 40 μ l Endvolumen
- 2h bei 37°C
- Nachlegen von 5u Asp718
- 2h bei 37°C inkubieren
- Isopropanolfällung (siehe 2.5.3)
- Pellet lufttrocknen
- in 35 μ l ddH₂O lösen
- 4 μ l 10x Puffer für NotI
- 10 u NotI
- 40 μ l Endvolumen
- 2h bei 37°C
- Nachlegen von 5u NotI
- 2h bei 37°C inkubieren

2.2.6. Transformation von hitzekompetenten Zellen

- 2 μ l der Ligation zu 200 μ l Zellen
- 30 min auf Eis
- 90 sec bei 42°C
- 3 min auf Eis
- 200 μ l LB Medium (RT) dazugeben
- Ausplattieren auf LB-Platten mit Ampizillin
- ü.N. bei 37°C
- Picken der Zellkulturen für Plasmid DNA Isolation

2.2.7. Keimbahntransformation

- 24 μ g Konstrukt DNA
- + 8 μ g Helferplasmid pUCH_{STT} Δ 2-3
- Ethanol-fällung (siehe 2.2.3)
- Pellet in 50 μ l Injektionspuffer lösen
- Eiablage synchronisieren, d.h. immer nach 25 min die Embryonen absammeln
- Aufreihen in gleicher Orientierung und aufkleben auf mit Heptankleber beschichtete Objektträger
- Trocknen 25 min und mit Voltaleff 10S Öl überschichten
- Injizieren im Stadium des syncytialen Blastoderms am posterioren Pol
- Embryos in Feuchtkammern auf 18°C halten
- Larven sammeln und in ein Glas mit Futtermedium setzen
- Fliegen mit w^{1118} Fliegen rückkreuzen
- Nachkommen der F1 Generation nach Augenfarbenmarker white selektieren
- Etablierung transgener Stämme und Bestimmung des Insertionsortes des Transgens mit Hilfe von Doppelbalancerstock

2.2.8. Klonierungsstrategie zur Herstellung eines *uasgfp-sert* Konstruktes

Die cDNA von CG4545 (*dsert*) wurde zuerst in einen pBII-KS+-Vektor kloniert, um auch im weiteren Verlaufe dieser Arbeit besser mit der cDNA CG4545 arbeiten zu können.

- Ausschneiden der cDNA von CG4545 (3 kb) mit Asp718 und NotI aus dem RE10485 Klon, der aus der cDNA von CG4545 und dem pFLCI-Vektor (3 kb) besteht
- Gleichzeitig den pFLCI-Vektor (3 kb) schneiden mit Restriktionsenzym XmnI, um unterschiedlich große Fragmente im Gel zu bekommen, d.h. ein 3kb Fragment für die cDNA des CG4545 Gens, sowie zwei kleinere Fragmente (1 kb und 2 kb) des pFLCI Vektors
- Gelextraktion des CG4545 cDNA Fragmentes
- Ligation des verdauten CG4545 cDNA Fragmentes mit dem bereits mit Asp718/NotI verdauten pBII-KS+-Vektor
- pBII-KS+-Vektor mit CG4545 cDNA transformieren in XL1blue Bakterien
- Vermehrung von Plasmiden in Bakterien
- Extraktion der Plasmid DNA
- Restriktionsverdau dSERT DNA mit Asp718/NotI und Ligation in mit Asp718/NotI verdauten *puasgfp*-Vektor
- Sequenzierung des Konstruktes, um dessen Richtigkeit zu überprüfen
- Injektion des *uasgfp-sert* Konstrukt in *w¹¹¹⁸* Fliegenembryos

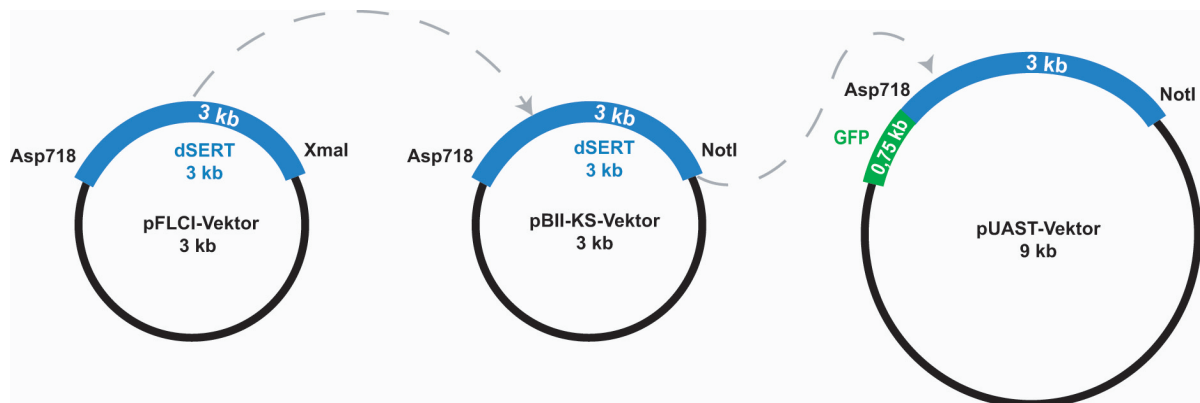


Abb. 2.1.: Klonierungsstrategie zur Herstellung eines *uasgfp-sert* Konstruktes. Zuerst wurde die cDNA von CG4545 mit Asp718 und XmaI aus dem pFLCI Vektor ausgeschnitten (links) und in den pBII-KS+Vektor kloniert (Mitte). Der pBII-KS+-Vektor wird in Bakterien vermehrt, um anschließend die Plasmid DNA zu isolieren. Der *dSERT* wird mit Asp718 und NotI aus dem pBII-KS+-Vektor ausgeschnitten (Mitte) und dann in den *uasgfp*-Vektor kloniert (rechts).

2.2.9. Klonierungsstrategie zur Herstellung eines *uasgfp-sert^{DN}* Konstruktes

Ein inaktiver *dsert* sollte hergestellt werden, um diesen in der Fliege mit Hilfe des GAL4/UAS Systems überexprimieren zu können. Die Veränderung von fünf spezifischen Aminosäuren (AS) im Ratten SERT führte zu einer Inaktivierung des Transporters (Androutsellis-Theotokis et al., 2002). Zwei dieser AS sollten im dSERT ebenfalls ausgetauscht werden.

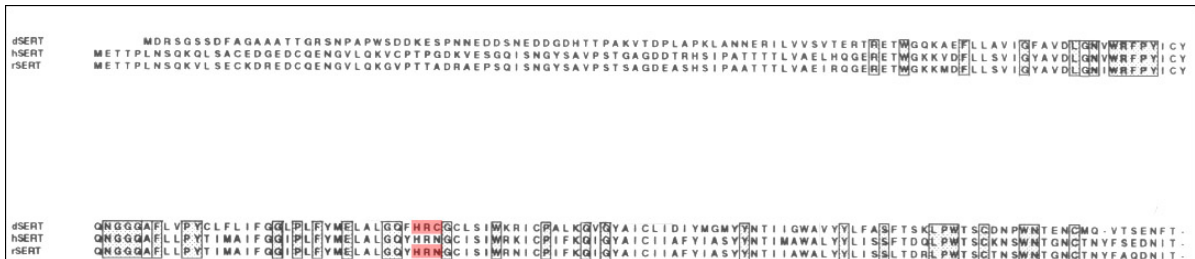


Abb. 2.2.: Darstellung von homologen Aminosäuren des dSERTs und des rSERTs. Die Abbildung zeigt homologe AS des dSERT, hSERT und des rSERT untereinander in grauen Kästen. Die rot unterlegten, oberen AS wurden im *dsert* verändert, wobei die dritte AS nicht homolog zu der AS im rSERT ist (rot, unten). Bei den in *Drosophila* veränderten AS handelt es sich um Histidin (138), Arginin (139) und Cystein (140), die verändert werden in Tyrosin, Serin und Arginin.

Dabei handelt es sich um die AS Nummer 138 Histidin (H) und 140 Cystein (C). Diese beiden AS liegen nicht genau nebeneinander, sondern im Abstand von einer AS. XbaI schneidet über sechs Nukleotide hinweg. Das heißt, wenn man eine XbaI Schnittstelle in den dSERT einbringt sind nur AS Nummer 138, sowie die Nachbar AS AS 139 verändert. Mit Hilfe eines Linker Primers, der die XbaI Schnittstelle beinhaltet, kann auch noch ein weiteres Codon verändert werden. Folglich wurden drei AS nebeneinander verändert. Der Primer besteht demnach aus einer Region, die aus drei Nukleinsäuren besteht und an die das Enzym binden kann, einer XbaI Schnittstelle, drei zusätzlich veränderte Nukleinsäuren und einer Region die in *frame* zu diesen veränderten Nukleinsäuren an den *dsert* bindet. Der Reihenfolge nach handelt es sich bei den veränderten AS um Histidin (138), Arginin (139) und Cystein (140), die verändert werden in Tyrosin, Serin und Arginin. Diese Veränderung sollte dazu führen, dass die chemischen Eigenschaften der ursprünglichen AS ausgeschaltet sind und damit auch die Aktivität des dSERT. Ein *sense*, sowie ein *anti-sense* Primer für die beschriebene Region wurden hergestellt. Wie in 2.5.8 beschrieben, befindet sich der *dsert* in einem pBII-KS+-Vektor. Dieser Vektor hat rechts und links von seiner *multiple cloning site* Primerbindungsstellen für die Primer T3 und T7. Mit Hilfe einer PCR

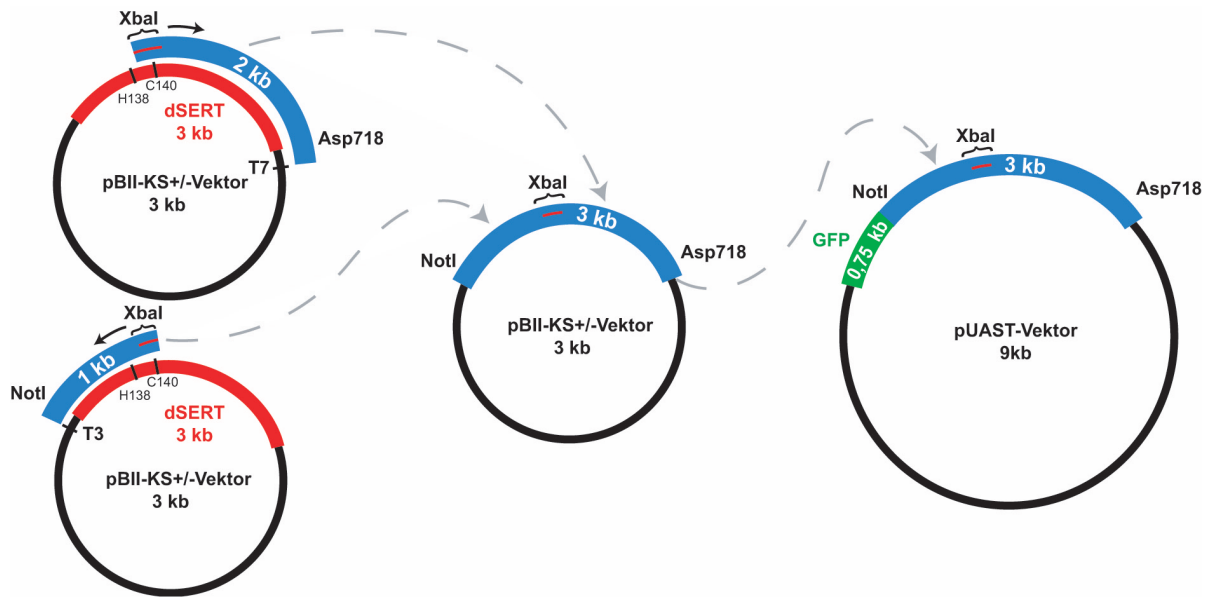


Abb. 2.3.: Klonierungsstrategie zur Herstellung des *uasgfp-sert^{DN}* Konstruktes. Zwei Fragmente des *dsert* (CG4545) werden mit Hilfe einer Linker PCR amplifiziert. Ein *sense*, sowie ein *anti-sense* Primer mit einer integrierten XbaI Schnittstelle wurden dafür hergestellt. Die XbaI Schnittstelle sitzt genau an der Stelle, wo die zwei Aminosäuren Histidin und Cystein verändert werden sollen. Da die XbaI Schnittstelle nur sechs Nukleotide in Anspruch nimmt, müssen zusätzlich noch drei weitere Nukleotide verändert werden. Die zwei anderen verwendeten Primer (T3 und T7) binden im pBII-KS-Vektor und amplifizieren in Kombination mit den XbaI-sense und XbaI-anti-sense Primern ein 2 kb bzw. 1 kb großes Stück des *dsert* Fragmentes (links). Diese zwei dSERT DNA Stücke werden in einen pBII-KS-Vektor kloniert und vermehrt (Vektor Mitte). Anschließend wird der wieder zusammengesetzte *dsert* mit drei veränderten Aminosäuren in den *puasgfp*-Vektor kloniert (rechts).

Reaktion mit diesen zwei Primern, konnte von dem Linker Primer ausgehend der dSERT in beide Richtungen transkribiert werden. Dabei entstand ein 1 kb und ein 2 kb großes Stück.

Diese zwei Stücke wurden beide zunächst in einen pBII-KS+-Vektor kloniert, um die veränderte cDNA des *dsert* zu vermehren. Im zweiten Schritt wird der veränderte *dsert* ausgeschnitten und in den *puasgfp*-Vektor kloniert hinter das *gfp* Gen kloniert. Das heißt, GFP befindet sich nach der Translation am N-Terminus des dSERT. Die Sequenzierung des Konstruktes bestätigte die Richtigkeit der eingebauten veränderten *dsert* DNA. Daraufhin wurde das *uasgfp-sert^{DN}* dominant negative Konstrukt in *w¹¹¹⁸* Fliegenembryos injiziert.

2.2.10. Klonierungsstrategie zur Herstellung eines dSERT Antikörpers

Ein Antikörper sollte hergestellt werden, der spezifisch gegen den *Drosophila* SERT gerichtet ist. Um einen Antikörper herzustellen braucht man einen bakteriellen Expressionsvektor, der es ermöglicht, dass Protein in großem Maßstab herzustellen. Dafür diene hier der pGEX-Vektor. Dieser Vektor zeichnet sich durch ein *lacI* Gen, welches für ein LAC-Repressorprotein kodiert aus. Dieses Repressorprotein blockiert die Transkription eines *lac* Operators, der 5' vor dem Glutathion-S-Transferase Gen sitzt. Solange dieser *lac* Operator blockiert ist findet keine Gentranskription statt. Erst wenn Iso-propyl-thio-galactosid (IPTG) zu der Lösung gegeben wird, bindet das LACI Repressorprotein in einem Komplex an dieses Lactose Analogon und gibt die Promotorregion frei. Dann wird die Glutathion-S-Transferase transkribiert, sowie die in die *multiple cloning site* des Vektors klonierte Gensequenz.

Ein ca. 0,3 kb großer Abschnitt des *dsert* vom Start Codon der N-Terminalen Region ausgehend wurde ausgewählt, welcher keine Homologien mit Transportern in *Drosophila* und anderen Spezies aufweist (für genaue Positionen siehe Primerpaar P5HTT500sense/anti 2.1.4).

Dieses Stück wurde mit Linker PCR amplifiziert. Der eine verwendete Linker Primer beinhaltet eine EcoRI Schnittstelle, direkt vor der Start Sequenz (ATG) des *dsert* und der zweite eine XhoI Schnittstelle ca. 0,3 kb oberhalb. Die EcoRI sowie die XhoI Schnittstelle dienten dazu, das *dsert* Stück *in frame* in den pGEX-Vektor zu klonieren. Das *dsert* DNA Stück wurde zunächst verdaut mit EcoRI und XhoI und in den pCRII[®]-TOPO[®]-Vektor kloniert. Mit Hilfe des pCRII[®]-TOPO[®]-Vektors konnte das *dsert* Stück in *E. Coli* XL1 blue Zellen vermehrt werden, um anschließend ausgeschnitten und in den pGEX-Vektor kloniert zu werden.(Abb. 2.4).

Anschließend wurde das Fusionsprotein GST-dSERT in *E. coli* BL21 Zellen exprimiert. Die Induktion dieses Proteins ist auf einem Westernblot nachweisbar (Abb. 2.5).

Das GST-Fusions Protein hat eine Größe von 29 kD, das heißt die Laufhöhe stimmt ungefähr. Die 500 bp des dSERTs sollten eine Größe von ca. 17 kD haben.

Folglich ist das Fusionsprotein insgesamt ca. 46 kD groß, was ebenfalls mit der Höhe der hier gezeigten Banden übereinstimmt.

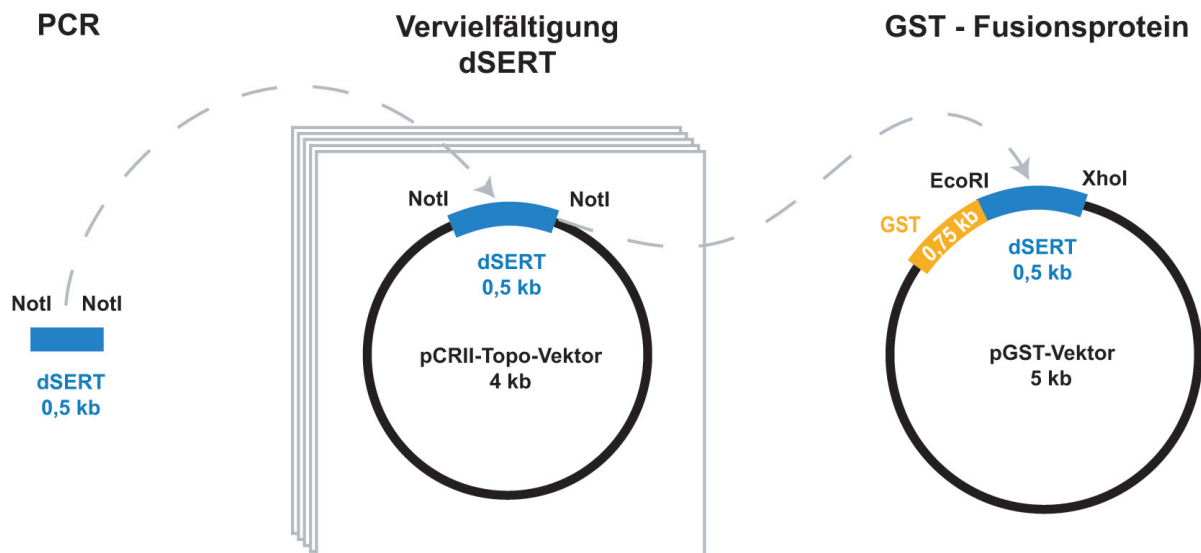


Abb. 2.4.: **Klonierungsstrategie zur Herstellung eines dSERT Antikörpers.** Um einen dSERT Antikörper herzustellen wurden zuerst Linker Primer konstruiert, die zum einen eine EcoRI Schnittstelle haben und zum anderen eine XhoI Schnittstelle. Die Restriktionsschnittstellen wurden gewählt im Hinblick auf Enzyme die in der *multiple cloning site* des pGEX-Vektors schneiden. Wichtig dabei ist, dass *in frame* kloniert wird. Mit diesen Primern wurde ein 0,3 kb großes dSERT Stück via PCR amplifiziert. Der pCRII[®]-TOPO[®]-Vektor mit dem 0,3 kb *dsert* Stück, wurde in *E. coli* XL1 blue Zellen vermehrt und anschließend isoliert. Das dSERT Stück wurde mit EcoRI und XhoI aus dem pCRII[®]-TOPO[®]-Vektor herausgeschnitten und in den pGEX-Vektor kloniert (Abb. 2.4).



Abb. 2.5.: **Induktion des Fusionsproteins sowie des GST Proteins alleine.** In Spur 1-7 ist der Verlauf der Proteininduktion aufgetragen. Als Negativkontrolle dient Spur 1, in der das Protein nicht induziert ist. Nach der Induktion mit IPTG werden Proben im Abstand einer halben Stunde genommen und aufgetragen (2-5). Die letzte Probe wird zentrifugiert und es werden Überstand (6), sowie Pellet (7) aufgetragen. Die Induktion des Fusionsproteins mit ca. 45 kD ist deutlich zu sehen (Spur 7, links). Genauso wie die Induktion des GST-Proteins mit 33 kD (Spur 7, rechts).

Die Aufreinigung des Proteins erfolgte über Sepharose Kügelchen. 800 ng des auf gereinigten Proteins wurden lyophilisiert und für die Immunisierung eines Kaninchen an Eurogentec geschickt. Als negative Kontrolle wurde das Präimmunserum verwandt.

Verschiedene Bedingungen, wie Blockbedingungen, Antikörperverdünnungen und Homogenisierungsschritte wurden getestet (Abb. 2.6). In jeder Spur ist die Proteinmengen von fünf Fliegenköpfe aufgetragen.

Die Fliegenköpfe wurden entweder nach 30 min Fixierung in Formaldehyd (F) homogenisiert, oder in einem Puffer mit Triton 1% (T) (Abb. 2.6).

Nachdem die Proteine mit einem SDS-Page Gel aufgetrennt und auf eine Membran geblottet wurden konnte diese zerschnitten und einzelne Streifen mit verschiedenen Antikörperkonzentrationen und Kontrollen behandelt werden. Vorher wurde die Nitrozellulosemembran noch geblockt, damit unspezifische Bindungsstellen abgedeckt werden. Zwei Blocklösungen wurden hier verwendet. Einmal 1% BSA (Abb 2.6 A) und zum anderen 2, 5% Milchpulver (Abb. 2.6 B). Das 3. dSERT Antikörperserum wurde wie folgt verdünnt (weiße Buchstaben) A: 1:20.000; B: 1:10.000; C: 1: 5000; D: 1:1000; E: nur 2. Ak; F: Preimmunserum 1:5000; G: Preimmunserum 1:10.000. Die blauen Striche markieren den Proteingrößen Marker, der nur einmal (weiß, links) angegeben ist. Die Blocklösung mit BSA blockt nur unzureichend.

Viele unspezifische Banden sind zu sehen (Abb. 2.6 A). Viel besser dagegen blocken 2,5% Milchpulver (Abb. 2.6 B). Es lässt sich keine für dSERT spezifische Bande nachweisen. Erwartet wurde eine ca. 70 kD große Bande. Oft wurden mit dem dSERT Antikörper dieselben Banden wie mit Preimmunserum gesehen.

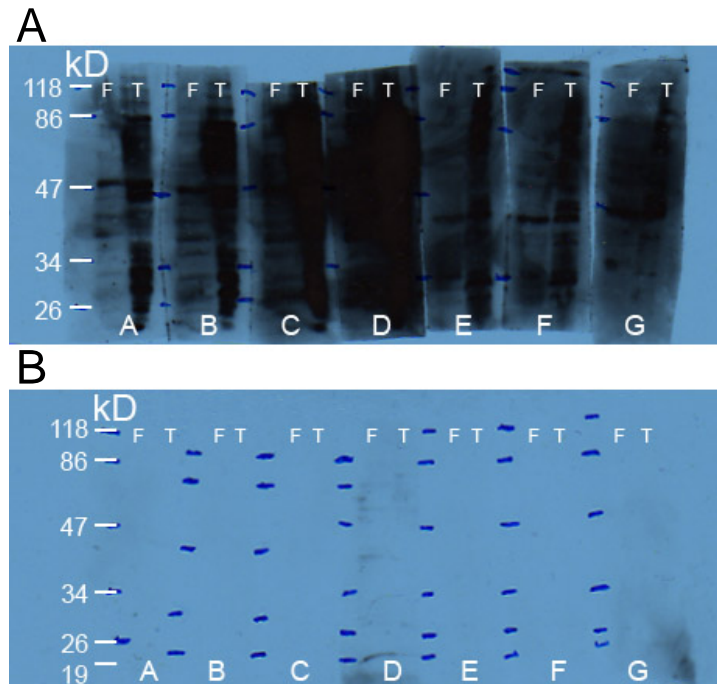


Abb. 2.6.: **Westernblot Untersuchungen mit dem 3. dSERT Antikörperserum.** Verschiedene Testbedingungen sind hier gezeigt. Pro Tasche wurde die Proteinmenge von fünf Fliegenköpfen aufgetragen. Die Fliegenköpfe wurden entweder nach 30 min Fixierung in Formaldehyd (F) homogenisiert, oder in einem Puffer mit Triton 1% (T). Zwei Blocklösungen wurden hier verwendet. In A 1% BSA und in B 2, 5% Milch. Der dSERT Antikörper wurde verdünnt (weiße Buchstaben) A: 1:20.000; B: 1:10.000; C: 1: 5000; D: 1:1000; E: nur 2. Ak; F: Preimmunserum 1:5000; G: Preimmunserum 1:10.000. Die blauen Striche markieren den Proteingrößen Marker, der nur einmal links (weiss) angegeben ist. Die Blocklösung mit BSA blockt nur geringfügig unspezifische Banden (A). Viel besser dagegen blocken 2,5% Milch. Leider ist das dSERT Antikörper Signal, falls vorhanden, so schwach, dass es nicht mehr zu sehen ist.

Trenngel (11,5 %-ig)	SDS 0,5%	3 ml
	Tris pH 8,8 1,88 M	3 ml
	ddH ₂ O	3,25 ml
	Acrylamid	5,75 ml
	APS 10%	75 μ l
	TEMED	12,5 μ l

Sammelgel	SDS 0,5%	2,4 ml
	Tris 0,625 M	2,4 ml
	ddH ₂ O	5,2 ml
	Acrylamid	2 ml
	APS 10%	70 μ l
	TEMED	12 μ l

Laufzeit Pro Gel 35 mA, 2-3 h

Blotten Gel auf Nitrozellulose Membran legen (Blotrichtung beachten!)
Whatmanpapier dreilagig mit TBST getränkt jeweils auf das Gel
und unter die Membran legen Pro Gel 100 mA, 1 h Proteine bis
60 kD, 2 h bis 100 kD

Blocken Milch 2,5% oder BSA 1%, ca. 1 h RT bzw. 4°C ü. N.

1. Antikörper In Blocklösung 1 h RT bzw. 4°C ü. N.

2. Antikörper In Blocklösung 2 h RT

ECL Western blotting detection reagents verwendet nach Herstellerangaben (Amersham).

Film belichten 1-10min.

Film entwickeln	Entwickler	1 min
	H ₂ O	1 min
	Fixierer	1 min

2.2.11. Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA)

Verwendet nach Herstellerangaben: LDN Labor Diagnostika Nord GmbH & Co

- Ansetzen PBS+0,1% Ascorbinsäure
- Standards und Kontrollen verdünnen 1:150 (z.B. 975 μ l Puffer+6,5 μ l Standard)
- 10 Fliegenköpfe in 100 μ l PBS+ 0,1% Ascorbinsäure auf Eis
- 30 sec homogenisieren, 1:4 verdünnen (20 μ l = 1/2 Kopf)
- 20 μ l von Standards, Kontrollen und Proben in Acetylierungsgefäße
- 25 μ l Acetylierungspuffer dazu pipettieren
- Inkubieren 30 min auf Schüttler (600-900 rpm)
- Bradford pipetieren: Bradforldösung 260 μ l+40 μ l Probe (1 Kopf), Standard: BSA 100 μ g -1000 μ g, ca. 10 min inkubieren, messen 595 nm
- 40 μ l aus Acetylierungsgefäßen auf ELISA pipettieren
- Achtung! Alle weiteren Reagenzien sollten RT haben
- 50 μ l Serotonin Antiserum in alle Töpfe
- Kurz mischen und inkubieren ü. N. 2-8°C
- Serotonin Antiserum abschütten, 3x mit Waschpuffer waschen, ausklopfen auf Papier
- 100 μ l Enzymkonjugat in alle Töpfe
- Inkubieren 30 min RT auf Schüttler (400-500 rpm)
- Enzymkonjugat abschütten und 3x waschen
- 100 μ l Substrat in alle Töpfe
- Inkubieren 20-30 min RT auf Schüttler (400-500 rpm)
- Achtung nicht im direkten Sonnenlicht, besser etwas abdunkeln (mit Papier)
- 100 μ l Stopplösung und kurz schütteln

- Absorption messen innerhalb von 10 min mit 450 nm und Referenz Wellenlänge zwischen 620 nm und 650 nm

2.2.12. Antikörperfärbung von *whole-mount Drosophila* Köpfen

- Gehirne in Ringer präparieren und in einem 0,5 ml Reaktionsgefäß mit Ringer (ca. 200 μ l) auf Eis aufbewahren
- Fixieren in 5% Formaldehyd in PBS für 30 min (Larven) oder 40 min (Adulte)
- 3 x 5 min waschen in PBT 0,5% Triton
- Blocken in PBT mit 10% NHS 1 h
- Inkubieren mit 1. Antikörper in PBT mit 10% NHS ü.N. 4°C
- 3 x 5 min waschen in PBT
- 3 x 10 min waschen in PBT
- Achtung! Alle nachfolgenden Schritte im Dunkeln
- Inkubieren mit 2. Antikörper in PBT mit 10% NHS, 2 h bei RT 3x 10 min waschen in PBT
- 30 min waschen in 50% Glycerol / 50% PBT
- Einbetten auf Objektträger in Vectashield

2.2.13. Gefrierschnitte

Die Gefrierschnitte von adulten, männlichen *Drosophila* Köpfe wurden wie bei Buchner et al. (1986) beschrieben angefertigt. Die Färbung erfolgte mit VECTASTAIN Peroxidase Mouse IgG ABC-Kit (Dianova) und DAB Peroxidase Substrate Kit (Vector Laboratories) nach den Protokollangaben des Herstellers.

2.2.14. Elektronenmikroskopie

Gefrierschnitte wurden wie in XX hergestellt, aber auf Deckgläschen aufgebracht. Im Vorfeld wurden die Fliegenköpfe zusätzlich zur Formaldehydfixierung noch mit 0,1% Glutaraldehyd fixiert für 3h bei RT.

- | | | |
|---------------|--------------------------|--------|
| 1. Antikörper | α -dSERT Serum | 1:2000 |
| 2. Antikörper | α -Kanninchen-HRP | 1:200 |

Entwässerung Gefrierschnitte in EtOH 4°C 50%, 70%, 90%
jeweils 5 min. auf Eis
2x in 100% EtOH RT je 5 min.
2x in Propylenoxid (löst Plastik auf!!) je 5 min
Schnitte in Propylenoxid/EPON 1:1 2-4Std.
Objektträger in EPON legen ü. N.

Einbettung Objektträger mit Alufolie umwickeln (matte Seite nach außen)
Deckglas mit Schnitten aus EPON, etwas abstreifen und auf Alufolie
legen (Schnitte nach oben)
Gelantine Kapsel mit frischem EPON $\frac{3}{4}$ füllen
Zettel mit Probenname etc. beschriften und in die Kapsel legen
Gelantinekapsel vollständig füllen
Gefüllte Gelantinekapsel auf Probe aufsetzen (Probe sollte in der Mitte
sein)
Luftblase nach oben steigen lassen
Polymerisieren lassen in Wärmeschrank ca. 48 h bei 60°C
Kapseln von Alufolie lösen
Deckglasrand der an den Seiten der Kapsel übersteht
mit Schere abschneiden
EPON vom Deckglas abkratzen
Ca. 10 min zurück in den Wärmeschrank
In flüssigen Stickstoff legen, damit Deckglas von EPON abgesprengt
wird
Kapsel aus Stickstoff nehmen, Glas entfernen Glassplitter mit Pressluft
entfernen

Antrimmen der Probe		
Herstellung von Ultradünnschnitten		50-70 nm
Kontrastierung	Uranyl-Acetat	20 sec
	Bleiacetat	20 sec

2.2.15. P-Element Mutagenese

Für die P-Element Mutagenese wurden die Fliegen Stöcke 12203 y[1] w[67c23]; Pw[+mC]=lacWMov34[k08003]/CyO und 17450 y[1] w[67c23]; Pw[+mC] y[+mDint2]=EPgy2CG30164[EY08306] verwendet.

Die Abkürzung von Stock 12203 lautet P(lacW)Mov34 und die von Stock 17450 P(EPgy2). Zur Herstellung einer P-Element Mutagenese wurde folgendes Kreuzungsschema angewandt (Abb. 2.7).

$$F_0 : \frac{w^-}{w^-}; \frac{P(EPgy2)}{CyO}; \frac{+}{+} \times \frac{w^-}{w^-}; \frac{+}{+}; \frac{\Delta 2 - 3, ki}{\Delta 2 - 3, ki} \triangleright \frac{w^-}{7}; \frac{P(EPgy2)}{+}; \frac{\Delta 2 - 3, ki}{+}$$

$$F_1 : \frac{w^-}{w^-}; \frac{P(EPgy2)}{+}; \frac{\Delta 2 - 3, ki}{+} \times \frac{w^-}{7}; \frac{CyO}{sp}; \frac{TM2}{TM6} \triangleright \frac{w^-}{7}; \frac{P(EPgy2)}{CyO}; \frac{TM2/TM6}{+}$$

Abb. 2.7.: Kreuzungsschema zur Herstellung einer P-Element Mutagenese.

Es wurden 20 große Gläser für die F0 Kreuzung angesetzt. Die Parentalgeneration wurde einmal umgesetzt. Transgene heterozygote P (EPgy2); ($\Delta 2-3$, ki)A-2, ki werden anhand von Augenmarker (variierende Augen) und ki Borsten identifiziert. Diese Fliegen werden mit einem Multi-Balancer Stamm gekreuzt (siehe Kreuzungsschema Abb. 2.7).

Für die F1 Kreuzung wurden 40 große Gläser angesetzt, die ein Mal umgesetzt wurden. Es wurden nur Fliegen gesammelt, die eine unterschiedliche Augenfarbe im Vergleich zur Augenfarbe der ursprünglichen P-Element Insertion hatten und den CyO Balancer trugen.

Die so entstandenen Fliegenlinien wurden mit Hilfe von PCR auf eine Insertion im *dsert* Gen untersucht. Es wurden vier verschiedene Primer Paare verwendet, die die gesamte

genomische Region des *dsert* Gens überspannen, sowie ein Primer (Pry4), der an die invertierten Wiederholungen des P-Elementes bindet. Als Kontrolle für den Primer der an den invertierten Wiederholungen des P-Elementes bindet diente die Linie P(lacW)Mov34. Der inverse Primer der an die invertierten Wiederholungen des P-Konstrukts bindet konnte mit dem nur 1,3 kb vom *dsert* Gen entfernten P-Element P(lacW)Mov34 auf seine Funktionalität getestet werden. Als zweiter Primer wurde der antisense Primer das Paires PCR4 benutzt.

Wenn Pry4 anwesend ist und eine Bande der vier Primer Paare nicht amplifiziert wird, und zusätzlich eine Bande mit dem inversen Primer zu sehen ist, dann kann es sich um eine P-Elementinsertion in dieser Region handeln. Gearbeitet wurde mit homozygoten Fliegenstöcken.

2.2.16. DNA-Isolation aus Fliegen

- 50 Fliegen mittels CO₂ betäuben und in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß auf Eis sammeln
- Homogenisieren mit 500 μ l Homogenisierungspuffer in einem Glashomogenisator
- Homogenat in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß bei 70°C 30 min inkubieren
- 70 μ l 8M KAc zugeben, vortexen
- 30 min auf Eis inkubieren
- 15 min bei 4°C mit 13.000 rpm zentrifugieren
- Überstand in ein frisches 1,5 ml Reaktionsgefäß überführen
- 200 μ l Phenol und 200 μ l Chloroform zugeben, vortexen
- 5 min bei 4°C mit 13.000 rpm zentrifugieren
- obere Phase in ein frisches 1,5 ml Reaktionsgefäß überführen
- Isopropanol ca. 150 μ l zugeben
- 5 min bei Raumtemperatur mit 13.000 rpm zentrifugieren
- Überstand abnehmen
- Pellet in EtOH 70% ca. 300 μ l bei 4°C 10 min mit 13.000 rpm zentrifugieren

- Pellet lufttrocknen
- Pellet lösen in 100 μ l TE
- Zugabe von 1 μ l RNase A (10 mg /ml)

2.2.17. PCR

- 100 ng/500ng Plasmid-DNA/Genomische DNA
- 5 μ l PCR-Puffer (10x)
- 5 μ l MgCl₂ (25 mM)
- [3-5 μ l DMSO brack 1 μ l dNTPs (10 mM)
- 1 μ l sense Primer (10 pmol)
- 1 μ l anti-sense Primer (10 pmol)
- (1 μ l invers Primer (10 pmol)
- 1 μ l Taq-Polymerase
- ad ddH₂O auf 50 μ l

PCR-Programm	95°C 3 min
	40 Zyklen:
	95°C 1 min
	56°C 1 min [mit DMSO 53°C]
	72°C 4 min
	72°C 10 min

15 μ l des PCR-Ansatzes werden auf ein Agarosegel aufgetragen.

Agarosegel 1%	TBE 100ml
	Agarose 1g
	Aufkochen
	Abkühlen lassen
	Ethidiumbromid 6 μ l (1mg/ml)

Je nachdem, wie groß die DNA Fragmente sind verändert man den Agaroseanteil. Für kleine Fragmente nimmt man bis zu 2% Agarose, für große Fragmente nur 0,6% Agarose.

2.2.18. Messung von Ethanolsensitivität und Toleranz

Vorbereitung des Inebriometers:

- Alkoholstand überprüfen: Bis Strich (schwarz) auffüllen (darf nie unter blauen kommen, Druckveränderung!)
- Auffüllen von Glasgefäß mit Alkohol vor jedem Experiment
- Ethanol reinst mischen 95% (950 ml Ethanol + 50ml dH₂O)
- Auffüllen Wassergefäße bis zum schwarzen Strich (immer dH₂O!)
- Trockensäule muss blaues Granulat haben, wenn rosa auswechseln
- Kühlungsanlage: Rote Klammern ab! Anstellen (Knopf schwarz) Anzeige blinkt, Knopf oben links drücken, Einstellung erscheint 20°C F2(3), Pumpe anstellen (grüner Knopf)
- Umwälzungsanlage (Aquariumspumpe): Wassergeruch testen (vorsichtig Deckel abschrauben). Wenn Alkoholgeruch, Wasser wechseln (dH₂O)
- Pumpe anschalten (hinten rechts)
- Glaskolben richtig unterstellen (Striche)
- Computer:
- Blaue Box rechts neben Computer immer anlassen!
- Prog.: Dfm28
- Säulen 1 - 4 = Monitor 1 - 4
- In Fenster Versuch eintragen unten muss 000 stehen
- Wenn minus Zeichen in unterem Feld der Anzeige erscheinen evtl. Verkabelung an Lichtschranke unten an der Säule richten

Durchführung Experiment:

- Fliegen 1 h vor Beginn des Experimentes bei RT lagern
- Vorsichtig Hauptschalter für den Druck aufdrehen (rot)

- Säulen für Mischung EtOH-H₂O einstellen: ganz aufdrehen (5 l/min) wenn Maximum nicht erreicht Druck etwas erhöhen an Druckbarometer (auf max. 0,15 bar)
- Dann Säulen herunter regulieren auf EtOH-H₂O 2,5 l/min
- Säulen 1 h laufen lassen und erneut EtOH-H₂O Gemisch auf 2,5 l/min einstellen
- Vorbereitung Messung: ca. 120 Fliegen von mittleren Gläsern in Plastikspritzen mit Schaumstoffpfropf überführen und 5 min ruhen lassen
- Mittlere Gläser mit feuchtem Papiertuch um Deckel vorbereiten und beschriften mit dem Zeitpunkt des ersten Experimentes und der Fliegenkreuzung
- Spritzen oben auf Apparatur legen, Säulen öffnen, Fliegen vorsichtig nach unten klopfen, Spritzen in Apparatur legen und Fliegen langsam aber zügig hinein drücken
- Computer Monitor 1 - 4 starten
- In Fenster eintragen: Experimentator, Fliegenkreuzung, etc.
- Zeit wird gemessen 57 min nach ca. 50 min Vorbereitung nächster Durchlauf
- Die Fliegen unten aus Erlenmeyerkolben in mittlere Gläser mit feuchtem Tuch überführen und 4 h bei RT aufbewahren, nach zweitem Durchlauf wegschmeißen

3. Ergebnisse

Hohe Alkoholtoleranz korreliert mit einem erhöhten Risiko für Alkoholabhängigkeit im Menschen (MCBRIDE und LI 1998; TUERKER et al. 1998; FADDA und ROSSETTI 1998). Ähnliches gilt für Rattenzüchtungen, die freiwillig hohe Dosen Alkohol zu sich nehmen. Diese Ratten reagieren weniger sensitiv auf Ethanol und entwickeln schneller Toleranz (BELL et al. 2006). Bis heute sind die Mechanismen einer Toleranzentwicklung jedoch weitgehend ungeklärt.

Drosophila melanogaster ist als Modellorganismus zur Untersuchung der genetischen und molekular genetischen Grundlage von Ethanoltoleranz geeignet (SCHOLZ et al. 2000). In Säugetieren spielt 5HT eine bedeutende Rolle bei der Entwicklung von Ethanoltoleranz. Hier soll die Rolle von 5HT bei der Entwicklung von Ethanolsensitivität und Toleranz mit Hilfe von pharmakologischen und genetischen Werkzeugen in *Drosophila melanogaster* untersucht werden.

Die Ergebnisse sind in drei Teile gegliedert. Im ersten Teil wird die Auswirkung von veränderten 5HT Konzentrationen, die mittels Psychopharmaka oder gentechnisch manipuliert wurden, untersucht. Im zweiten Teil werden das serotonerge und das dopaminerge Neuronennetzwerk, sowie zwei GAL4 Linien, mit Hilfe von histologischen Methoden charakterisiert. Im dritten Teil wird der Versuch dokumentiert, ein P-Element in die für den dSERT kodierende genomische Region inserieren zu lassen.

3.1. Einfluss von veränderten 5HT Konzentrationen auf Ethanolsensitivität und Toleranz

Die 5HT Konzentrationen in der Fliege wurden für kurze Zeit mit Psychopharmaka verändert. Langzeitveränderungen wurden mit Hilfe von gentechnischen Werkzeugen durchgeführt. Die Auswirkung von veränderten 5HT Konzentrationen auf das Körpergleichgewicht wurde mit Hilfe des Inebriometers gemessen. Untersucht wurden die Ethanolsensitivität und die Ethanoltoleranz der Fliegen.

3.1.1. Kurzfristige Veränderungen der 5HT Konzentrationen haben keinen Einfluss auf die Ethanol sensitivität oder Toleranz

Zuerst wurde untersucht, welchen Einfluss eine kurzzeitige Erhöhung der 5HT Konzentrationen auf Ethanol induziertes Verhalten hat. Fütterung von der 5HT Synthese Vorstufe 5-Hydroxytryptophan (5HTP) oder einem 5HT Synthese Inhibitor wie p-Chlorphenylalanin (p-CPA) können die 5HT Konzentrationen in der Fliege erhöhen, bzw. reduzieren (YUAN et al. 2005; BANERJEE et al. 2004; PENDLETON et al. 2002). Es konnte unter anderem gezeigt werden, dass das Füttern von 5HTP (4mg/ml) für 24 h zur Veränderung der zirkadianen Rhythmik führen kann (YUAN et al. 2005).

Die 5HT Synthesevorstufe 5HTP wird gelöst in einer 5%igen Saccharoselösung (Vehikel) mit einer Konzentration von 4 mg/ml und 24 h gefüttert. In einem Vorversuch konnte gezeigt werden, dass bereits nach 2-4 h Fliegen die mit Lebensmittelfarben angefärbte 5%tige Saccharoselösungen aufgenommen hatten. Als Kontrolle für die Experimente wurde nur das Vehikel gefüttert. Anschließend wurden die Fliegen im Inebriometer hinsichtlich ihrer Ethanol sensitivität und Toleranz untersucht. Es wurden heterozygote *w¹¹¹⁸; appl-GAL4/+* Fliegen für diesen Versuch verwendet. Dieser Genotyp wurde verwendet als Kontrolle für die später aufgeführten Versuche, in denen gentechnisch die 5HT Konzentration manipuliert wurde.

Mit Saccharose gefütterte Fliegen entwickelten eine MET1 von $23 \pm 0,5$ min. Fliegen, die mit 4 mg/ml 5HTP gefüttert wurden, entwickelten ebenfalls eine MET1 von $23 \pm 0,5$ min, mit ähnlichen Werten für 0,4 mg/ml und 0,04 mg/ml. Keine signifikante Abweichung im Vergleich zum Vehikel war zu sehen, was bedeutet, dass die Fliegen normale Sensitivität entwickelten. Kontrollfliegen entwickeln eine Ethanol toleranz von $23 \pm 3\%$. Die Toleranz der experimentellen Fliegen lag zwischen $19 \pm 3\%$ und $23 \pm 2\%$. Die Ethanol sensitivität, sowie Toleranz der Kontrollfliegen, unterschied sich nicht signifikant von den Fliegen, die mit 5HTP gefüttert wurden (Abb. 3.1A und 3.1B).

Des Weiteren wurde getestet, ob die Reduktion von 5HT einen Einfluss auf Ethanol induziertes Verhalten hat.

Fliegen, die fünf Tage mit p-CPA 10 mg/ml gefüttert wurden, weisen Flugdefizite auf (Banerjee et al., 2004). Um die Kurzzeitwirkung von Psychopharmaka in adulten Fliegen zu untersuchen, wurde p-CPA 24 h lang gefüttert.

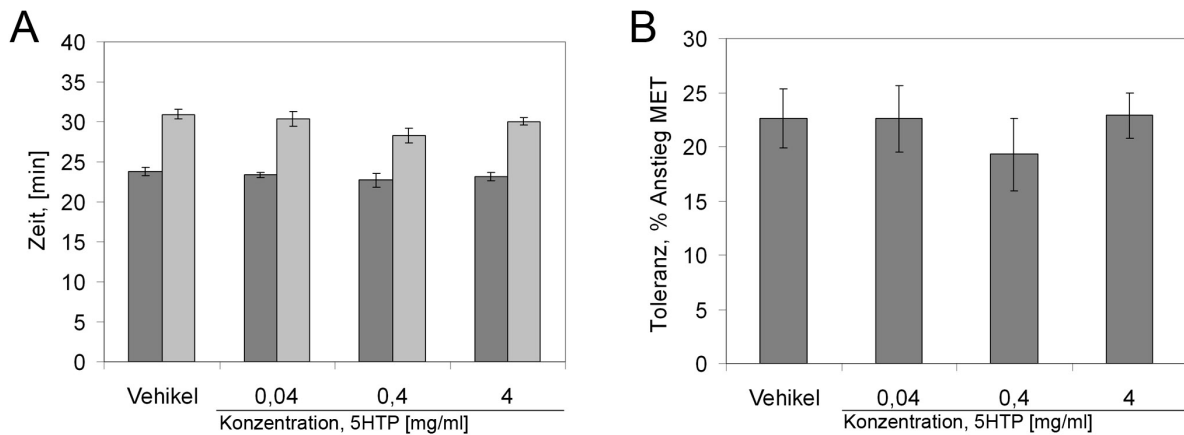


Abb. 3.1.: **Verschiedene 5HTP Konzentrationen beeinflussen weder die Ethanolsensitivität noch die Ethanoltoleranz.** Fliegen ($w^{1118};app\text{-}GAL4/+$) wurden für 24 h mit unterschiedlichen 5HTP Konzentrationen gefüttert (0,04 mg/ml, 0,4 mg/ml und 4 mg/ml). Anschließend wurden diese Fliegen im Inebriometer hinsichtlich ihrer Ethanolsensitivität und Ethanoltoleranz untersucht. In (A) sind die erste MET (dunkelgrau) und die zweite MET (hellgrau) gezeigt. Die Met1 liegt bei $23 \pm 0,5$ min für Kontrollfliegen und bei $23 \pm 0,5$ min für Fliegen, die mit 5HTP 4mg/ml gefüttert wurden ($n=7-14$). Auch die MET2 für Kontrollfliegen ($31 \pm 0,6$ min) nicht verschieden von der MET2 von mit 5HTP (4 mg/ml) gefütterten Fliegen ($30 \pm 0,5$ min). Weder die MET1 noch die MET2 der mit Psychopharmaka gefütterten Fliegen unterscheiden sich signifikant von den Kontrollfliegen. Abbildung B zeigt die Ethanoltoleranz. Kontrollfliegen entwickeln 23 ± 3 % Toleranz. Es existiert kein signifikanter Unterschied zwischen Kontrollfliegen und Fliegen die mit verschiedenen 5HTP Konzentrationen gefüttert wurden (B)(genaue Werte in Tabelle A.1, Anhang).

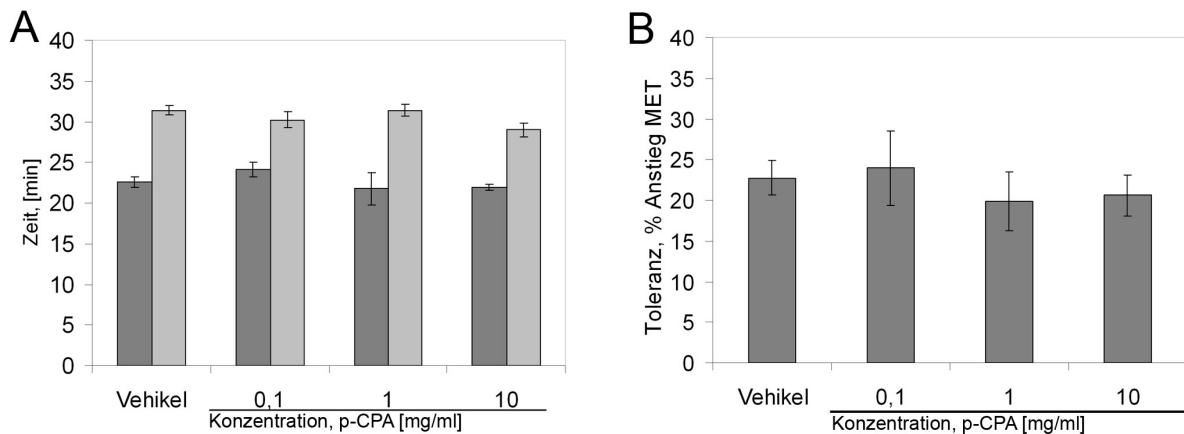


Abb. 3.2.: Die Reduktion von 5HT Konzentrationen beeinflusst weder die Ethanolsensitivität noch die Ethanoltoleranz. Kontrollfliegen (w^{1118} , *appl-GAL4/+*) wurden für 24 h mit unterschiedlichen p-CPA Konzentrationen gefüttert (10 mg/ml, 1 mg/ml und 0,1 mg/ml). Anschließend wurden diese Fliegen im Inebriometer bezüglich ihrer Ethanolsensitivität und Ethanoltoleranz untersucht. In (A) sind die erste MET (dunkelgrau) und die zweite MET (hellgrau) gezeigt. Die MET1 liegt bei $24 \pm 0,7$ min für Kontrollfliegen und bei $22 \pm 0,4$ min für Fliegen die mit p-CPA 10 mg/ml gefüttert wurden ($n=3-12$). Auch die MET2 für Kontrollfliegen ($31 \pm 0,6$ min) unterscheidet sich nicht von der MET2 für die mit p-CPA (10 mg/ml) gefütterten Fliegen ($29 \pm 0,8$ min). Abbildung (B) zeigt die Ethanoltoleranz. Kontrollfliegen entwickeln Toleranz um 23 ± 2 %. Es existiert kein signifikanter Unterschied zwischen Kontrollfliegen und Fliegen die mit verschiedenen p-CPA Konzentrationen gefüttert wurden (21 ± 3 %, 10 mg/ml; 20 ± 4 %, 1 mg/ml; 24 ± 5 %, 0,01 mg/ml)(genaue Werte in Tabelle A.2, Anhang).

Männlichen Fliegen wurden für 24 h mit dem 5HT Synthese Inhibitor p-CPA gefüttert. Anschließend wurden diese Fliegen im Inebriometer getestet. Die Fliegen, die mit dem Vehikel gefüttert wurden, zeigten eine MET1 von $24 \pm 0,7$ min und eine MET2 von $31 \pm 0,6$ min. Diese Werte unterschieden sich nicht signifikant von der MET1 ($22 \pm 0,4$ min) und MET2 ($29 \pm 0,8$ min) nach Fütterung von 10 mg/ml p-CPA. Die Fütterung von 10 mg, 1 mg, und 0,1 mg p-CPA hatte keinen Einfluss auf die Ethanolsensitivität, wie MET1 (dunkelgrau) und MET2 (hellgrau) zeigen (Abb. 3.2 A). Auch die Ethanoltoleranz der Kontrollfliegen (23 ± 2 %) unterschied sich nicht signifikant von den experimentellen Fliegen (21 ± 3 %, 10 mg/ml; 20 ± 4 %, 1 mg/ml; 24 ± 5 %, 0,01 mg/ml)(Abb. 3.2 B).

Das Füttern von Psychopharmaka, die entweder zu einer Reduktion, oder zu einem Anstieg der 5HT Konzentration führen sollen, verändern weder die Ethanolsensitivität noch die

Toleranz. Dies könnte unter anderem daran liegen, dass die 5HT Konzentrationen im Gehirn der Fliege nicht verändert worden sind, weil 5HTP bzw. p-CPA nicht dorthin gelangen konnte. Ferner könnte 5HTP nicht in 5HT umgewandelt worden sein bzw. p-CPA die Synthese von 5HT nicht effektiv blockiert haben.

Zur Kontrolle, ob die Fütterung von Psychopharmaka tatsächlich 5HT Konzentrationen im Kopf der Fliege verändert, wurden 5HT Konzentrationen mittels ELISA gemessen. Dafür wurde Kontrollfliegen p-CPA (10 mg/ml) für 16 h und 24 h gefüttert und 5HTP 4 mg/ml für 24 h, vergleichbar mit den durchgeführten Verhaltensexperimenten.

Die Köpfe dieser Fliegen wurden homogenisiert. Da Fliegenköpfe unterschiedlich groß sein können, wurde die Proteinmenge pro Kopf mit einem Bradford-Test bestimmt. Aufgeführt ist die 5HT Konzentration in *pg* pro *μg* Protein. Die Messungen wurden mit drei unabhängigen Proben durchgeführt.

Kontrollfliegen weisen $0,168 \pm 0,05$ *pg/μg* 5HT pro Kopf auf. In mit 5HTP gefütterte Fliegen lassen sich $0,635 \pm 0,03$ *pg/μg* 5HT pro Kopf nachweisen. Das heißt, dass die Fütterung von 4 mg 5HTP für 24 h die 5HT Konzentration um das 4fache erhöht. Hingegen lassen sich in Fliegen, die den Synthese Inhibitor p-CPA bekommen haben, nach 16 h nur $0,1 \pm 0,01$ *pg/μg* 5HT pro Kopf und nach 24 h nur $0,09 \pm 0,01$ *pg/μg* pro Kopf nachweisen. Die 5HT Konzentrationen sind demnach um 41% bzw. 46% reduziert (Abb. 3.3).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass trotz einer erhöhten 5HT Konzentration im Gehirn der Fliege keine Änderung der Ethanol sensitivität und der Ethanol toleranz nachgewiesen werden konnte. Es stellt sich die Frage, ob die 4fache Erhöhung der 5HT Konzentration im Gehirn auch zu einer Erhöhung der 5HT Konzentration in Vesikeln, bzw. im synaptischen Spalt führte.

Ferner resultiert das Füttern eines 5HT Synthese Inhibitors in eine Reduktion der 5HT Konzentrationen. Diese Reduktion geht jedoch nicht mit einer Veränderung der Ethanol sensitivität oder Toleranz einher. Bisher ist unklar, ob die um ca. 46% reduzierten 5HT Konzentrationen ausreichend sind, um eine wildtypische 5HT Signaltransduktion aufrecht zu erhalten.

Allerdings ist eine Tendenz zu erhöhter Ethanol sensitivität und reduzierter Ethanol toleranz zu erkennen. Dabei handelt es sich um ca. 2 min MET1 Unterschied zwischen Kontroll-

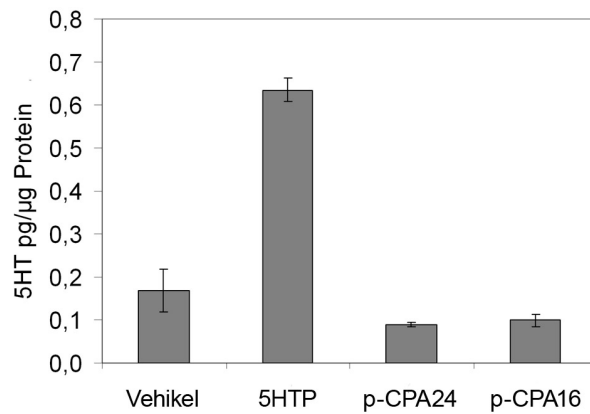


Abb. 3.3.: Die Fütterung einer 5HT Vorstufe und eines 5HT Synthese Inhibitors bewirken einen Anstieg, bzw. eine Reduktion von 5HT in Fliegenköpfen. Mit 5% Saccharose gefütterte Kontrollfliegen (*w¹¹¹⁸, appl-GAL4/+*) weisen $0,168 \pm 0,05$ pg 5HT pro μ g Protein pro Kopf auf. Nach Füttern von 5HTP für 24 h erhöht sich die Menge auf $0,635 \pm 0,03$ pg 5HT/ μ g Protein. Wird der 5HT Synthese Inhibitor gefüttert, ist die 5HT Konzentration nach 16 h um 41% und nach 24 h um 46% reduziert (n=3, pro Ansatz wurden je zwei Fliegenköpfe gemessen).

fliegen und Fliegen, die mit 10 mg/ml p-CPA gefüttert wurden bzw. 2% Unterschied der Ethanoltoleranz dieser Fliegen (siehe Tabelle A.2, Anhang). Getestet werden müsste, ob eine längere Fütterung von p-CPA, z.B. 3-5 Tage, zu einer stärkeren Reduktion führt (BANERJEE et al. 2004; PENDLETON et al. 2002). Falls dies der Fall wär müssten diese Tiere auf Ethansensitivität und Toleranz getestet werden.

Der nächste Schritt ist, die Signaltransduktion von 5HT mit einem SERT Inhibitor zu erhöhen.

3.1.2. Veränderung der Signaldauer von 5HT hat einen Einfluss auf Ethansensitivität und Toleranz

5HT wird von der präsynaptischen Seite durch Neurotransmitterausschüttung in die Synapse freigesetzt. Daraufhin diffundiert 5HT an die postsynaptische Seite, wo es an 5HT Rezeptoren bindet (NESTLER et al. 2001) bzw. an Rezeptoren, die auf der präsynaptischen Seite lokalisiert sind (Autorezeptoren). Anschließend wird 5HT aus dem synaptischen Spalt mit Hilfe eines präsynaptisch lokalisierten SERT wieder aufgenommen (BRUNS et al. 1993; O'REILLY und REITH 1988).

Die Wiederaufnahme von 5HT durch den SERT lässt sich durch einen selektiven 5HT Wiederaufnahmehemmer (SSRI) unterdrücken. Es kommt zu einer 5HT Erhöhung im synaptischen Spalt und einer Verlängerung der Signaltransduktion (ANSORGE et al. 2004; KENT 2000; BLAKELY et al. 1998).

Um den Einfluss einer längeren Verweildauer von 5HT im synaptischen Spalt auf Ethanol induziertes Verhalten zu untersuchen, wurde der SERT Inhibitor Paroxetin gefüttert. Im Vergleich zu anderen Inhibitoren hat Paroxetin die stärkste Affinität zum *Drosophila* SERT (DEMCHYSHYN et al. 1994). Fliegen wurden über 24 h mit Konzentrationen von 1 mg/ml, 0,1 mg/ml und 0,01 mg/ml Paroxetin gefüttert. Anschließend wurde getestet, ob diese Fliegen eine Veränderung ihrer Ethanolsensitivität bzw. Ethanoltoleranz aufweisen.

Kontrollfliegen entwickeln eine Ethanolsensitivität von $24 \pm 0,5$ min, hingegen Fliegen, die 1 mg Paroxetin erhalten haben, eine MET1 von nur $21 \pm 1,2$ min. Der Anstieg der Sensitivität ist signifikant (Abb. 3.4 A). Auch nach vier Stunden ist die Ethanolsensitivität der mit 1 mg Paroxetin gefütterten Fliegen signifikant reduziert und liegt bei $26 \pm 1,3$ min im Gegensatz zu den Kontrollfliegen mit $31 \pm 0,4$ min ($p = 4,9E - 7$). Auch die Ethanoltoleranz ist verändert. Die Kontrollfliegen zeigen eine Ethanoltoleranz von $23 \pm 2\%$ während die experimentellen Fliegen nur $17 \pm 2\%$ Toleranz entwickeln. Die Inhibition des dSERT hat demnach einen Einfluss auf die Entwicklung von Ethanoltoleranz.

Zur Überprüfung der 5HT Konzentrationen in den Fliegen wurde ein ELISA durchgeführt. Die Werte nach Paroxetin Gabe liegen bei $0,135 \pm 0,1$ pg/ μ g 5HT während wildtypische Werte bei $0,168 \pm 0,05$ pg/ μ g Protein liegen (Abb. 3.5). Die Konzentration von 5HT ist dementsprechend nach Fütterung von Paroxetin unverändert. Das kurzzeitige Blockieren des dSERTs sollte keinen Einfluss auf die 5HT Menge im Kopf der Fliege haben, da weder Synthese noch Abbau manipuliert werden. Trotzdem erhöht die veränderte Signaltransduktion die Ethanolsensitivität und reduziert die Ethanoltoleranz (Abb. 3.4).

Für Säugetiere konnte gezeigt werden, dass nach Gabe von SERT Wiederaufnahmehemmern, die Ethanolaufnahme reduziert wird (GULLEY et al. 1995; HARAGUCHI et al. 1990). Nicht geklärt ist jedoch, welche Mechanismen für die reduzierten Ethanolaufnahme verantwortlich sind. Die hier gezeigte erhöhte Ethanolsensitivität und die reduzierte Toleranz könnten ein Hinweis auf eine mögliche Ursache der reduzierten Ethanolaufnahme sein. Allerdings müsste erst in Fliegen getestet werden, ob diese tatsächlich weniger Ethanol nach SSRI Behandlung trinken.

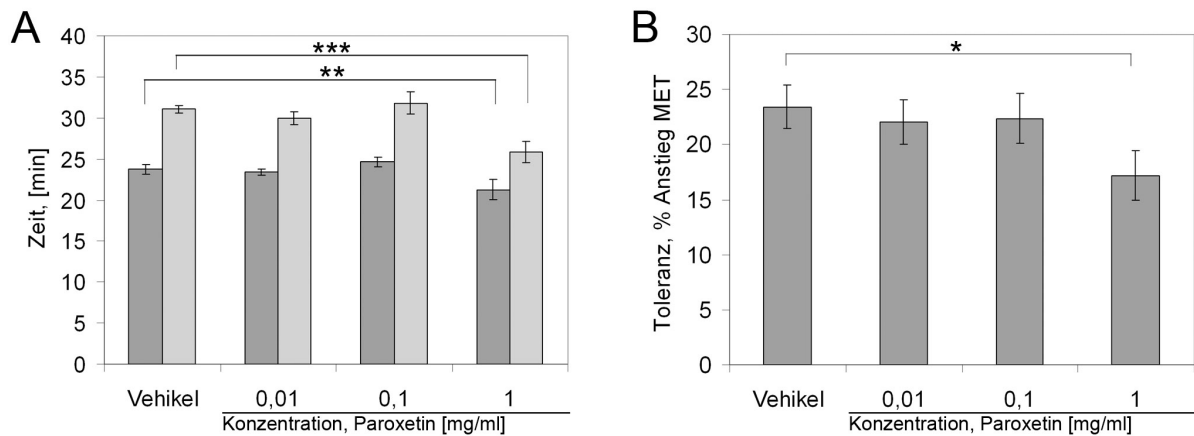


Abb. 3.4.: **Inhibition des dSERT durch Paroxetin führt zu einer erhöhten Ethanolsensitivität und einer reduzierten Ethanoltoleranz.** Männliche Fliegen wurden 24 h mit Paroxetin verschiedener Konzentrationen gefüttert. Anschließend wurden diese Fliegen im Inebriometer getestet. 1 mg Paroxetin verursacht eine Reduktion der MET1 (dunkelgrau) von $24 \pm 0,5$ min in Kontrollfliegen auf $21 \pm 1,2$ min nach Fütterung von Paroxetin, d.h. zu einer erhöhten Ethanolsensitivität (A). Auch die MET2 (hellgrau) ist nach Fütterung von 1 mg Paroxetin von $31 \pm 0,4$ min (Vehikel) auf $26 \pm 1,3$ min reduziert. Füttert man 0,1 mg, oder 0,01 mg Paroxetin wird die Ethanolsensitivität nicht beeinflusst ($p = 4,9E - 7$, $p = 0,02$)($n=12-16$). Die Inhibition des SERT reduziert die Ethanoltoleranz der Fliegen, wenn 1 mg Paroxetin gefüttert wird, von $23 \pm 2\%$ auf $17 \pm 2\%$ (B)($p = 0,02$) (genaue Werte in Tabelle A.3, Anhang).

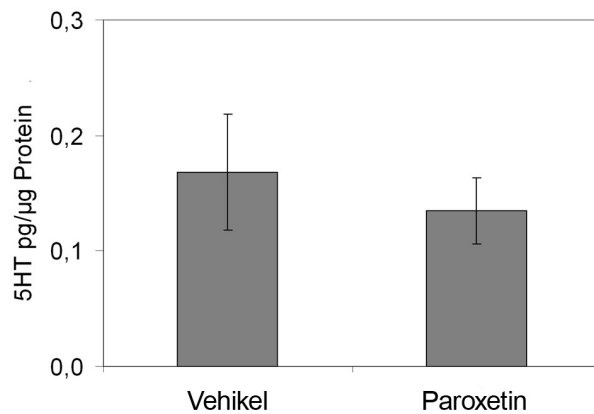


Abb. 3.5.: Die Fütterung eines SERT Inhibitors bewirkt keine Veränderung der 5HT Konzentration in *Drosophila* Köpfen. Kontrollfliegen wurde Paroxetin für 24 h gefüttert (1 mg/ml). Anschließend wurden die Köpfe von männlichen Fliegen homogenisiert und die 5HT Konzentration wurde mittels ELISA bestimmt. Da die Köpfe unterschiedlich groß sein können, wurde die Proteinmenge pro Kopf mit einem Bradford-Test bestimmt. Es ist die 5HT Konzentration pro μg Protein angegeben. Die Kontrolltiere mit $0,168 \pm 0,05 \text{ pg}/\mu\text{g}$ pro Kopf im Vergleich zu Tieren mit inhibierten dSERT mit $0,135 \pm 0,1 \text{ pg}/\mu\text{g}$ 5HT pro Kopf zeigen keinen Unterschied im Bezug auf die 5HT Konzentration ($n=3$, pro Ansatz wurden zwei Fliegenköpfe gemessen).

3.1.3. In Fliegenköpfen von w^{1118} Fliegen ist die 5HT Konzentration im Vergleich zu CantonS Fliegen nicht reduziert

Als genetischer Marker für das GAL4/UAS System wird ein *mini white* Gen verwendet. Es gibt Hinweise, dass w^{1118} Fliegen reduzierte 5HT Konzentrationen gegenüber wildtypischen (wt) Fliegen aufweisen (Meinertzhagen, persönliche Kommunikation).

Die bisher publizierten 5HT Mengen für w^{1118} Fliegen sind jedoch nicht konsistent und unterliegen starken Schwankungen (HARDIE und HIRSH 2006, ZHANG et al. 2005). Deshalb sollte mit den hier verwendeten Fliegen untersucht werden, ob w^{1118} Fliegen reduzierte 5HT Konzentrationen im Vergleich zu CantonS Fliegen aufweisen. Zur Bestimmung von 5HT Konzentration wurde ein ELISA durchgeführt. Die für den Versuch eingesetzten Proteinmengen wurden normalisiert.

Die 5HT Konzentrationen liegen bei $0,061 \pm 0,006$ für w^{1118} und $0,058 \pm 0,007$ $pg/\mu g$ für CantonS pro Kopf. Die Proteinmengen sind jedoch signifikant verschieden. CantonS Fliegen weisen höhere Proteinmengen pro Kopf mit $813,7 \pm 21,3$ μg auf als w^{1118} Fliegen mit $700,9 \pm 28,3$ μg . Die 5HT Konzentrationen pro μg Protein in den w^{1118} und CantonS Fliegenköpfen unterscheiden sich nicht voneinander (Abb. 3.6). Erhöhte 5HT Konzentrationen in CantonS Fliegen sind demnach auf größere Köpfe zurückzuführen.

Die 5HT Konzentrationen, die in den w^{1118} Fliegenköpfen gemessen wurden, sind sehr ähnlich mit den Werten von Hardie und Hirsh (2006). Letztere 5HT Konzentrationen wurden mit Hilfe von High Pressure Liquid Chromatography (HPLC) gemessen, wobei sowohl Fliegenköpfe als auch nur Fliegengehirne gemessen wurden. Für w^{1118} Fliegenköpfe ergab dies eine 5HT Konzentration von $37,7 \pm 1,0$ pg pro homogenisierten Kopf und in heraus präparierten Gehirnen $39,3 \pm 1,3$ pg , während wir in ganzen Köpfen $42,8 \pm 3,3$ pg 5HT messen (HARDIE und HIRSH 2006).

Erstaunlich ist, dass in Gehirnen im Vergleich zu Köpfen mehr 5HT gefunden wurde. Vermutet wird, dass mehr elektroaktive Moleküle in Lösung sind wenn der ganze Kopf eingesetzt wird, die das Ergebnis der HPLC verfälschen können (HARDIE und HIRSH 2006).

In den oben aufgeführten Versuchen wurden die 5HT Konzentrationen bezüglich der Protein-

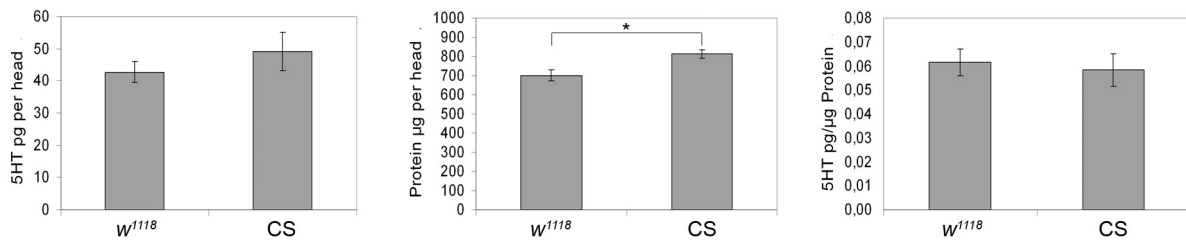


Abb. 3.6.: In Fliegenköpfen von *w¹¹¹⁸* Fliegen ist die 5HT Konzentration im Vergleich zu CantonS Fliegen nicht reduziert. Köpfe von männlichen Fliegen wurden homogenisiert und die 5HT Konzentrationen mittels ELISA bestimmt. 5HT Konzentrationen in *w¹¹¹⁸* Fliegenköpfen ($42,8 \pm 3,3 \text{ pg}$) unterscheiden sich nicht signifikant von 5HT Konzentrationen in CantonS Fliegenköpfen ($49,2 \pm 6,0 \text{ pg}$) (A). Zusätzlich wurden Proteinmengen pro Kopf mittels Bradford-Test gemessen. Proteinmengen in CantonS Köpfen ($813,7 \pm 21,3$) sind signifikant erhöht im Vergleich zu Proteinmengen in *w¹¹¹⁸* Fliegenköpfen (B) ($700,9 \pm 28,3$) ($p = 0,02$). Berechnet man pg 5HT pro μg Protein pro Kopf gibt es ebenfalls keinen signifikanten Unterschied zwischen *w¹¹¹⁸* ($0,061 \pm 0,006$) und CantonS ($0,058 \pm 0,007$) Fliegen (C). Es wurden fünf unabhängige Experimente mit jeweils drei unabhängigen Fliegengruppen durchgeführt ($n=15$).

menge normalisiert, was unseres Wissens nach nicht für die publizierten HPLC-Ergebnisse gilt.

Zu sehen ist, dass der ELISA im Vergleich zur HPLC Technik größeren Schwankungen unterliegt. Die HPLC Werte weichen nur ca. $1,3 \text{ pg}$ vom Wert ab, während die ELISA Daten eine Abweichung von über 3 pg zeigen. Dennoch kommen pro Fliegenkopf vergleichbare Werte heraus.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass es keine Unterschiede in 5HT Konzentrationen zwischen *w¹¹¹⁸* und CantonS Fliegen gibt, wenn die Größe der Köpfe in die Berechnungen der 5HT Konzentration mit einbezogen wird.

3.1.4. Überexpression des dSERTs in einem Großteil der Neurone hat keinen Einfluss auf Ethanol sensitivität oder Toleranz

Eine andere Möglichkeit 5HT Konzentrationen in der Fliege zu verändern, ist die genetische Manipulation des dSERTs mit dem GAL4/UAS System. Die Überexpression des dSERT und die ektopische Expression in der Mehrzahl der Neuronen des ZNS sollte die Aufnahme von 5HT aus dem synaptischen Spalt erhöhen. Allerdings muss dafür mehr funktioneller dSERT in

die präsynaptische Membran integriert werden. In einem Vorversuch sollte festgestellt werden, wo der dSERT im *Drosophila* Gehirn lokalisiert ist.

Kolokalisation des dSERTs mit serotonergen Neuronen

Zunächst stellt sich die Frage, ob in *Drosophila* der dSERT auf serotonergen Neuronen exprimiert wird. Dazu wurde ein dSERT Antikörper hergestellt. Gefrierschnitte mit dSERT Antikörper und 5HT Färbung zeigen eine Überlappung von serotonergen Neuronen und Neuronen die von dem dSERT Antikörper an gefärbt werden (Abb.3.7). Der Ellipsoidkörper sowie der fächerförmige Körper zeigen serotonerge Färbung (Abb.3.7 A), die mit dem dSERT Antikörper kolokalisiert. Auch die serotonergen Zellkörper kolokalisieren mit der Färbung des dSERT Antikörpers. In Abbildung 3.7 A sind zwei Neurone der Zellgruppe LP2 zu sehen. Die Abbildung 7B zeigt eine Kolokalisation von 5HT Antikörper und dSERT Antikörper in Somata von Neuronen der Zellgruppen LP1, SP1, SP2 und SE3 (benannt nach VALLES und WHITE 1988).

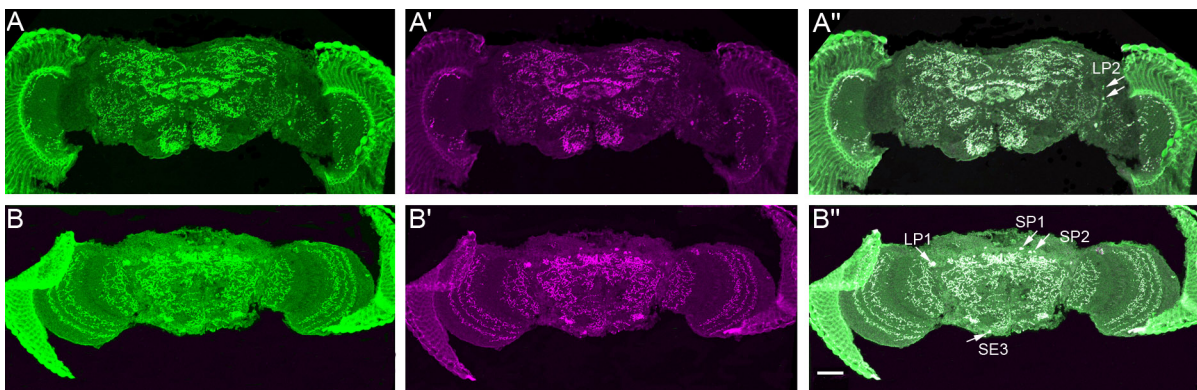


Abb. 3.7.: **Expression von dSERT relativ zu 5HT in adulten Köpfen von wt Fliegen.** Kolokalisationstudien mit einem dSERT Antikörper und einem 5HT Antikörper an adulten männlichen *Drosophila* Gehirnen wurden durchgeführt. Gefrierschnitte von CantonS Fliegen wurden dafür angefertigt und mit dSERT (grün), sowie 5HT (magenta) Antikörper gefärbt. Exemplarisch wurden zwei dieser Gefrierschnitte ausgewählt. In A-A'' sind Zellen des Ellipsoidkörper und der fächerförmige Körper gefärbt sowie Zellkörper der Zellgruppen: LP2 (A'' weiße Pfeile). Zellkörper, Axone und Dendriten der serotonergen Neurone kolokalisieren mit der Färbung des dSERT Antikörpers (A'' und B''). Die Abbildung B'' zeigt Kolokalisation des dSERT Antikörpers mit den serotonergen Zellgruppen LP1, SP1, SP2 und SE3 (weiße Pfeile)(weißer Balken $50 = \mu m$)(siehe auch Abb. B.1 - B.3, Anhang).

Der dSERT wird somit auf Somata, Dendriten und Axonen von serotonergen Neuronen exprimiert.

Elektronenmikroskopische Aufnahmen der Expression des dSERTs

Mit Hilfe von elektronenmikroskopischen Aufnahmen wurde die Expression von dSERT mit Hilfe einer Antikörperfärbung im adulten Gehirn auf zellulärer Ebene untersucht. Als Kontrolle dienten Gefrierschnitte ohne dSERT Antikörper. Als zweiter Antikörper wurde ein *horseradish* Peroxidase (HRP) konjugierter Antikörper eingesetzt. Die Gefrierschnitte wurden eingebettet, kontrastiert und Ultradünnschnitte wurden angefertigt. Die Ultradünnschnitte wurden auf ein Netz aufgetragen und bei einer Vergrößerung von 16.000 in einem Transmissionselektronenmikroskop (TEM) aufgenommen. Die Aufnahmen zeigen Ausschnitte aus der Region des Zentralkomplexes, der im Protocerebrum der Fliege lokalisiert ist. Das Kontrollbild, ohne dSERT Antikörper, zeigt unter anderem dunkle runde Strukturen, die Mitochondrien und graue längliche Strukturen, die Membranen (Abb. 3.8 A). In Abbildung 3.8 B ist an den Membranen, schwarz, die dSERT Färbung zu erkennen (weiße Pfeile)(Abb. 3.8 A).

Um die 5HT Signaltransduktion im Gehirn der Fliege lokal zu reduzieren wird der dSERT mit Hilfe des GAL4/UAS Systems überexprimiert. Für dieses Experiment musste ein *wt dsert* Gen unter *uas*-Kontrolle hergestellt werden.

Dafür wurde die kodierende Sequenz des *dsert* Gens in den UAS-Vektor kloniert. Damit die Expression des *uas-sert*³⁴ Transgens verfolgt werden konnte, wurden die kodierenden Bereiche des *dsert* Gens hinter die kodierenden Regionen des *gfp* Gens ligiert. Mit Hilfe der GFP Expression ließ sich die Expression des dSERT nach verfolgen.

Zur Expression dieses Fusionsproteins in der Mehrheit der Neuronen der Fliege wurde die *appl*-GAL4 Linie verwendet (GUNAWARDENA und GOLDSTEIN 2001).

Als Kontrolle dienen *w*¹¹¹⁸ Fliegen, *w*¹¹¹⁸; *appl*-GAL4/+ Fliegen und *w*¹¹¹⁸; *uas-sert*³⁴ Fliegen. Die Fliegen wurden im Inebriometer auf Ethanol sensitivität und Toleranz getestet.

Die Kontrollgruppen entwickeln eine MET1 zwischen $18 \pm 0,4$ min und $20 \pm 0,4$ min. Die MET1 der experimentellen Gruppe liegt bei $18 \pm 0,6$ min (Abb. 3.9 A). Auch die MET2 der Kontrollgruppen (25 ± 1 min - 30 ± 1 min) unterscheidet sich nicht von der MET2 der experimentellen Gruppe ($26 \pm 0,7$ min). Dementsprechend unterscheiden sich die METs von Fliegen, in denen der dSERT in den meisten Neuronen mit Hilfe der *appl*-GAL4 Treiberlinie

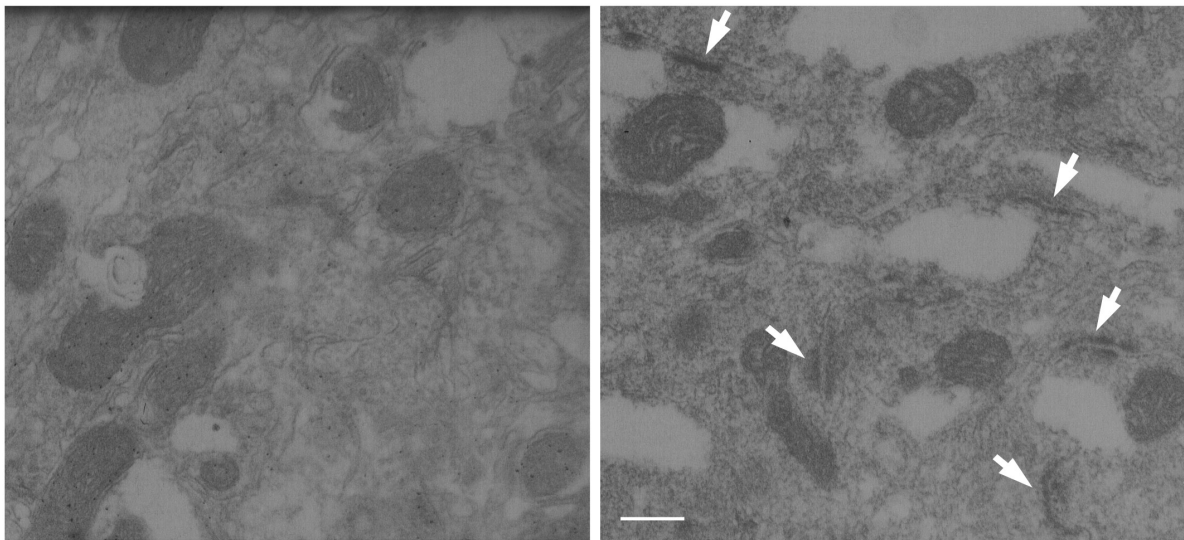


Abb. 3.8.: **Expression des dSERT auf zellulärer Ebene.** Gefrierschnitte von dem Kopf einer männlichen Fliege wurden hergestellt und anschließend mit dSERT Antikörper, sowie einem HRP konjugierten Zweitantikörper an gefärbt. Als Kontrolle dienten Gefrierschnitte, die nur mit dem zweiten Antikörper gefärbt wurden. Die Schnitte wurden in Kunstharz eingebettet, kontrastiert und Ultradünnschnitte wurden angefertigt. Aufgenommen wurden die Schnitte im TEM mit 16.000facher Vergrößerung. Die Bilder zeigen Ausschnitte aus der Region des Zentralkomplexes. In der Kontrolle ohne dSERT Antikörper sind graue längliche Strukturen, die Membranen, zusehen (A). In (B) ist an den Membranen dunkel DAB Präzipitat spezifisch für die HRP-Färbung zu erkennen (B)(weiße Pfeile)(weißer Balken= $1\mu m$).

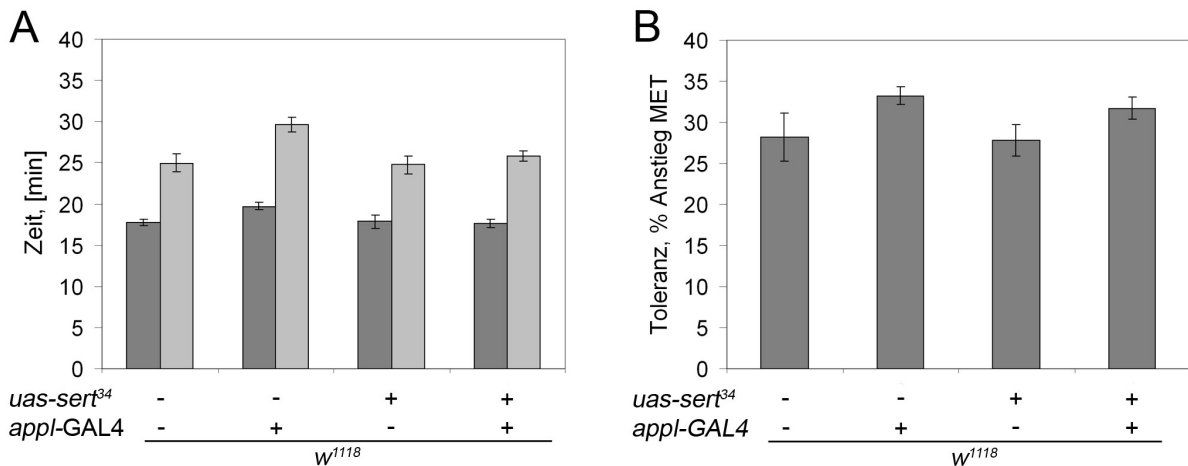


Abb. 3.9.: **Ektopische Expression von dSERT beeinflusst die Ethanolsensitivität und Toleranz in Fliegen nicht.** In (A) wird die Ethanolsensitivität der ersten und zweiten Ethanolbehandlung gezeigt. Die MET1 (dunkelgrau) der Kontrollgruppen liegt zwischen $18 \pm 0,4$ min und $20 \pm 0,4$ min und unterscheidet sich nicht von der MET1 der experimentellen Gruppe ($18 \pm 0,6$ min)(A). Auch die MET2 (hellgrau) der verschiedenen Kreuzungen (25 ± 1 min - 30 ± 1 min) ist nicht signifikant verschieden von den experimentellen Tieren ($26 \pm 0,7$ min)(n=8). Die Ethanoltoleranz der Kontrollgruppen ($28 \pm 3\%$ - $33 \pm 1\%$) im Vergleich zu der experimentellen Gruppe ($31 \pm 1\%$) ist weder reduziert noch erhöht (B) (genaue Werte in Tabelle A.4, Anhang).

exprimiert wird, nicht von den Kontrollen.

Die Ethanoltoleranz liegt bei den Kontrollfliegen zwischen $28 \pm 3\%$ und $33 \pm 1\%$, vergleichbar zu der Ethanoltoleranz der experimentellen Fliegen, die eine Toleranz von $31 \pm 1\%$ entwickeln (Abb. 3.9 B). Die experimentelle Gruppe zeigte keinen signifikant unterschiedlichen Verhaltensphänotyp im Vergleich zu den Kontrollgruppen.

Nach Überexpression des dSERT in einem Großteil der Neuronen gibt es keine messbaren Veränderungen der 5HT Konzentration in Fliegenköpfen der Kontrollgruppen mit $0,062 \pm 0,2$ pg/ μ g bis $0,098 \pm 0,3$ pg/ μ g im Vergleich zu der experimentellen Gruppe mit $0,086 \pm 0,1$ pg/ μ g 5HT pro Kopf (Abb. 3.10).

Theoretisch sollte die Überexpression von dSERT zu einer Reduktion von 5HT im synaptischen Spalt führen. Da keine von wt abweichender Phänotyp beobachtet werden konnte, stellt sich die Frage, ob der dSERT tatsächlich funktionell überexprimiert wird. Die Versuche, die die Funktionalität des *uas-sert³⁴* Konstruktes belegen, stehen noch aus.

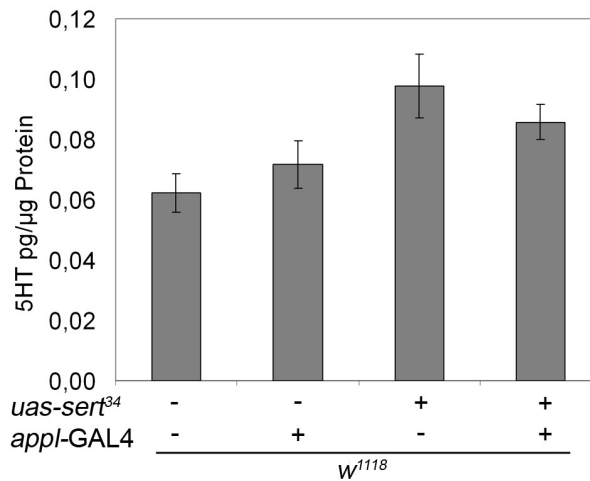


Abb. 3.10.: **Neuronale Expression von dSERT verändert die 5HT Konzentration nicht.** Fliegenköpfe wurden homogenisiert, um mit einem ELISA, sowie mit einem Bradford-Test die 5HT Konzentration *pg* pro μg Protein pro Kopf zu bestimmen. Werte der Kontrollgruppen liegen zwischen $0,062 \pm 0,2 \text{ pg}/\mu g$ und $0,098 \pm 0,3 \text{ pg}/\mu g$ 5HT, während die experimentelle Gruppe pro Kopf $0,086 \pm 0,1 \text{ pg}/\mu g$ 5HT aufweist. Der 5HT Wert der experimentellen Gruppe unterscheidet sich nicht signifikant von den 5HT Werten der Kontrollgruppen ($n=6$).

3.1.5. Die Expression eines putativ dominant negativen dSERT Konstruktes in einem Großteil der Neuronen verändert Ethanol sensitivität und Toleranz nicht

Der Effekt einer verlängerten 5HT Signaltransduktion auf ethanolinduziertes Verhalten soll untersucht werden.

Die Deletion des SERT in Mäusen bewirkt eine Erhöhung der 5HT Syntheserate von 30-60% und gleichzeitig eine Reduktion von 5HT (55-70%) im Gewebe verschiedener Gehirnregionen (KIM et al. 2005).

In Ratten konnte durch Substitutionsexperimente mit Aminosäuren gezeigt werden, dass fünf Aminosäuren wichtig für die Funktionalität des rSERT sind (Androutsellis-Theotokis et al., 2002). Zwei dieser Aminosäuren sollten im dSERT ebenfalls ausgetauscht werden. Da der *Drosophila* SERT im Vergleich zum Menschen und zu anderen Spezies stark konserviert ist, konnten die für den SERT der Ratte wichtige Aminosäuren auch in *Drosophila* bestimmt

und ausgetauscht werden. Dabei handelt es sich um die Aminosäuren Nummer 138 Histidin und 140 Cystein.

Beide Aminosäuren wurden mit Linker PCR verändert. Ein sense, sowie ein anti-sense Primer wurden hergestellt, die genau an dieser Stelle eine XbaI Schnittstelle haben. Mit diesen Primern und den T7 bzw. T3 Primern, die im pBII-KS-Vektor binden, wurde jeweils ein Stück des dSERTs, der im pBII-KS-Vektor sitzt, mit PCR amplifiziert. Diese zwei mit PCR amplifizierten Stücke wurden daraufhin in einen pBII-KS-Vektor kloniert. Da die XbaI Schnittstelle sechs Nukleotide zählt und damit nur zwei nebeneinander liegende Aminosäuren ausgetauscht werden, wurden zusätzlich noch drei weitere Nukleotide verändert. Mit dieser Methode werden statt zwei Aminosäuren drei verändert. Der Reihenfolge nach handelt es sich um Histidin, Arginin und Cystein, die verändert werden in Tyrosin, Serin und Arginin. Dies sollte dazu führen, dass die ursprüngliche Funktion der Aminosäuren ausgeschaltet ist und damit auch die Aktivität des dSERT.

Anschließend wurde der mutierte Transporter in einen UAS-Vektor hinter die kodierende Sequenz des *gfp* Gens gebracht, um ein inaktives GFP-dSERT (dSERTdn) Protein herzustellen. Dieses Protein wurde in allen Neuronen mit Hilfe der *appl*-GAL4 Linie überexprimiert. Nach Überexpression des *uas-sert*^{DN} mit *appl*-GAL4 sollte der inaktive dSERTdn im *Drosophila* Gehirn gegenüber dem intakten wildtypischen dSERT überwiegen. Das hat zur Folge, dass 5HT nicht mehr effektiv aus dem synaptischen Spalt aufgenommen werden kann. Diese Fliegen wurden im Inebriometer auf ihre Fähigkeit Ethanol sensitivität und Toleranz zu entwickeln untersucht.

Zunächst wurde das *uas-sert*^{DN15} Konstrukt für die Experimente verwendet. Die MET1 $16 \pm 0,4$ min - $21 \pm 0,7$ min und MET2 $24 \pm 0,1$ min - $29 \pm 0,1$ min der Kontrollgruppen sind von der MET1 ($16 \pm 0,3$ min) sowie der MET2 ($23 \pm 0,5$ min) der experimentellen Gruppe nicht signifikant verschieden (Abb. 3.11).

Obwohl keine signifikanten Unterschiede im Bezug auf Ethanol sensitivität und Toleranz zu sehen sind, wurden veränderte 5HT Konzentrationen in den Köpfen der Fliegen gemessen, die heterozygot bzw. homozygot für das *uas-sert*^{DN15} Konstrukt sind (Abb. 3.13). Es ist möglich, dass das Konstrukt auch ohne Treiberlinie den inaktiven dSERT exprimiert. Des Weiteren kann die Insertion des *uas-sert*^{DN15} auch in eine genomische Region erfolgt sein, die einen Einfluss auf 5HT Konzentrationen hat. (Abb. 3.13).

Weil die 5HT Konzentration durch den Insertionsort des Konstruktes beeinflusst sein könnte, wurde der ganze Versuch mit einer zweiten *uas-sert*^{DN} Linie wiederholt, deren P-Element

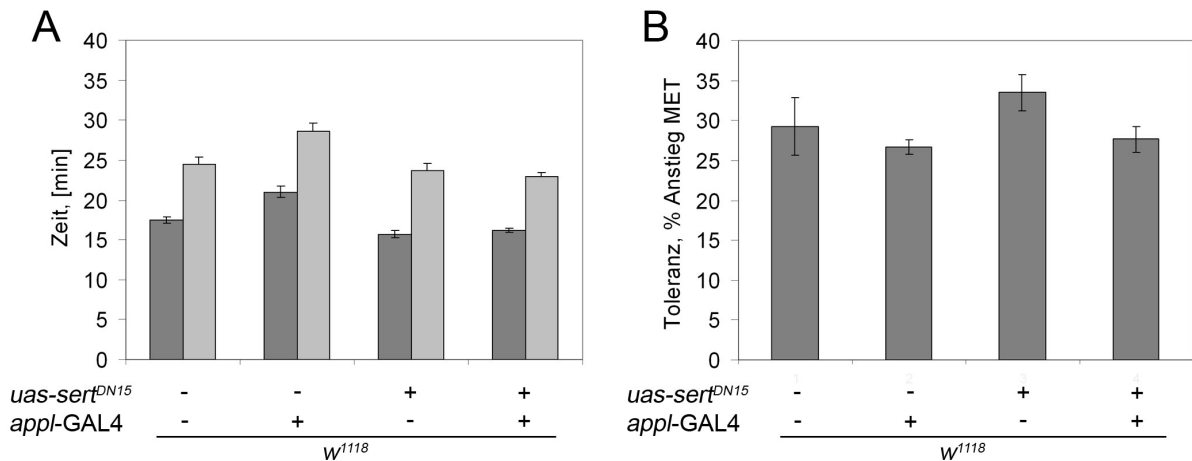


Abb. 3.11.: Expression von SERTdn(15) mit einem panneuronalen GAL4 Treiber verändert die Ethansensitivität und Toleranz nicht. In Fliegen wurde der dominant negative dSERT(15) panneural mit der GAL4 Treiberlinie *appl-GAL4* exprimiert. Fliegen der Kontrollgruppen (MET1 15-21 min (dunkelgrau) und MET2 23-28 min (hellgrau)) unterscheiden sich nicht signifikant von der MET1 (16 min) und MET2 (23 min) der experimentellen Fliegen (n=8)(A). Auch die Ethanol toleranz wird nicht von der panneuronalen Expression des SERTdn(15) in Neuronen beeinflusst (B). Die Ethanol toleranz der Kontrollgruppen liegt zwischen 26% und 33% und die der experimentellen Fliegen liegt bei 29% (genaue Werte in Tabelle A.5, Anhang).

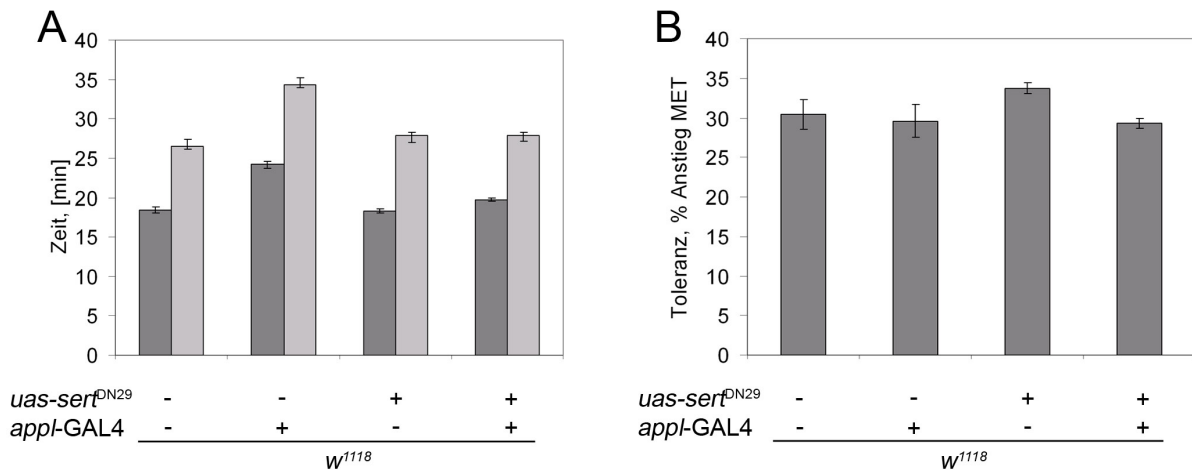


Abb. 3.12.: Die panneurale Expression des *uas-sert*^{DN29} Konstruktes mit *appl-GAL4* beeinflusst weder die Ethanol sensitivität noch die Toleranz. In Fliegen wurde der SERTdn (29) panneural mit der GAL4 Treiberlinie *appl-GAL4* exprimiert. Kontrollgruppen mit MET1 18 ± 0,4 min - 24 ± 0,2 (dunkelgrau) und MET2 26 ± 0,8 min - 34 ± 0,4 min (hellgrau) unterscheiden sich nicht signifikant von der MET1 (20 ± 0,2 min) und MET2 (28 ± 0,4 min) der experimentellen Fliegen (n=12)(A). Die Ethanol toleranz der Kontrollgruppen liegt zwischen 29 ± 0,7% und 33 ± 0,2% und die der experimentellen Fliegen liegt bei 29 ± 0,7% (genaue Werte in Tabelle A.6, Anhang). Auch die Ethanol toleranz wird nicht von der Überexpression des *uas-sert*^{DN29} Konstruktes in Neuronen beeinflusst.

an einem anderen Ort inseriert ist. Es handelt sich dabei um die Linie *uas-sert*^{DN29}. Kontrollfliegen entwickelten wt Sensitivität und Toleranz (MET1 18 ± 0,4 min - 24 ± 0,2 min, MET2 26 ± 0,8 min - 34 ± 0,4 min, Toleranz 29 ± 0,7% - 33 ± 0,2%) vergleichbar zu den experimentellen Fliegen (MET1 20 ± 0,2 min, MET2 28 ± 0,4 min, Toleranz 29 ± 0,7%)(Abb. 3.12). Expression des *uas-sert*^{DN29} Konstruktes in allen Neuronen führt demnach zu keiner Veränderung der Sensitivität oder Toleranz.

Um zu überprüfen, ob die Expression des *uas-sert*^{DN15} Konstruktes 5HT Konzentrationen im Gehirn der Fliege verändert, wurden diese mit Hilfe eines ELISAs bestimmt. Wie bereits erwähnt weist die Linie mit dem *uas-sert*^{DN15} Konstrukt ungetrieben mit 0,139 ± 0,03 pg/μg eine erhöhte 5HT Konzentration auf (Abb. 3.13). Dieser Wert ist signifikant verschieden von den Kontrollen *w*¹¹¹⁸ und *w*¹¹¹⁸, *appl-GAL4*/+, unterscheidet sich jedoch nicht signifikant von den heterozygoten *w*¹¹¹⁸, +/+ , *uas-sert*^{DN15}/+ Fliegen.

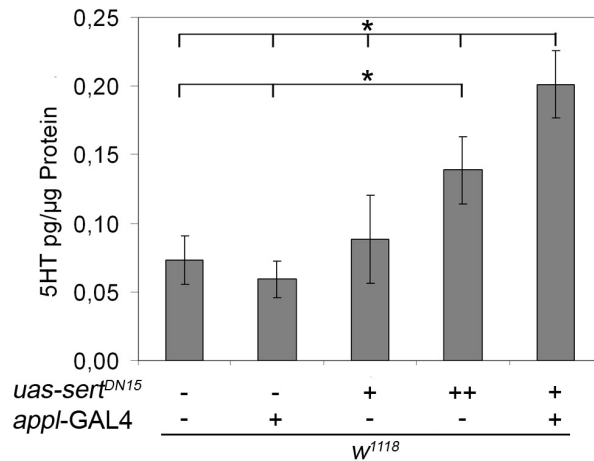


Abb. 3.13.: **Überexpression von *uas-sert*^{DN15} in Neuronen erhöht die 5HT Konzentrationen in Fliegenköpfen.** Ein ELISA wurde zur Bestimmung der 5HT Konzentrationen in Fliegen nach Überexpression eines *uas-sert*^{DN15} Konstruktes verwendet. In den Kontrollen befanden sich zwischen $0,059 \pm 0,02 \text{ pg}/\mu\text{g}$ und $0,088 \pm 0,05 \text{ pg}/\mu\text{g}$ 5HT. Die für das *uas-sert*^{DN15} Reporter Gen homozygoten Fliegen zeigen erhöhte 5HT Konzentrationen ($0,0139 \pm 0,03 \text{ pg}/\mu\text{g}$). Wenn man dieses Konstrukt mit *appl-GAL4* exprimiert erhöhen sich die 5HT Konzentrationen auf $0,201 \pm 0,3 \text{ pg}/\mu\text{g}$. Die homozygote *uas-sert*^{DN15} Fliegenlinie hat signifikant erhöhte 5HT Konzentrationen im Vergleich zu den Kontrollgruppen *w*¹¹¹⁸ ($p = 0,004$) und *w*¹¹¹⁸, *appl-GAL4*/+ ($p = 5,4E - 4$), nicht aber im Vergleich zu *w*¹¹¹⁸, *uas-sert*^{DN15}/+ Fliegen, während die experimentelle Gruppe signifikant erhöhte 5HT Konzentrationen gegenüber allen Kontrollgruppen zeigt (p-Werte von links nach rechts $p = 2,4E - 5$; $p = 4,7E - 6$; $p = 6,7E - 4$; $p = 0,010$)(n=6). Ein T-Test wurde angewandt und der α -Wert Bonferroni korrigiert (n=4).

Die Überexpression dieses Kontruktes mit Hilfe der *appl*-GAL4 Treiberlinie erhöht die 5HT Konzentration auf $0,201 \pm 0,3 \text{ pg}/\mu\text{g}$. Dieser Wert ist signifikant verschieden im Vergleich zu allen Kontrollgruppen, bei denen die Werte zwischen $0,059 \pm 0,02 \text{ pg}/\mu\text{g}$ und $0,139 \pm 0,03 \text{ pg}/\mu\text{g}$ liegen.

Die Insertion des *uas-sert*^{DN29} Konstruktes führt nicht zu einer Erhöhung von 5HT Konzentrationen, was nahe legt, dass der Insertionsort des *uas-sert*^{DN15} Konstruktes eine Veränderung der 5HT Konzentrationen herbeiführen könnte. Wird das *uas-sert*^{DN29} mit *appl*-GAL4 exprimiert sind die 5HT Konzentrationen in den Fliegenköpfen erhöht (Abb. 3.14). Gezeigt werden konnte, dass diese Konzentrationserhöhung keinen Einfluss auf die Ethanol sensitivität bzw. Toleranz hat (Abb. 3.12).

Die 5HT Konzentrationen in den Köpfen der *w*¹¹¹⁸, *appl*-GAL4/*uas-sert*^{DN29} Fliegen war ebenfalls signifikant erhöht gegenüber den Kontrollfliegen (Abb. 3.12). Auch diese Erhöhung hat keinen Einfluss auf die Entwicklung von Ethanol sensitivität oder Ethanol toleranz (siehe auch Abb. 3.1).

Wird *uas-sert*^{DN29} in Neuronen überexprimiert, erhöht sich die 5HT Konzentration in den Fliegenköpfen. Entsprechend könnte das Konstrukt funktional sein und die erhöhten 5HT Konzentrationen die Folge der inhibierten Wiederaufnahme von 5HT in die Präsynapse sein. Wenn kein 5HT in die Synapse transportiert wird, führt dies voraussichtlich zu einer erhöhten 5HT Synthese, um die 5HT Signaltransduktion weiterhin aufrecht zu erhalten. Um die Funktionalität des *uas-sert*^{DN29} Konstruktes zu untermauern, wäre es sinnvoll das Konstrukt in Zellkultur zu testen. Außerdem müsste geklärt werden, welche Gehirnregion der Fliege von der Erhöhung der 5HT Konzentrationen betroffen sind. Vermutlich sind die Konzentrationen in den serotonergen Zellen bzw. Vesikeln erhöht, was jedoch keinen Einfluss auf die 5HT Signaltransduktion haben muss. Das könnte ein Grund für die *wt* Ethanol sensitivität bzw. Toleranz dieser Fliegen sein.

3.1.6. Inhibition der Neurotransmitter Ausschüttung während der Entwicklung in einer Untergruppe von serotonergen und dopaminergen Neuronen beeinflusst weder Ethanol sensitivität noch Toleranz

Das Ziel dieses Experimentes ist es, die 5HT Signaltransduktion zu verändern, indem man die 5HT Ausschüttung von serotonergen Neuronen inhibiert. Um zu bestimmen, ob die 5HT

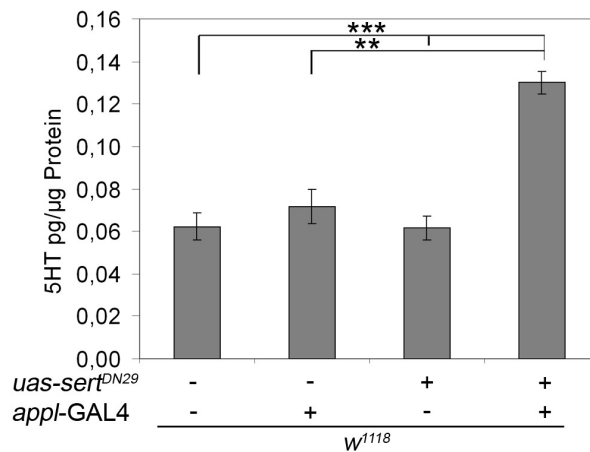


Abb. 3.14.: 5HT Konzentrationen sind erhöht bei Überexpression von *uas-sert*^{DN29} in der Mehrzahl der Neuronen. Ein ELISA wurde zur Bestimmung der 5HT Konzentrationen in Fliegen nach Überexpression eines *uas-sert*^{DN29} Konstruktes verwendet. In den Kontrollen befanden sich zwischen $0,062 \pm 0,02 \text{ pg}/\mu\text{g}$ und $0,072 \pm 0,02 \text{ pg}/\mu\text{g}$ 5HT. Die experimentelle Gruppe hat signifikant erhöhte 5HT Konzentrationen $0,130 \pm 0,01 \text{ pg}/\mu\text{g}$ gegenüber den Kontrollgruppen (p-Werte von links nach rechts, $p = 2,4E - 5$; $p = 2,4E - 4$, $p = 1,3E - 5$) (n=6). Ein T-Test wurde angewandt und der α -Wert wurde Bonferroni korrigiert.

Sekretion von 5HT positiven Neuronen einen Einfluss auf Ethanol sensitivität oder Toleranz hat wurde eine GAL4 Linie mit einem Genfragment der Dopamin Decarboxylase (*ddc*), die *ddc*-GAL4 Treiberlinie, (LI et al. 2000) verwendet. Diese Treiberlinie erlaubt die Expression von *uas*-Transgenen in serotonergen und dopaminergen Neuronen. In diesem Fall wird das Transgen *uas-tnt* exprimiert, wobei *tnt* für Tetanus Toxin (TNT) steht. TNT verhindert die Verschmelzung der Neurotransmitter Vesikel mit der Synapsenmembran (SWEENEY et al. 1995).

Expression von TNT in serotonergen und dopaminergen Neuronen mit Hilfe der *ddc*-GAL4 Linie verändert Ethanol sensitivität und Toleranz nicht. Das deutet darauf hin, dass die Neurotransmitterausschüttung der, von der GAL4 Linien angesprochenen, serotonergen und dopaminergen Neuronen keine wesentliche Rolle bei der Entwicklung von Ethanol sensitivität und Toleranz spielt.

Es bleibt die Frage, ob es weitere von der *ddc*-GAL4 Linie nicht getriebene serotonerge bzw. dopaminerge Neurone gibt, in denen die Neurotransmission nicht inhibiert wurde.

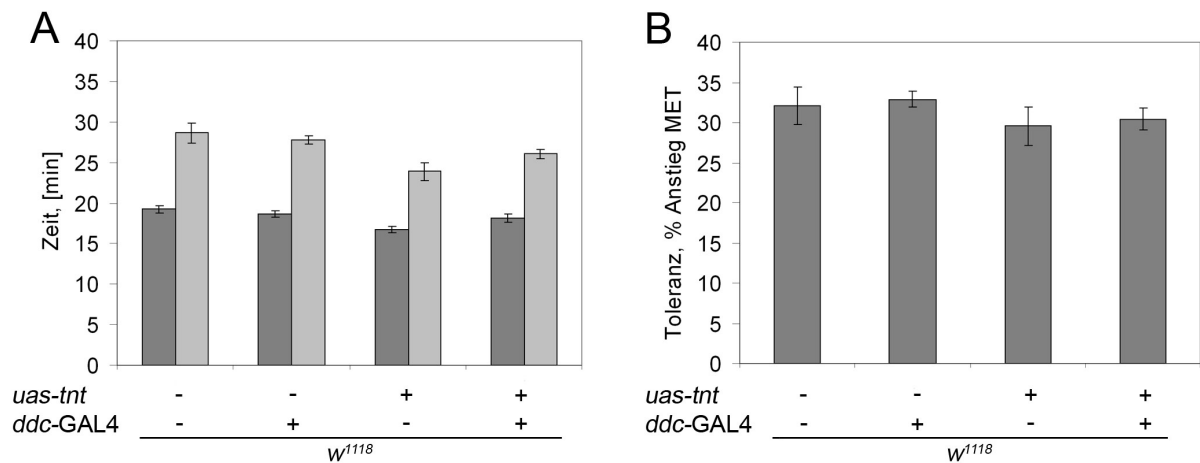


Abb. 3.15.: Inhibition von serotonergen und dopaminergen Neuronen mit Hilfe der *ddc-GAL4* Linie und Expression eines *uas-tnt* Transgenes beeinflusst weder die Ethanolsensitivität noch die Ethanoltoleranz. Die Neurotransmission in serotonergen und dopaminerge Neuronen wurden mit einem *uas-tnt* Reporter Gen inhibiert. Männliche Fliegen der experimentellen Gruppe, sowie Kontrollgruppen wurden im Inebriometer auf Ethanolsensitivität untersucht (A). MET1 (dunkelgrau) der Kontrollgruppen ($17 \pm 0,4$ min - $19 \pm 0,4$ min) unterscheidet sich nicht von dem MET1 Wert der experimentellen Gruppe ($18 \pm 0,5$ min). Dasselbe gilt für MET2 (hellgrau), die für die Kontrollen zwischen 24 ± 1 min und 29 ± 1 min liegt und für die experimentellen Fliegen bei $26 \pm 0,6$ min (A)(n=7-10). Auch die Ethanoltoleranz der Kontrolltiere ($30 \pm 2\%$ - $33 \pm 1\%$) ist nicht signifikant verschieden von der Toleranz der experimentellen Tiere mit $30 \pm 1\%$ (B) (Werte in Tabelle A.7, Anhang).

Außerdem sollte in unserem Fall nur die 5HT Signaltransduktion manipuliert werden und nicht die dopaminerge Signaltransduktion. Deshalb wurde im Folgenden eine für serotonerge Neuronen spezifische GAL4 Linie verwendet.

3.1.7. Inhibition der 5HT Ausschüttung während der Entwicklung in einer Untergruppe von serotonergen Neuronen erhöht die Ethanol sensitivität

Zur Identifizierung von GAL4 Treiberlinien, die es ermöglichen 5HT in verschiedenen Gruppen von serotonergen Neuronen zu inhibieren, wurde die Expression einer putativ serotonerge *sert*-GAL4 Treiberlinie untersucht (siehe auch Ergebnisteil 3.2).

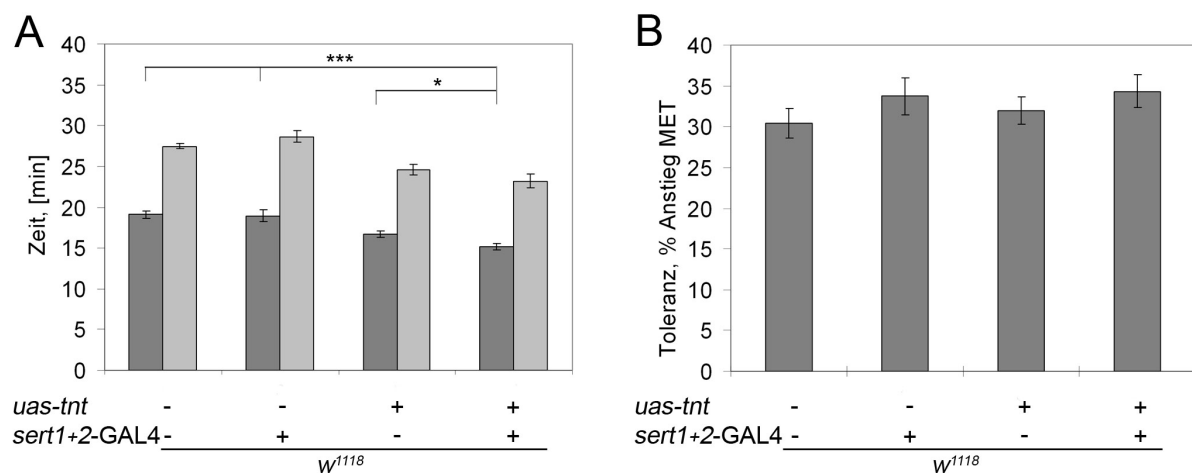


Abb. 3.16.: Inhibition einer Untergruppe von serotonergen Neuronen erhöht die Ethanol sensitivität. Mit Hilfe der *sert1+2-GAL4* Treiberlinie wurde in 46% aller serotonerger Neurone unter Verwendung eines *uas-tnt* Transgens die Neurotransmitterausschüttung unterbunden. Diese Fliegen wurden im Inebriometer auf Ethanol sensitivität und Toleranz getestet. In A ist die MET1 und MET2 zu sehen. Die MET1 (dunkelgrau) der Kontrolltiere mit $17 \pm 0,5$ min - $19 \pm 0,4$ min ist signifikant verschieden im Vergleich zu den experimentellen Fliegen mit $15 \pm 0,4$ min (A) (p -Werte von links nach rechts, $p = 1,4E - 6$; $p = 9,7E - 5$; $p = 8,9E - 3$)($n=11-12$). Die MET2 (hellgrau) der Kontrollgruppen ($25 \pm 0,6$ min - $29 \pm 0,7$ min) unterscheidet sich nicht signifikant von der MET2 der experimentellen Gruppe $23 \pm 0,8$ min. In Abbildung B ist die Toleranz der untersuchten Fliegen gezeigt. Die Ethanol toleranz der Kontrollgruppen ($30 \pm 2\%$ - $34 \pm 2\%$) unterscheidet sich nicht signifikant von den experimentellen Fliegen mit $34 \pm 2\%$ (B) (genaue Werte in Tabelle A.8, Anhang). Ein T-Test wurde angewandt und der α -Wert wurde Bonferroni korrigiert.

Inhibition der Neurotransmission mit Hilfe der *sert1+2*-GAL4 Linie in ca. 46% aller serotonerger Neurone führt zu einem Anstieg der Ethanol sensitivität. Die MET1 der Kontrolltiere ist mit $17 \pm 0,5$ min - $19 \pm 0,4$ min verschieden von der MET1 der experimentellen Tiere mit $15 \pm 0,4$ min. Die MET2 und die Ethanol toleranz der Kontrollgruppen ($25 \pm 0,6$ min - $29 \pm 0,7$ min und $30 \pm 2\%$ - $34 \pm 2\%$) sind nicht signifikant verschieden von der MET2 ($23 \pm 0,8$ min) und der Ethanol toleranz ($34 \pm 2\%$) der experimentellen Tiere (Abb. 3.16).

Dieses Ergebnis zeigt, dass die Inhibition von 46% der serotonerger Neurone eine erhöhte Ethanol sensitivität verursacht. Die vollständige Inhibition dieser Neurone mit *uas-kir2.1* sollte ebenfalls auf Ethanol sensitivität und Toleranz getestet werden (HARDIE 2004). *Kir2.1* kodiert für einen einwärts gerichteten Kaliumkanal, der - wenn exprimiert in Zellen von *Drosophila* - die Erregbarkeit dieser Zellen verhindert, während TNT nur die Vesikelausschüttung unterbindet. Leider sind die *sert*-GAL4 Fliegen, die mit *uas-kir2.1* gekreuzt wurden, lethal.

3.1.8. Überexpression des dSERTs während der Entwicklung in einer Untergruppe von serotonerger Neuronen beeinflusst weder Ethanol sensitivität noch Ethanol toleranz

Die Inhibition der vesikulären 5HT Neurotransmitter Ausschüttung in ca. 46% der serotonerger Neurone führt zu einem Anstieg der Ethanol sensitivität. Als nächstes sollte untersucht werden, ob weniger 5HT im synaptischen Spalt einen ähnlichen Verhaltensphänotyp hervorruft.

Die Überexpression des dSERT in ca. 46% der serotonerger Neurone soll die serotonerge Signaltransduktion verkürzen. Hierfür wurde die *sert1+2*-GAL4 Linie mit der *uas-sert*³⁴ Linie verkreuzt und die Fliegen wurden im Inebriometer auf Ethanol sensitivität und Toleranz getestet. Die MET1 ($20 \pm 0,7$ min - $21 \pm 0,8$ min) und MET2 ($27 \pm 0,8$ min - 29 ± 1 min) der Kontrollfliegen unterscheidet sich nicht signifikant von der MET1 ($19 \pm 0,8$ min) und MET2 ($27 \pm 0,9$ min) der *sert1+2*-GAL4; *uas-sert*³⁴/+ Fliegen. Auch die Ethanol toleranz mit $24 \pm 2\%$ - $33 \pm 1\%$ für die Kontrollfliegen und $28 \pm 4\%$ für die experimentellen Fliegen ist nicht signifikant verschieden. Die Überexpression des dSERT in einer Untergruppe von serotonerger Neuronen beeinflusst weder die Ethanol sensitivität noch die Toleranz (Abb. 3.17).

Die Überexpression von *uas-sert*³⁴ in ca. 46% der serotonerger Neurone sollte zu einer Reduktion der 5HT Signaltransduktion führen. Eventuell ist die Reduzierung der serotonerger

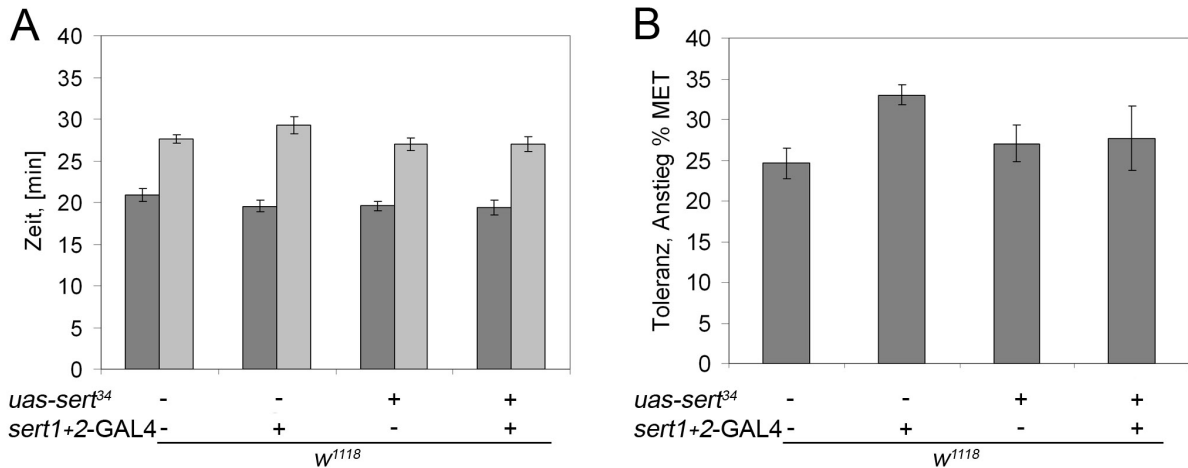


Abb. 3.17.: **Überexpression des dSERT in einer Untergruppe von serotonergen Neuronen hat keinen Einfluss auf Ethanolsensitivität oder Toleranz.** Mit Hilfe der *sert1+2-GAL4* Treiberlinie wurde in 46% aller serotonergen Neurone unter Verwendung eines *uas-sert* Transgens der dSERT überexprimiert. Diese Fliegen wurden im Inebriometer auf Ethanolsensitivität und Toleranz getestet. In A ist die MET1 und MET2 zu sehen. Die MET1 (dunkelgrau) der Kontrolltiere mit $20 \pm 0,7$ min - $21 \pm 0,8$ min ist nicht signifikant reduziert im Vergleich zu den experimentellen Fliegen, $19 \pm 0,8$ min (A)(n=5-8). Die MET2 (hellgrau) der Kontrollgruppen ($27 \pm 0,8$ min - 29 ± 1 min) ist nicht signifikant verschieden von der MET2 der experimentellen Gruppe ($27 \pm 0,9$ min). In Abbildung B ist die Toleranz der untersuchten Fliegen gezeigt. Auch die Ethanoltoleranz der Kontrollgruppen ($24 \pm 2\%$ - $33 \pm 1\%$) unterscheidet sich nicht signifikant von der Ethanoltoleranz der experimentellen Fliegen mit $28 \pm 4\%$ (B) (genaue Werte in Tabelle A.9, Anhang).

Neurotransmission unzureichend, um die Ethanol sensitivität zu beeinflussen. Auch hier sollte die Überexpression in 100% der serotonergen Neurone erfolgen, um den Einfluss auf die 5HT Signaltransduktion zu verstärken.

3.1.9. Inhibition der Neurotransmitterausschüttung mit einer 5HT1b Rezeptor GAL4 Linie beeinflusst die Ethanol sensitivität und die Toleranz

Zur Manipulation der 5HT Neurotransmission wurden weitere putativ 5HT positive GAL4 Linien untersucht; in diesem Fall eine 5HT1b Rezeptor GAL4 Treiberlinie.

Die hier vorgestellte *5htr1b*-GAL4 Treiberlinie exprimiert *uas-mCD8gfp* auf serotonergen, dopaminergen sowie zwei unbekanntenen Neuronen (siehe, Ergebnisteil 3.2). Wird mit der *5htr1b*-GAL4 Linie *uas-tnt* exprimiert, sieht man eine stark erhöhte Ethanol sensitivität und eine reduzierte Ethanol toleranz (Abb. 3.18 A/B). Die MET1 der Kontrolltiere beträgt 19 ± 1 min - 23 ± 1 min, die MET1 der experimentellen Fliegen dagegen liegt bei 13 ± 1 min und ist signifikant reduziert. (Abb. 3.18 A). Die MET2 (hellgrau) der Kontrollgruppen beträgt 25 ± 1 min - 28 ± 1 min während die MET2 der experimentellen Gruppe nur 14 ± 1 min beträgt. In Abbildung 3.18 B ist die Toleranz der untersuchten Fliegen gezeigt. Die Ethanol toleranz der Kontrollgruppen liegt zwischen $16 \pm 1\%$ und $26 \pm 3\%$, während die der experimentellen Fliegen mit $9 \pm 2\%$ ($p < 0,01$) signifikant reduziert ist. Fliegen dieser Kreuzung fallen 10 min früher durch die Säule im Vergleich zu den Kontrollkreuzungen. Entsprechend werden diese Fliegen nur 10 min statt 20 min dem Alkoholdampf ausgesetzt. Da die Entwicklung von Ethanol toleranz dosisabhängig ist (SCHOLZ et al. 2000) wurden alle Fliegen für 10 min bzw. 20 min unter kontrollierten Bedingungen begast und dann im Inebriometer auf die MET2 hin getestet.

Experimentelle Fliegen zeigen eine stark erhöhte Reduktion ihrer Ethanol toleranz (Abb. 3.19 A/B). Die Kontrollfliegen die im Vorfeld 10 min oder 20 min mit Ethanol begast werden, zeigen eine MET2 die zwischen $21 \pm 0,4$ min und 26 ± 1 min liegt, was bedeutet, dass die Ethanol toleranzentwicklung dieser Fliegen relativ stabil ist. Im Gegensatz dazu entwickeln die experimentellen Fliegen unabhängig von der Ethanol dosis eine reduzierte Ethanol toleranz. Nach 10 min Begasung fallen die Fliegen beim zweiten Durchlauf nach 13 ± 1 min durch die Säule und nach 20 min. Begasung im ersten Durchlauf zeigen die Fliegen eine MET2 von nur $11 \pm 0,8$ min.

Die Ergebnisse zeigen, dass die Neurotransmitterausschüttung in diesem Satz von Neuronen

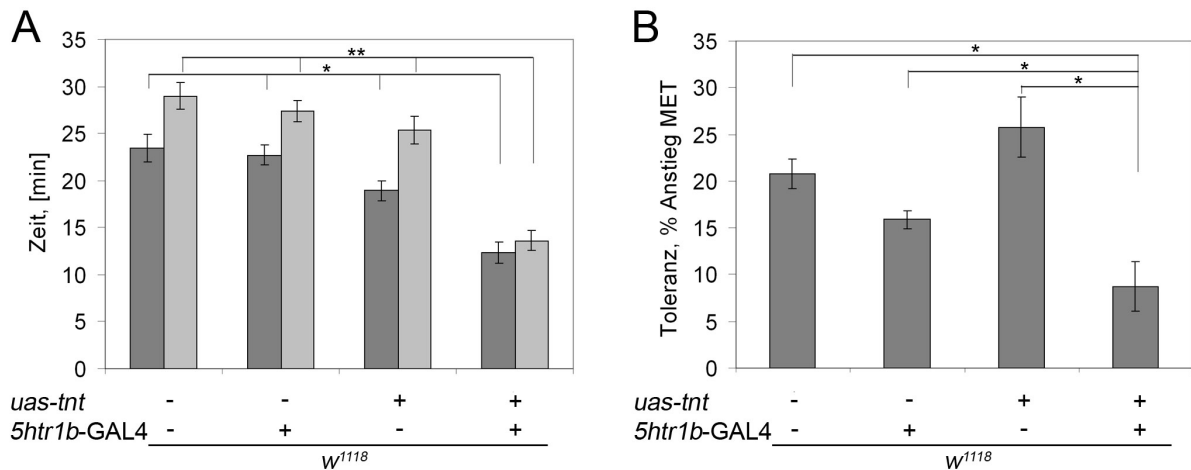


Abb. 3.18.: **Inhibition der Neurotransmitter Vesikelausschüttung in serotonergen und dopaminergen Neuronen mit einer *5htr1b*-GAL4 Linie erhöht die Ethanolsensitivität und reduziert die Toleranz.** In A ist die MET1 und MET2 zu sehen. Die MET1 (dunkelgrau) der Kontrolltiere liegt zwischen 19 ± 1 min - 23 ± 1 min, während die MET1 der experimentellen Fliegen mit 13 ± 1 min signifikant reduziert ist (p-Werte von links nach rechts $p = 2,7E - 4$; $p = 0,002$; $p = 5,1E - 5$)(A) (n=6-8). Die MET2 (hellgrau) der Kontrollgruppen beträgt 25 ± 1 min - 28 ± 1 min und ist ebenfalls signifikant unterschiedlich zu der experimentellen Gruppe mit 14 ± 1 min (p-Werte von links nach rechts $p = 1,2E - 5$; $p = 1,4E - 4$; $p = 6,5E - 6$)(A). In Abbildung B ist die Toleranz der untersuchten Fliegen gezeigt. Die Ethanoltoleranz der Kontrollgruppen liegt zwischen ($16 \pm 1\%$ - $26 \pm 3\%$), während die der experimentellen Fliegen signifikant reduziert ist mit $9 \pm 2\%$ (B: p-Werte von links nach rechts $p = 0,009$; $p = 0,007$; $p = 0,015$) (B) (genaue Werte in Tabelle A.10, Anhang). Ein T-Test wurde angewandt und für α -Werte die Bonferroni Korrektur.

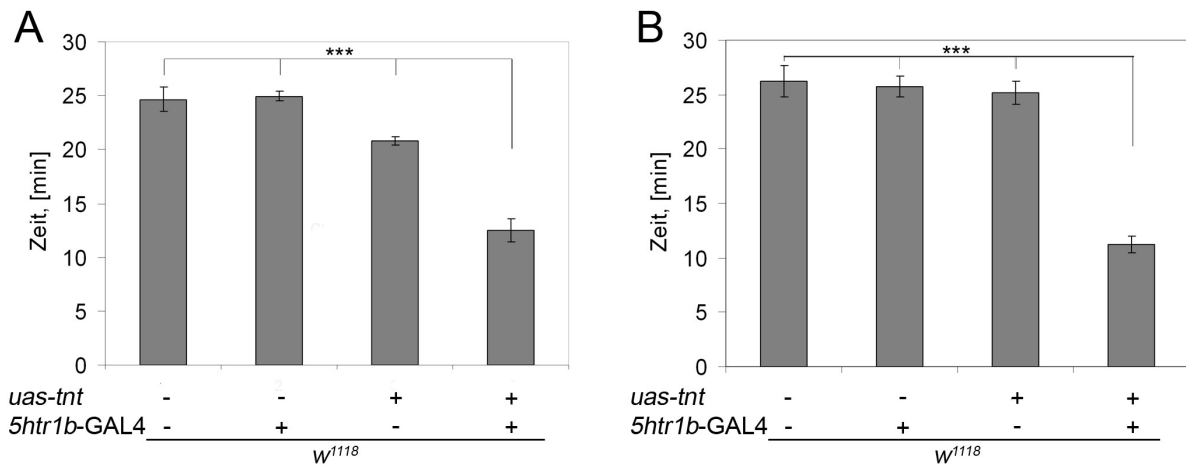


Abb. 3.19.: Die Reduktion der Ethanoltoleranz in der experimentellen Gruppe hängt nicht von der Ethandosis ab. Männliche Fliegen in denen ein *uas-tnt* Reporter Gen mit der *5htr1b-GAL4* Linie getrieben wird, werden im Inebriometer auf Ethanoltoleranz getestet. Bevor diese Fliegen im Inebriometer getestet werden, werden sie kontrolliert mit Ethanol begast. Zum einen für 10 min (A) und zum anderen für 20 min (B). Die MET2 (dunkelgrau) der Kontrollen mit $21 \pm 0,4$ min - $25 \pm 0,5$ min nach 10 min Ethanolbegasung und 25 ± 1 min - 26 ± 1 min nach 20 min Begasung ist relativ stabil. Die MET2 der experimentellen Fliegen dagegen ist nach 10 min und 20 min jeweils reduziert auf 13 ± 1 min bzw. $11 \pm 0,8$ min (A: p-Werte von links nach rechts $p = 4,7E - 6$; $p = 6,7E - 7$; $p = 8,6E - 6$; B:p-Werte von links nach rechts $p = 2,2E - 7$; $p = 2,4E - 8$; $p = 3,8E - 8$)(n=6-8) (genaue Werte in Tabelle A.11 und A.12, Anhang). Ein T-Test wurde angewandt und für α -Werte die Bonferroni Korrektur.

sowohl für die Entwicklung von Ethanol sensitivität als auch für die Toleranzentwicklung wichtig ist.

3.1.10. Eine Gruppe von Dopamin positiven Neuronen vermittelt Ethanol sensitivität, nicht aber Toleranz

Da die *5htr1b*-GAL4 Linie in serotonergen und dopaminergen Neuronen exprimiert, sollte untersucht werden, ob ausschließlich Dopamin wichtig für die Entwicklung von Ethanol sensitivität und/oder Toleranz ist. Die wt Ethanol sensitivität bzw. Toleranz, die man in Fliegen beobachtet, die TNT in DDC Neuronen exprimieren, legt nahe, dass die dopaminergen Neurone der *ddc*-GAL4 Linie nicht an der Ethanol sensitivitäts, bzw. Toleranzentwicklung beteiligt sind. Eine weitere dopaminerge GAL4 Linie ist die *th*-GAL4 Linie, die spezifisch für dopaminerge Neurone ist (Friggi-Grelin et al., 2002).

Zusätzlich sollte eingegrenzt werden, welche Neurone der *5htr1b*-GAL4 Linie wichtig für Ethanol sensitivität bzw. Toleranz sind. Deshalb wurde im nächsten Schritt die Neurotransmission einer Untergruppe von dopaminergen Neuronen inhibiert und die Fliegen hinsichtlich ihres ethanolinduzierten Verhaltens untersucht.

Die MET1 der Kontrolltiere ist $16 \pm 0,6$ min - $20 \pm 0,7$ min während die experimentellen Fliegen schon nach $12 \pm 0,5$ min aus der Säule fallen. Auch die MET2 der Kontrolltiere mit $23 \pm 0,6$ min - $29 \pm 1,5$ min ist signifikant unterschiedlich zu den Fliegen mit inhibierten dopaminergen Neuronen mit $17 \pm 0,6$ min. Die Ethanol toleranz ist nicht signifikant verschieden, jedoch ist eine Tendenz zu reduzierter Ethanol toleranz der experimentellen Fliegen mit $26 \pm 2\%$ im Gegensatz zu den Kontrolltieren mit $31 \pm 2\%$ - $34 \pm 3\%$ zu sehen (Abb. 20) (p-Werte von links nach rechts im Vergleich zu den experimentellen Tieren $p = 0,061$; $p = 0,013$; $p = 0,047$).

Interessant ist, dass die *ddc*-GAL4 Linie, die ebenfalls in dopaminergen und zusätzlich noch in serotonergen Neuronen GAL4 exprimiert, nach Inhibition dieser Neuronen kein Verhaltensphänotyp in den Säulen zeigt. Demnach schließt die Expression der *th*-GAL4 Linie vermutlich eine andere Gruppe von dopaminergen Neuronen ein als die *ddc*-GAL4 Linie, oder die Stärke der Expression dieser Linien unterscheidet sich.

Um dies zu überprüfen, sollte die *ddc*-GAL4 Linie und die *th*-GAL4 Linie immunhistologisch charakterisiert werden. Wichtig wäre es, die Anzahl und Lokalisation der betroffenen Neurone in adulten *Drosophila* Gehirnen zu bestimmen. Die Gruppe von dopaminergen Neuronen, in

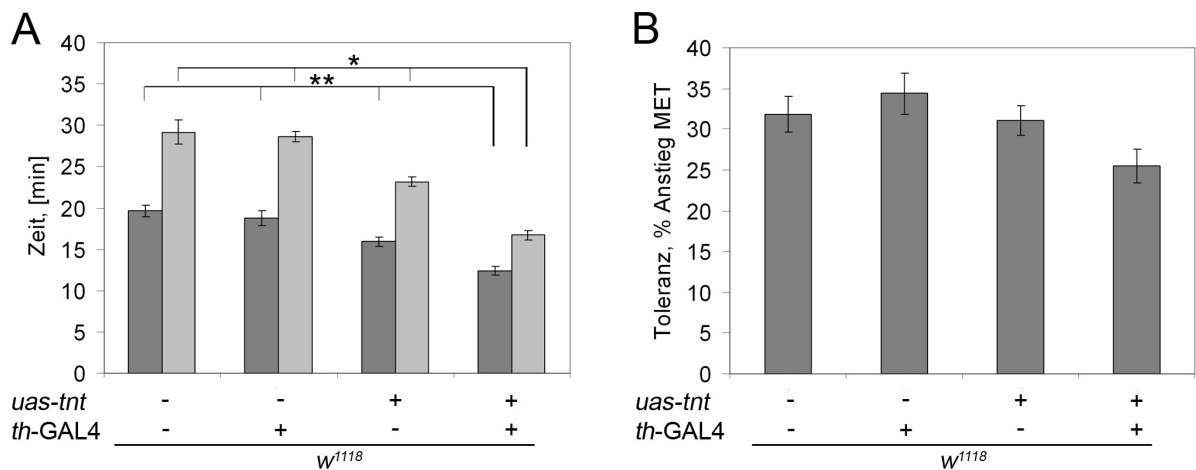


Abb. 3.20.: Eine Gruppe von Dopamin positiven Neuronen vermittelt Ethanolsensitivität.

Männliche Fliegen, in denen *uas-tnt* mit der *th-GAL4* Linie getrieben wird, werden im Inebriometer auf Ethanolsensitivität, sowie Ethanoltoleranz getestet. In A ist die MET1 und MET2 zu sehen. Die MET1 (dunkelgrau) der Kontrolltieren mit $16 \pm 0,6$ min - $20 \pm 0,7$ min ist signifikant verschieden im Vergleich zu den experimentellen Fliegen ($12 \pm 0,5$ min)(A) (p-Werte von links nach rechts $p = 1,5E - 8$; $p = 2,5E - 6$; $p = 7,4E - 5$)(n=12). Die MET2 (hellgrau) der Kontrollgruppen ($23 \pm 0,6$ min - $29 \pm 1,5$ min) unterscheidet sich ebenfalls signifikant von der MET2 der experimentellen Gruppe mit $17 \pm 0,6$ min (p-Werte von links nach rechts $p = 5E - 8$; $p = 3,2E - 12$; $p = 0,003$). In Abbildung B ist die Toleranz der untersuchten Fliegen gezeigt. Die Ethanoltoleranz der Kontrollgruppen ($31 \pm 2\%$ - $34 \pm 3\%$) unterscheidet sich nicht signifikant von den experimentellen Fliegen mit $26 \pm 2\%$ (B) (Werte in Tabelle A.13, Anhang). Der T-Test wurde angewandt und für den α -Wert die Bonferroni Korrektur.

denen GAL4 mit Hilfe der *th*-GAL4 Linie exprimiert wird, ist involviert in die Entwicklung von Ethanol sensitivität und vermittelt eine leicht reduzierte Ethanol toleranz. Als nächstes sollte das Expressionsmuster dieser *th*-GAL4 Linie mit dem Expressionsmuster der *5htr1b*-GAL4 Linie verglichen werden. Ziel ist es zu bestimmen, welche Neurone und welche neuronalen Schaltkreise die Entwicklung von Ethanol sensitivität und Ethanol toleranz beeinflussen.

3.2. Identifizierung von serotonergen und dopaminergen Neuronen im adulten Gehirn von *Drosophila melanogaster* und Charakterisierung von zwei putativ serotonergen GAL4 Treiberlinien *sert1+2*-GAL4 und *5htr1b*-GAL4

Im zweiten Teil sollen die Expressionsdomänen der beiden GAL4 Treiberlinien *sert1+2*-GAL4 sowie der *5htr1b*-GAL4 Linie untersucht werden. Zunächst wurde die Expression der Neurotransmitter Serotonin und Dopamin näher untersucht.

Es folgt der Vergleich der Expression von serotonergen Zellgruppen mit den Neuronen der *sert1+2*-GAL4 Linie und der Vergleich der Expression von serotonergen und dopaminergen Neuronen mit den Neuronen der *5htr1b*-GAL4 Linie.

3.2.1. Bestimmung der serotonergen Neurone im adulten Gehirn von *Drosophila melanogaster*

Die ersten serotonergen Neurone treten in der Embryogenese im Stadium 16/17 auf, wenn die Entwicklung des Ventralganglions fast abgeschlossen ist (LUNDELL und HIRSH 1994). In der Larve gibt es insgesamt 84 serotonerge Neurone. Davon befinden sich 32 in den larvalen Gehirnhälften (VALLES und WHITE 1988). Die larvalen 5HT Neurone bleiben im adulten Gehirn erhalten, werden aber um strukturiert. Zusätzlich entstehen zwei neue Neuronengruppen, welche die optischen Loben innervieren: LP2a/b. Im adulten Gehirn gibt es insgesamt 106 5HT positive Zellen, davon sind 31 im Zentralgehirn lokalisiert (VALLES und WHITE 1988) (Übersicht siehe Abb. 3.21 A und Tabelle 3.1).

15 Fliegengehirne von *sert1+2*-GAL4,*uas-mCD8GFP* transgenen Fliegen wurden bezüglich 5HT positiver Zellen untersucht. Die Fliegengehirne wurden mit einem Antikörper für 5HT

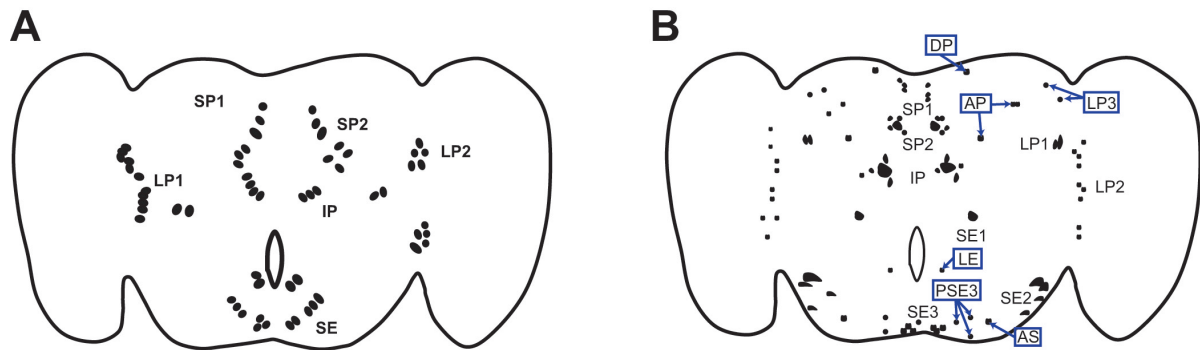


Abb. 3.21.: Schemazeichnung von serotonergen Zellgruppen im *Drosophila* Gehirn. In (A) ist eine Übersichtszeichnung von serotonergen Neuronen zu sehen, wie von Vallés und White (1988) beschrieben. Die Abkürzungen sind in Tabelle 3.1 näher erklärt. In (B) ist schematisch die 5HT Expression von 15 *sert1+2-GAL4, uas-mCD8GFP* Fliegengehirnen zusammen gefasst. Zusätzlich zu den von Vallés und White beschriebenen Neuronen konnten sechs Neuronengruppen identifiziert werden. In der Schemazeichnung wurde die Lokalisation der Somata berücksichtigt. Bei den neuen Neuronengruppen handelt es sich pro Gehirnhälfte jeweils um: drei Neurone im anterioren Protocerebrum (AP), ein Neuron im anterioren subösophageal Ganglion (AS), ein Neuron anterior und lateral zum Ösophagus (LE), ein Neuron im dorsalen Protocerebrum (DP), drei Neurone posterior gelegen zu SE3 (PSE3), und zwei Neurone dorsal von LP1 (LP3) (blaue Rahmen und siehe Tabelle 3.1).

Tab. 3.1.: Anzahl und Lokalisation von serotonergen Neuronen im ZNS von adulten *Drosophila*, im Vergleich zu den GFP positiven und 5HT positiven Neuronen der *sert1+2-GAL4*, *uas-mCD8gfp* Fliegen.

Gruppe	Neuronen pro Gehirnhälfte					Lokalisation Zellgruppen
	Vallés	5HT AK		sert1+2-GAL4		
	n=kA	wm	slide	wm	slide	
	n=15	n=1	n=13	n=1		
SE1	2	1	1	1	1	Lateral zum Ösophagus Foramen
SE2	3	4	2	2	2	Posterior, lateral zum subösophageal Ganglion
SE3	3	3	3	2	3	Posterior zum subösophageal Gangl. nahe Mittellinie
LP1	2	2	2	2	2	Lateral zum PC neben optischen Loben
LP2	8-10	9	9	5	11	Ventrolateral zum PC, in optischem Pedunkel
SP1	3	3	3	1	3	Anterior zum medialen PC, frontale Rinde
SP2	4	4	4	2	2	Anterior zum medialen PC, posterior SP1
IP	3-4	7	3	3	4	Inferior zum medialen PC
AP		3		1		Anterior im PC
AS		1		1	1	Anterior im subösophageal Ganglion
LE		1				Anterior und lateral zum Ösophagus Foramen
DP		1	1		1	Dorsal im PC
PSE3		3			2	Posterior zu SE3, klein
LP3		2	1			Dorsal zu LP1, klein
PI				2		Pars Intercerebralis

Abkürzungen: 5HT AK = 5HT Antikörper; kA = keine Angabe; *sert1+2-GAL4* = Expression *sert1+2-GAL4*, *uas-mCD8gfp* transgener Fliegen; *wm* = *whole-mounts*; *slide* = Objektträger mit Gefrierschnitten; PC = Protocerebrum.

und GFP gefärbt (Abb. 3.22). Zunächst wurde ausschließlich von serotonergen Neuronen die Neuroanatomie näher untersucht. Einige neue serotonerge Zellgruppen wurden identifiziert und benannt (Abb. 3.21, Tabelle 3.1). Die neuen Zellgruppen wurden nach ihrer Lokalisation benannt und heißen wie folgt: anterior im Protocerebrum (AP), anterior im subösophageal Ganglion (AS), anterior und lateral zum Ösophagus Foramen (LE), dorsal im Protocerebrum (DP), posterior zu SE3 (PSE3), dorsal zu LP1 (LP3), (Tabelle 3.1). Die Namensgebung orientiert sich an der Nomenklatur von Vallés und White (1988). Das sehr weit anterior im Protocerebrum gelegene AP besteht aus drei kleinen, meist schwach gefärbten Zellen pro Gehirnhälfte. Die Neurone AS, DP und LE stehen für eine Zelle pro Gehirnhälfte. AS und LE liegen anterior im Gehirn, weisen relative kleine Somata auf und sind schwach gefärbt. DP dagegen besitzt ein größeres Soma und zeigt stärkere Färbung. Die Zellgruppe PSE3 liegt posterior von SE3 und besteht aus drei kleinen Zellen pro Gehirnhälfte. LP3 lokalisiert dorsal von LP1 mit zwei kleineren Zellen. Zusammenfassend wurden 44 Neurone pro Gehirnhälfte identifiziert. Es wurden drei neue serotonerge Zellgruppen und drei einzelne neue Neurone pro Gehirnhälfte identifiziert. Dabei handelt es sich um insgesamt elf Neurone (Abb. 3.21, Tabelle 3.1). Die 5-HT positiven Neurone, die Färbung in *whole-mounts* zeigen, wurden in Gefrierschnitten untersucht. Eine weitgehende Übereinstimmung ist zu sehen. Zellen die sehr weit anterior liegen, sind in Schnitten schwer zu erfassen, da die ersten und letzten Schnitte oft eine schlechtere Qualität aufweisen. Trotzdem sind einige der hier als neu vorgestellten Neurone auf Gefrierschnitten gefärbt und zwar AS, DP und zwei Neurone der PSE3 Gruppe.

3.2.2. Die *sert1+2*-GAL4 Treiberlinie ermöglicht die Expression von *uas*-Transgenen in 40 serotonergen Neuronen im adulten Gehirn

Die *sert1+2*-GAL4 Treiberlinie wurde hergestellt, um *uas*-Transgene speziell in serotonergen Neuronen zu exprimieren. Zur Bestimmung der GAL4 Expressionsdomäne dieser Linie wurde die Expression eines *uas-mCD8gfp* Reporter Gens (LEE und LUO 1999) unter der Kontrolle der *sert1+2*-GAL4 Linie 209 in *whole-mounts* von adulten *Drosophila* Gehirnen untersucht. Gleichzeitig wurde in diesen Gehirnen die Expression von 5HT mit Hilfe von immunohistologischen Methoden sichtbar gemacht und mit der GFP Expression kolokalisiert.

Die Auswertung von 13 *whole-mounts* von *sert1+2*-GAL4, *uas-mCD8gfp* transgenen Fliegen lässt darauf schließen, dass die *sert1+2*-GAL4 Linie GFP in 20 serotonergen Neuronen pro Gehirnhälfte und 1-2 nicht serotonergen Neuronen im Pars Intercerebralis (PI) exprimiert (Abb. 3.22, Tabelle 3.1). Dabei ist es nicht auszuschließen, dass die *uas-mCD8gfp* Linie

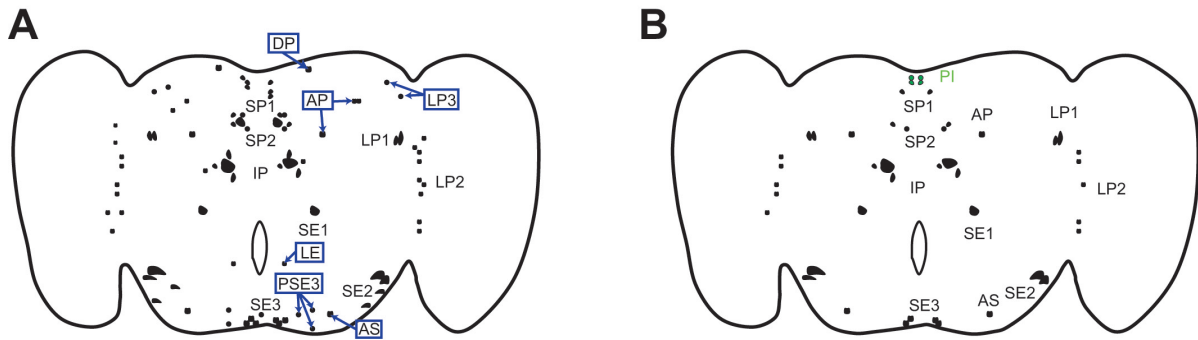


Abb. 3.22.: Schemazeichnung des Expressionsmusters der *sert1+2-GAL4* Linie (B). Zum Vergleich ist die schematische Darstellung von wildtypischen serotonergen Neuronen gezeigt (A). In B sind in der gleichen Darstellung die Neurone, welche in den transgenen *sert1+2-GAL4, uas-mCD8gfp* Fliegen GFP exprimieren dargestellt. Zusätzlich wurde GFP in zwei nicht serotonergen Neuronen (hier in grün dargestellt) im PI gesehen. Im Protocerebrum werden sieben serotonerge Neurone angefärbt, die sich auf die Zellgruppen SP1, SP2, IP und AP aufteilen. Die Zellgruppen in der Nähe der optischen Loben LP1 und LP2 zeigen GAL4 Expression in jeweils zwei und fünf Neuronen. Im subösophagealen Bereich des Gehirns sind weitere sechs Neurone der Zellgruppen SE1, SE2, SE3 und das AS Neuron angefärbt.

ungetrieben Expression in PI Zellen zeigt. Diese Kontrolle fehlt jedoch. Die *sert1+2-GAL4* Linie exprimiert in ca. der Hälfte der serotonergen Neurone GAL4 und somit GFP.

Im Protocerebrum werden sieben 5HT positive Neurone angefärbt, die sich auf die Zellgruppen SP1, SP2, IP aufteilen, sowie das Neuron AS einschliessen. Die Zellgruppen entlang der optischen Loben LP1 und LP2 sind mit jeweils zwei und fünf Neuronen pro Gehirnhälfte gefärbt, wobei die Zellzahl der LP2 Gruppe variiert. Im subösophagealen Bereich des Gehirns sind weitere sechs Neurone der Zellgruppen SE1, SE2, SE3 und das Neuron AS angefärbt. Zusätzlich werden 1-2 Neuronen im PI der *sert1+2-GAL4* Linie angefärbt, die nicht mit dem 5HT Antikörper zu sehen sind (Abb. 3.22). Die Projektionen dieser *sert1+2-GAL4* Linie sind im subösophagealen Ganglion und seitlich des Ösophagus zu sehen. Die Projektionen seitlich vom Ösophagus reichen bis ins Protocerebrum, wo eine für diese GAL4 Linie spezifische Geweih ähnliche Verzweigung entsteht. Auch der Pilzkörper ist innerviert, wobei diese Innervation häufig nur einseitig zu erkennen ist. Eine Pilzkörperfärbung kann mit dem 5HT Antikörper nicht beobachtet werden. Unwahrscheinlich ist, dass der dSERT auf nicht serotonergen Neuronen, oder Projektionen sitzt, da dies bisher in keinem anderen Modellorganismus beobachtet wurde. Trotzdem müsste die Innervation der Pilzkörper

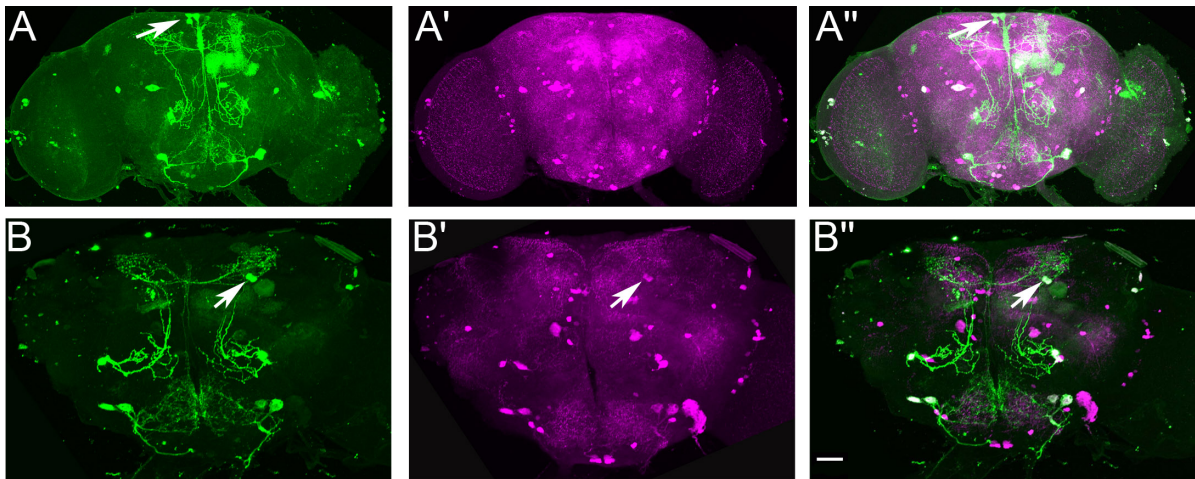


Abb. 3.23.: Die *sert1+2*-GAL4 Treiberlinie exprimiert teilweise in serotonergen Neuronen GFP. Die Kollisionsstudien von 5HT und GFP mit der *sert1+2*-GAL4 Treiberlinie gekreuzt mit *uas-mCD8gfp* transgenen Fliegen sind hier gezeigt. In A und B sind exemplarisch zwei Gehirne der *sert1+2*-GAL4 Linie gezeigt, die mit GFP (grün) gefärbt sind. In der rechten Gehirnhälfte ist die Färbung des Pilzkörpers in beiden Gehirnen zu sehen (A und B). Diese Färbung des Pilzkörpers ist nicht in der Färbung mit einem 5HT Antikörper zu sehen (C und D). Neurone, die 5HT wie auch GFP exprimieren erscheinen in E und F weiß. Fast alle Zellkörper der *sert1+2*-GAL4 Linie überlappen mit serotonergen Zellkörpern. Zusätzlich sind zwei Neurone pro Gehirnhälfte im PI angefärbt (weißer Pfeil) (weißer Balken = 50 = μm)(Färbung Haberberger).

näher untersucht und vor allem die dafür verantwortlichen Neurone bestimmt werden. Wir vermuten, dass zwei serotonerge Zellen, die auf gleicher Höhe und anterior vom Pilzkörper liegen für die Innervation verantwortlich sind. (Abb. 3.23 B, B' und B'', weißer Pfeil).

Würde man die Neurone, die zusätzlich in den Gefrierschnitten gefunden wurden einschließen, würden ca. 33 Zellen pro Gehirnhälfte mit der 5HT-Färbung überlappen. Folglich würde die *sert1+2*-GAL4 Linie in ca. 76% der serotonergen Zellen exprimieren (Abb. 3.24). Die Gefrierschnitte werden, auf Grund einer zu geringen Stichprobengröße jedoch nicht berücksichtigt.

3.2.3. Die *5htr1b*-GAL4 Linie exprimiert in 20 serotonergen Neuronen GFP

Die *5htr1b*-GAL4 Linie enthält ein Promotorelement des *5htr1b* Rezeptor Gens (Herb, 2005). Das *5htr1b* Rezeptor Gen in *Drosophila* ist zu 43% homolog zum *5ht1a* Rezeptorgen

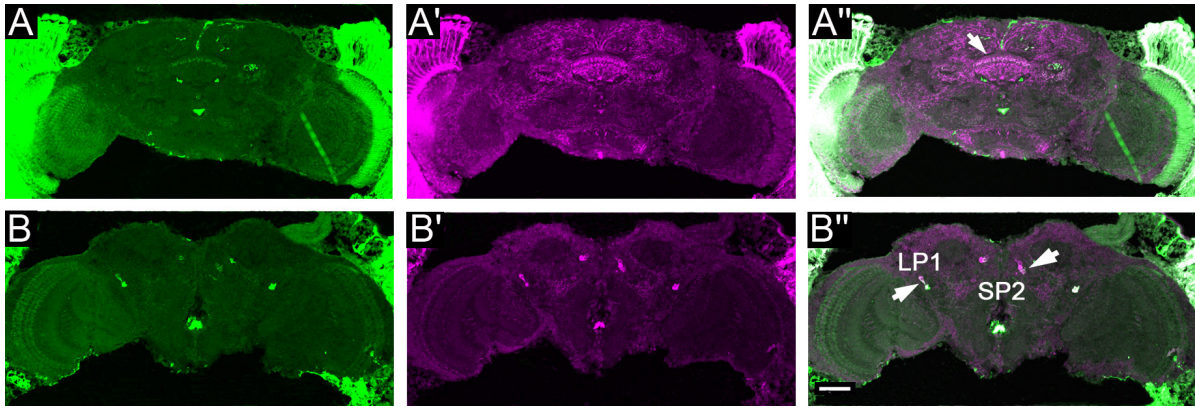


Abb. 3.24.: Die *sert1+2*-GAL4 Treiberlinie exprimiert teilweise in serotonergen Neuronen sowie in serotonergen Strukturen GFP. Kolokalisationsstudien wurden auf Gefrierschnitten von *sert1+2*-GAL4, *uas-mCD8gfp* transgenen Fliegen, mit GFP (grün) und 5HT (magenta) Antikörperfärbung gemacht. In A und B sind exemplarisch zwei Gefrierschnittebenen von einem Gehirn der *sert1+2*-GAL4 Linie gezeigt, die mit GFP gefärbt sind. In A ist der obere Rand des Fächerkörpers gefärbt. Diese Färbung kolokalisiert mit der 5HT Antikörper Färbung (A'', weißer Pfeil). Des Weiteren ist die Kolokalisation der *sert1+2*-GAL4 Expression mit den serotonergen Neuronengruppen LP1 und SP2 zu sehen (B'', weiße Pfeile)(siehe auch Abb. B.4-B.7, Anhang)(weißer Balken 50 = μm).

in Vertebraten. In Vertebraten wird der Rezeptor unter anderen auf serotonergen Neuronen gefunden. Dort reguliert dieser als somatodendritischer Autorezeptor die 5HT Signaltransduktion (NESTLER et al. 2001). Falls der 5HTR1b in *Drosophila* ebenfalls ein Autorezeptor ist, so sollte dieser auf der präsynaptisch Seite von serotonergen Zellen lokalisiert sein.

Die hier charakterisierte *5htr1b*-GAL4 Linie zeigt Expression in 20 serotonergen Neuronen (Tabelle 3.2). Im Protocerebrum sind Neurone der Zellgruppen SP1 (2 Neurone), SP2 (2 Neurone) und IP (3 Neurone) gefärbt. Im Gegensatz zu der *sert1+2*-GAL4 Linie exprimiert die *5htr1b*-GAL4 Linie in einem zusätzlichen Neuron in SP1. Die Zellen der LP1 und LP2 Gruppen sind fast vollständig vorhanden mit zwei von zwei Neuronen in der LP1 Gruppe und acht von neun Neuronen in der LP2 Gruppe. In *5htr1b*-GAL4, *uas-mCD8gfp* Fliegen wird GFP in drei zusätzlichen Neuronen der LP2 Gruppe im Vergleich zu *sert1+2*-GAL4, *uas-mCD8gfp* transgenen Fliegen exprimiert. Im subösophageal Ganglion werden nur drei Neurone angefärbt: das Neuron SE1 und zwei von vier Neuronen in der Zellgruppe SE2. Die *sert1+2*-GAL4 Linie exprimiert ebenfalls in SE1 und in jeweils zwei Neuronen von SE2 und SE3. Auch in der *5htr1b*-GAL4 Linie wurden zwei von drei Neuronen in der SE3

Tab. 3.2.: Anzahl und Lokalisation von serotonergen und unbekanntenen Neuronen von *5htr1b*-GAL4, *uas-mCD8gfp* Fliegen im ZNS von adulten *Drosophila*.

Gruppe	Neuronen pro Gehirnhälfte					Lokalisation Zellgruppen
	5HT AK	<i>5htr1b</i> -GAL4	<i>sert1+2</i> -GAL4			
	<i>wm</i> n=15	<i>wm</i> n= 1-8	slide	<i>wm</i>	slide	
			n=13			
SE1	1	1	1	1	1	Lateral zum Ösophagus Foramen
SE2	4	2	4	2	2	Posterior, lateral zum Subösophageal Ganglion
SE3	3	2	3	2	3	Posterior zum Subösophageal Gangl. nahe Mitte
LP1	2	2		2	2	Lateral zum PC neben optischen Loben
LP2	9	8	11	5	11	Ventrolateral zum PC, in optischem Pedunkel
SP1	3	2	3	1	3	Anterior zum medialen PC, frontale Rinde
SP2	4	2		2	2	Anterior zum medialen PC, posterior SP1
IP	7	3	1	3	4	Inferior zum medialen PC
AP	3			1		Anterior im PC
AS	1		1	1	1	Anterior im Subösophageal Ganglion
LE	1	1				Anterior und lateral zum Ösophagus Foramen
DP	1		1		1	Dorsal im Protocerebrum
PSE3	3	2			2	Posterior zu SE3, klein
LP3	2		1			Dorsal zu LP1, klein
?		1	3			Sehr anterior und lateral zum PC

Abkürzungen: 5HT AK = 5HT Antikörper; *5htr*-GAL4 = Expression *5htr1b*-GAL4, *uas-mCD8gfp* transgener Fliegen; *sert1+2*-GAL4 = Expression *sert1+2*-GAL4, *uas-mCD8gfp* transgener Fliegen; *wm* = *whole-mounts*; slide = Objektträger mit Gefrierschnitten; PC = Protocerebrum.

Zellgruppe gefunden, aber in weniger als drei Gehirnen. Diese Neurone sind in der Tabelle sowie in der Schemazeichnung blau gekennzeichnet. Dabei handelt es sich auch um die subösophagealen Neurone LE mit einem von einem Neuron und PSE3 mit zwei von drei Neuronen. Sehr anterior im Protocerebrum ist ein Neuron zu sehen, das weder serotonerg, noch dopaminerg ist. Diese Zelle wurde nicht benannt (Tabelle 3.2). Keine Expression ist in den Zellgruppen AP und AS zu sehen, obwohl die *sert1+2*-GAL4 Linie in jeweils einem Neuron dieser Zellgruppen Expression zeigt. Ähnlich wie in der *sert1+2*-GAL4 Linie werden in Gefrierschnitten der *5htr1b*-GAL4 Linie mehr Zellen angefärbt (Tabelle 3.2)(siehe auch Abb. B.8, B.9, Anhang).

Zusammenfassend ist zu sagen, dass die *5htr*-GAL4 Linie in Neuronen Expression zeigt, die zu den Zellgruppen: SE1, SE2, LP1, LP2, SP1, SP2, IP gehören (siehe Tabelle 3.2)

(Abb. 3.27 schwarz). Fünf serotonerge Zellen, die in weniger als drei Gehirnen zu sehen waren, gehören zu den Zellgruppen: LE, SE3 und PSE3 (siehe Tabelle 3.2 blau; Abb. 23, dunkelblau). Die Färbung ist vermutlich echt, müsste aber noch mit einer größeren Anzahl von Gehirnen verifiziert werden.

3.2.4. Die *5htr1b*-GAL4 Linie exprimiert in elf dopaminergen Neuronen GFP

Zur Identifizierung weiterer Typen von Neuronen wurde das Expressionsmuster der *5htr1b*-GAL4 Linie mit einem Tyrosinhydroxylase (TH) Antikörper kolokalisiert (Abb. 3.25). Der TH Antikörper färbt dopaminerge Neurone. Dopaminerge Neuronengruppen im ZNS von adulten *Drosophila* wurden bereits beschrieben von Friggi-Grelin et al., (1999), Nässel und Elekes (1992) und Budnik and White, (1988)(FRIGGI-GRELIN et al. 2003; NAESSEL und ELEKES 1992; BUDNIK und WHITE 1988)(Tabelle 3.3).

Um das Expressionsmuster der *5htr1b*-GAL4 Linie mit dem Expressionsmuster von dopaminergen Neuronen vergleichen zu können, wurde zuerst die Expression der TH positiven Neurone untersucht. Insgesamt wurden acht mit TH Antikörper gefärbte Gehirne untersucht, um dopaminerge Neuronen zu charakterisieren.

Zur Bestimmung der TH positiven Zellen wurde die Nomenklatur von Nässel und Elekes (1992) verwendet. Die Autoren untersuchten drei verschiedene Fliegenarten auf das Vorhandensein von TH positiven Zellen: *Calliphora* und *Phormia* zwei Fliegen der Familie der Schmeißfliegen (Calliphoridae) und *Drosophila*. Neuronengruppen dieser Fliegen sind sehr ähnlich und scheinen auch ähnliche Projektionen zu bilden. Die Nomenklatur wurde nach Nässel und Elekes (1992) übernommen (Tabelle 3.3).

Im Vergleich zu den neuroanatomischen Studien von Nässel und Elekes (1992) konnten hier zwei zusätzliche Gruppen von Neuronen, die TH exprimieren identifiziert werden, nämlich ALE1 und ALD1. Eine dieser Neuronengruppen, bestehend aus drei Neuronen, liegt sehr anterior im Fliegenhirn, sowie lateral des Ösophagus. Deshalb wird sie anterior lateral Ösophagus (ALE1) genannt (Abb. 3.26, Tabelle 3.3). Die zweite hier zum ersten Mal identifizierte Neuronengruppe liegt anterior und lateral von D1 und wird deshalb anterior lateral D1 (ALD1) genannt (Abb. 3.26). Diese Neuronengruppe besteht aus vier Neuronen (Tabelle 3.3).

Um die Kolokalisation der *5htr1b*-GAL4 Linie mit dopaminergen Neuronen zu bestimmen, wurden *5htr1b*-GAL4 Fliegen mit *uas-mCD8gfp* Fliegen verkreuzt. *Whole-mounts* wurden

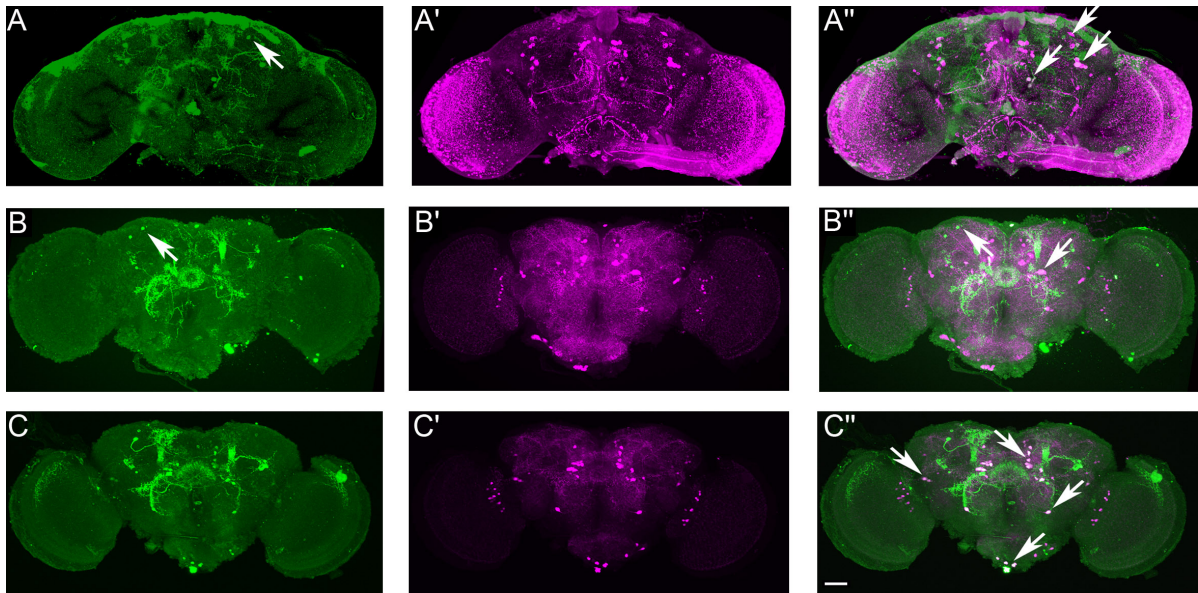


Abb. 3.25.: Die *5htr1b*-GAL4 Linie exprimiert in elf dopaminergen Neuronen GFP. Kollationsstudien wurden in *whole-mounts* von *5htr1b*-GAL4, *uas-mCD8gfp* transgenen Fliegen, mit GFP (grün) und TH (A-A'')(magenta), bzw. 5HT (B-B'' und C-C'')(magenta) Antikörperfärbung gemacht. In A, B und C sind exemplarisch drei *whole-mounts* von *5htr1b*-GAL4, *uas-mCD8gfp* transgenen Fliegen gezeigt, die mit GFP Antikörper und TH Antikörper (A-A'') sowie GFP und 5HT Antikörper (B-B'', C-C'') gefärbt wurden. In A und C sind Teile der Struktur des Fächerkörpers zu sehen. Das *whole mount* in B zeigt Färbung im Ellipsoidkörper und auf den Bildern B und C sind Projektionen seitlich des Ösophagus sowie im Protocerebrum, vermutlich in den α -Loben der Pilzkörper, zu erkennen. A'' zeigt die Kollalisation von dopaminergen und GAL4 exprimierenden Neuronen, wobei die Kollalisation nur schwer zu erkennen ist (A'', gelbe Pfeile). Dasselbe gilt für die Kollalisation der Expression der *5htr1b*-GAL4 Linie, mit serotonergen Neuronen in B''(gelbe Pfeile). Dies liegt an der nicht optimalen Färbung dieser *whole-mounts*. Gut zu sehen ist die Kollalisation von serotonergen Neuronen mit der GAL4 Linie in C''. Die weißen Pfeile in A, A'' und B kennzeichnen Neurone die weder serotonerg, noch dopaminerg sind (Färbung, Haberberger).

Tab. 3.3.: Anzahl und Lokalisation von TH Zellgruppen im ZNS von adulten *Drosophila*.

Gruppe	Neuronen pro Gehirnhälfte						Lokalisation Zellgruppen
	TH AK	Nässel	F.-G.	Monast	5htr1b-GAL4		
	wm n=7	wm n>4	wm n=kA	wm n=kA	wm n=1-8	slide n=1	
PAL1	6	5	4	6	2		Dorsolateral und anterior im PC
PAM1	40-70	<110					Dorsomedial und anterior im PC
PPL1	13	12	6		2	4	Dorsolateral und posterior im PC
PPL2a/b	5	6	4	5	5		Lateral und posterior im PC
PPL2c	2	2					Lateral und posterior im PC
PPM1	1	1			1		Dorsomedial und posterior im PC
PPM2	7	8	5	6	3		Dorsomedial und posterior im PC
PPM3	8	6	5		3		Dorsomedial und posterior im PC
ALD1	4						Anterior und lateral zu D1
D1	3	2			1		Lateral und posterior im Deutocerebrum
T1	1	1			1		Tritocerebrum
SA1	1	1			1		Subösophageal Ganglion (SEG)
SP1/2	2						Subösophageal ganglion (SEG)
SVP1	1	1	1	1	1		Ventrales SEG
VUM1/2	2	2		2	2		Ventrales SEG
ALE	3						Anterior und lateral zum Ösophagus

Abkürzungen: TH AK = Tyrosin Hydroxylase Antikörper; F.-G. = Friggi-Grelin et al., (2002); Monast = Monasterioti et al., (1999); Nässel = Nässel und Elekes, (1992); 5htr1b-GAL4 = Expression 5htr1b-GAL4, *uas-mCD8gfp* transgener Fliegen; *wm* = *whole-mounts*; slide = Objektträger mit Gefrierschnitten; PC = Protocerebrum.

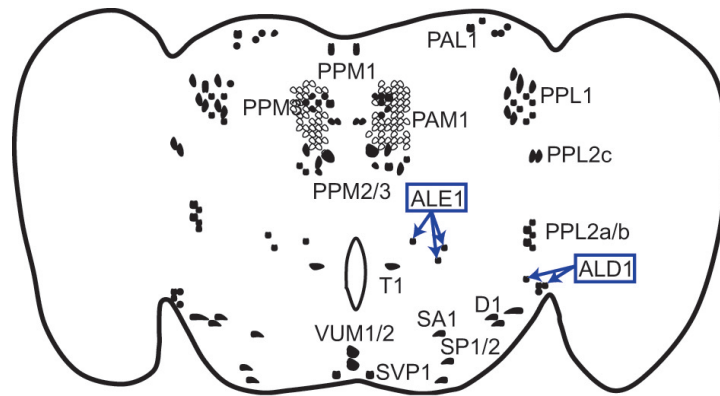


Abb. 3.26.: Schematische Abbildung von dopaminergen Zellgruppen im ZNS von *Drosophila*. *Whole-mounts* wurden mit einem Tyrosin Hydroxylase Antikörper gefärbt. Für die schematische Zeichnung wurden sieben Gehirne ausgewertet. Verwendet wurde die Nomenklatur von Nässel und Elekes (1992). Die neuen Neuronengruppen heißen ALE1 mit drei Neuronen und ALD1 mit vier Neuronen (blaue Boxen; siehe auch Tabelle 3.3)

immunohistologisch mit GFP und TH Antikörpern gefärbt (Abb. 3.25). Insgesamt gibt es Expression in 11 Somata von dopaminergen Neuronen, die zu fünf verschiedenen Neuronengruppen gehören: PAL1, PPL1, PPM2, PPM3 und SVP1 (Abb. 3.27 grün). Neurone, die in weniger als drei Gehirnen gefunden worden gehören zu den Neuronengruppen: PPL2a/b, PPM1, D1, T1, SA1 und VUM1/2 (Abb. 3.27 hellblau). Obwohl die Färbung dieser Neurone echt zu sein scheint, müssten diese Neurone in zusätzlichen *whole-mounts* bestimmt werden.

Für diese schematische Darstellung wurden Kolkalisationsstudien in *whole-mounts* von *5htr1b-GAL4*, *uas-mCD8gfp* transgenen Fliegen verwendet. Insgesamt wurden acht adulte

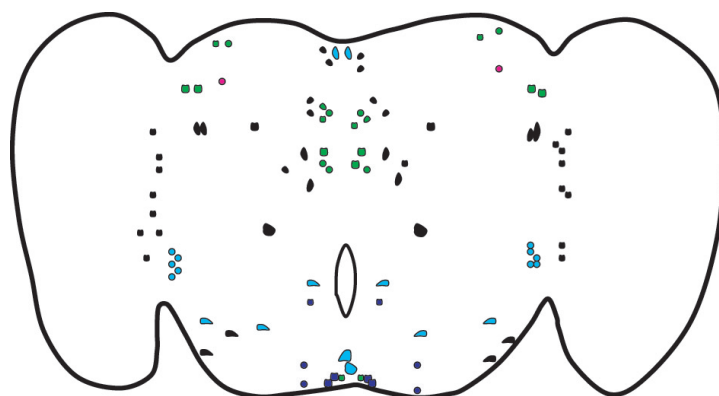


Abb. 3.27.: Übersichtsschema von Neuronen in denen die *5htr1b-GAL4* Linie GFP exprimiert.

Gehirne mit *5htr1b*-GAL4 Expression ausgewertet. Die *5htr1b*-GAL4 Linie exprimiert in 20 serotonergen Neuronen (schwarz dargestellt). Fünf serotonerge Neurone wurden in weniger als drei *whole-mounts* bestimmt und sind deshalb dunkelblau dargestellt. Expression in elf dopaminergen Neuronen ist grün dargestellt, während dopaminerge Neurone die in weniger als drei Gehirnen gefunden wurden hellblau gekennzeichnet sind. Das Neuron, das weder den serotonergen noch den dopaminergen Neuronengruppen zuzuordnen war ist pink dargestellt. Die Ergebnisse der Gefrierschnitte sind nicht in die Schemazeichnung mit einbezogen worden (siehe Tabellen 3.2 und 3.3).

Die *5htr1b*-GAL4 Linie exprimiert in serotonergen, dopaminergen und weder serotonergen noch dopaminergen Neuronen. Der größte Anteil dieser Neuronen besteht aus serotonergen Neuronen. Insgesamt handelt es sich dabei um 20 serotonerge Neurone in sieben unterschiedlichen Neuronengruppen (Abb. 3.27, schwarz dargestellt). Zusätzlich werden insgesamt elf Neuronen von fünf verschiedenen dopaminergen Zellgruppen angefärbt (Abb. 3.27, grün dargestellt). Anterior im Protocerebrum ist eine Zelle angefärbt, die weder serotonerg noch dopaminerg ist (Abb. 3.27, pink dargestellt). Die Neuronen der *5htr1b*-GAL4 Linie zeigen Projektionen in den Ellipsoidkörper, seitlich vom Ösophagus und im Protocerebrum, vermutlich in den α -Loben der Pilzkörper (Abb. 3.25).

3.3. P-Element Mutagenese zur Herstellung einer *dsert* Mutante

Die P-Element Insertionsmutagenese erlaubt das Ausschalten oder Verändern eines Gens wenn das P-Element z. B. in die Promotorregion springt. Dafür wird ein Transposon, welches in der Nähe des Gens von Interesse liegt mit Hilfe einer Transposase mobilisiert und kann sich in umliegende genomische Regionen integrieren. Gezeigt wurde, dass die Wahrscheinlichkeit einer lokalen Insertion des P-Elementes hoch ist (TOWER et al. 1993). Deshalb wurden verschiedene P-Elemente ausgewählt, die sich in der Nähe des *dsert* Gens befinden. Es wurden zwei Mutagenesen mit zwei unterschiedlichen P-Element Insertionen durchgeführt.

Die erste Mutagenese wurde mit dem P-Element P(lacW)*Mov34* durchgeführt.

Dieses P-Element sitzt in dem Gen *Mov34* nur 1,3 kb entfernt vom *dsert* 3'-Ende (Abb.1).

Die Mutagenese mit dem P(lacW)*Mov34* lieferte keine *dsert* Mutante (HERB 2005).

Da die P-Element Insertion im *Mov34* Gen homozygot lethal ist, führt nur ein präzises ausschneiden des P-Elementes zu einer homozygot vitalen Fliege. Oft wird das P-Element

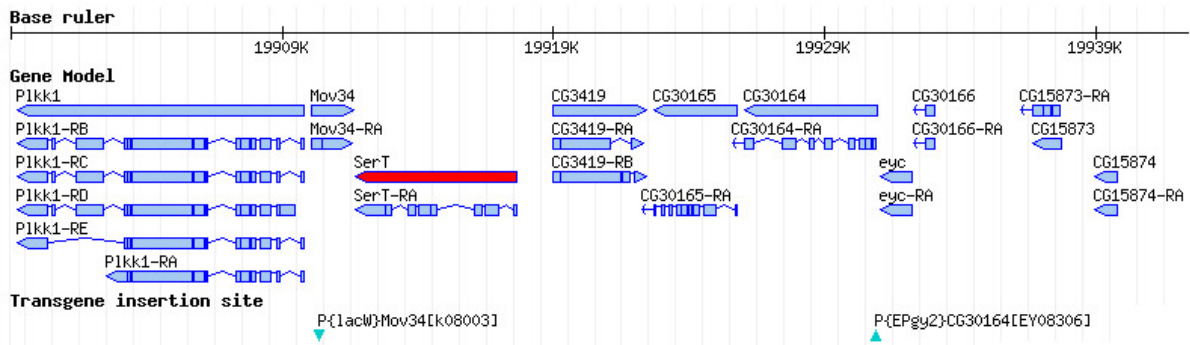


Abb. 3.28.: Die genomische Organisation des *dsert* Gens und seine unmittelbaren Nachbargene. Position der P-Elemente P(lacW)Mov34 und P(EPgy2). Das P-Element P(lacW)Mov34 sitzt im Gen *Mov34* und befindet sich 1,3 kb unterhalb des *dsert* 3'-Endes. Das P-Element P(EPgy2) in *CG30164* befindet sich 12 kb oberhalb des *dsert* 5'-Endes (verändert nach Flybase).

nicht korrekt ausgeschnitten, das heißt angrenzende genomische Regionen werden mit dem P-Element an anderer Stelle in das Genom integriert. Beinhalten diese angrenzenden genomischen Regionen ein Gen, dass Lethalität verursacht wenn es verändert wird, wie das *Mov34* Gen, dann sind diese Fliegen homozygot lethal. Es wurden 34 vitale P-Element Insertionen hergestellt, davon hatten zehn Linien eine Insertion auf dem zweiten Chromosom. Sechs Linien waren auf dem rechten Arm des zweiten Chromosoms lokalisiert und vier auf dem linken Arm. Keine dieser Linien hatte jedoch eine P-Element Insertion im *dsert* Gen.

Weiterhin konnte gezeigt werden, dass P-Elemente meist nicht näher als 10 kb von ihrem Ursprungsort inserieren (PORSCH 2002). Das P-Element im *Mov34* Gen liegt nur 1,3 kb vom *dsert* entfernt. Deshalb wurde ein zweites P-Element P(EPgy2) ausgewählt, welches ca. 12 kb vom *dsert* 5'-Ende entfernt liegt (Abb. 3.28). Dieses P-Element gehört zu den EP Elementen, die für das Berkley Drosophila Genome Project (BDGP) mit dem *yellow+* Gen modifiziert wurde, um unter anderem, die Insertionszahl zu erhöhen (Abb. 3.29 (BELLEN et al. 2004)).

Das *yellow+* Gen soll einerseits die Insertionszahl erhöhen, und ist andererseits weniger anfällig für Positionseffekte. Positionseffekt treten auf, wenn das P-Element in ein Gen inseriert und die Augenfarbe nicht exprimiert wird, weil die Expression des Gens inhibiert wird. Dabei handelt es sich um euchromatische Gene, die sich nach einer Chromosom-Neuordnung, oder einer Transposition in der Nähe von Heterochromatin befinden. Ein weiterer Vorteil dieser

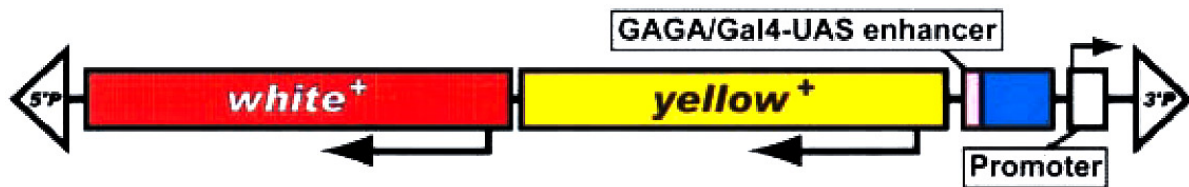


Abb. 3.29.: Das P-Element Konstrukt P(EPgy2). Der *yellow+* Genmarker wurde direkt neben das *mini white+* Gen gesetzt um Positionseffekte zu reduzieren (Bellen et al., 2004).

Tab. 3.4.: Ergebnis der P-Element Mutagenese.

Exp.	Durchsucht	Isoliert	2. Chr.	%	Analysiert	über Def 2605	homozyg. lethal	tot
A	ca. 40000	139	81	58%	65	alle vital	6	10
B	ca. 20000	100	38	38%	34	alle vital	3	1
C	ca. 6000	44	12	27%	7	alle vital	0	5
Total	ca. 66000	238	131	55%	106		9	16

Insertionslinie ist, dass sie nicht homozygot lethal ist.

Drei Ansätze der zweiten P-Element Mutagenese mit je 40000, 20000 und 6000 adulten Fliegen wurden durchgeführt. Insgesamt wurden ca. 65.000 Fliegen nach einer veränderten Augenfarbe durchsucht (Tabelle 3.4). Davon wurde bei 238 eine P-Element Insertion auf Grund der roten Augenfarbe festgestellt. Von diesen Tieren hatten 131 das P-Element auf dem 2. Chromosom. 16 dieser Stämme sind während der Aufbewahrungsphase verstorben. 9 Stämme waren homozygot lethal, weil eine P-Element Insertion vermutlich in ein Letalität verursachendes Gen integriert ist. 106 Fliegenstämme wurden entsprechend analysiert.

Alle Fliegenstämme waren über die Defizienz (2R) PX2/SM5 (60C6-60D3) 2604, die auch den *dsert* betrifft, vital. Demzufolge gibt es keine P-Insertion in der Region der Defizienz 2604, die Lethalität verursacht. Das außerdem keine Insertion im *dsert* vorhanden ist, wurde anschließend bestätigt.

Kürzlich wurde ein Hypomorph des *dsert* Gens hergestellt und molekular genetisch identifiziert. Bei diesem Hypomorph handelt es sich um eine Deletion in der Promotorregion des *dsert* Gens (J. Hirsh, persönliche Kommunikation). Für dieses Hypomorph homozygote Fliegen wurden im Inebriometer auf Ethanol sensitivität und Toleranz getestet.

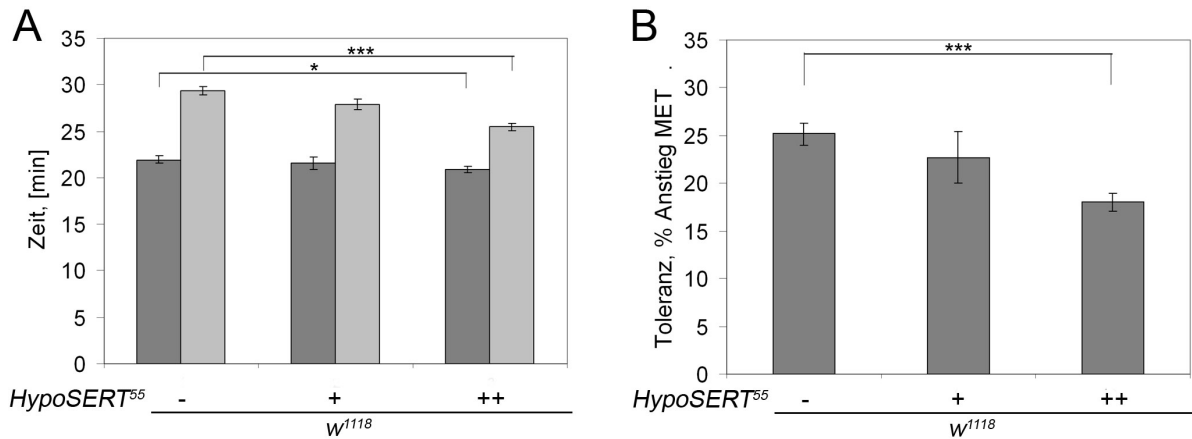


Abb. 3.30.: Ein Hypomorph des *dsert* Gens mit einer Deletion in der Promotorregion beeinflusst die Ethanolsensitivität und die Toleranz. In (A) wird die Ethanolsensitivität der ersten und zweiten Ethanolbehandlung gezeigt. Die MET1 (dunkelgrau) der Kontrollgruppen beträgt $22 \pm 0,4$ min und $22 \pm 0,7$ min und die MET1 der experimentellen Gruppe ist $21 \pm 0,3$ min (A). Die MET2 (hellgrau) der zwei Kontrollen ist $29 \pm 0,5$ min und $28 \pm 0,6$ min. MET1 und MET2 der wildtypischen Fliegen unterschieden sich signifikant von der MET1 ($p = 0,04$) und MET2 ($p = 2,4E - 6$) der experimentellen Tiere ($n=8-12$). Die Ethanoltoleranz der Kontrollgruppe w^{1118} ist signifikant höher als die der homozygot hypomorphen Fliegen $18 \pm 1\%$ ($p = 7,1E - 5$)(B). Im Vergleich dazu liegt die Toleranz der für das Hypomorph heterozygoten Fliegen bei $23 \pm 3\%$ (genaue Werte in Tabelle A.14, Anhang).

Die Kontrollgruppen, w^{1118} Fliegen und heterozygote w^{1118} , $sert^{55}$ Fliegen entwickelten eine MET1 von $22 \pm 0,4$ min und $22 \pm 0,7$ min. Die MET1 der experimentellen Gruppe lag bei $21 \pm 0,3$ min (Abb. 3.30A). Die MET2 der Kontrollgruppen betrug $29 \pm 0,5$ min und $28 \pm 0,6$ min, während die MET2 der für $sert^{55}$ homozygoten Fliegen bei $25 \pm 0,4$ min lag. Die MET1 und MET2 der w^{1118} Fliegen unterschieden sich signifikant von der MET1 und MET2 der experimentellen Gruppe. Die Ethanoltoleranz der Kontrollgruppen betrug $25 \pm 1\%$ und $23 \pm 3\%$ (Abb. 3.30). Die experimentelle Gruppe entwickelt eine Toleranz von $18 \pm 1\%$. Die Ethanoltoleranz der w^{1118} Fliegen war signifikant höher, als die der experimentellen Gruppe. Fliegen, die heterozygot für das Hypomorph sind, zeigten eine ähnliche Ethanolsensitivität wie wildtypische Fliegen und eine etwas, aber nicht signifikant, reduzierte Ethanoltoleranz.

Die Ergebnisse zeigen, dass ein Hypomorph des *dsert* Gens mit einer Deletion in der Promotorregion zu einer erhöhten Ethanolsensitivität und einer reduzierten Toleranz in Fliegen führt. Ähnliche Resultate konnten nach Inhibition des dSERTs mit einem 5HT

Wiederaufnahmehemmer gezeigt werden. Es ist daher anzunehmen, dass die 5HT Signaltransduktion maßgeblich an der Entwicklung von Ethanol sensitivität und Toleranz beteiligt ist.

4. Diskussion

4.1. Pharmakologische Manipulation der 5HT Konzentrationen in *Drosophila*

Die Fütterung der 5HT Vorstufe 5HTP (4 mg/ml), über 24 h führte zu einer Erhöhung der 5HT Konzentrationen in der Fliege. Diese Fliegen zeigten keine Veränderung ihrer Ethanol sensitivität oder Toleranz.

Es stellt sich die Frage, ob die 5HT Konzentration durch die Gabe von 5HTP tatsächlich erhöht wurde. Verschiedene Arbeitsgruppen haben bereits erfolgreich Fliegen mit 5HTP gefüttert.

5HTP wurde für 4-5 Tage gefüttert, indem 5HTP dem Futtermedium zugefügt wurde (VAYSSE et al. 1988). Nach einer Pavlovschen Konditionierung war die Inhibition des Proboscis Reflexes nach 5HTP Fütterung verstärkt.

In einer anderen Studie wurden Fliegen für 24 h mit 4mg/ml 5HTP gefüttert. Dieses Fütterungsprotokoll war ausreichend, um die zirkadiane Rhythmik der Fliegen zu verändern. Erhöhte 5HT Konzentrationen verursachten eine reduzierte Anpassung der Fliegen an die zirkadiane Rhythmik nach einem Lichtpuls. Eine ähnliche Reaktion wurde bei Fliegen die mit den SERT Inhibitoren Fluoxetin und Citalopram gefüttert wurden beobachtet (YUAN et al. 2005). Folglich wurden 5HTP und SERT Inhibitoren bereits erfolgreich in *Drosophila* eingesetzt. Es wurde jedoch nicht gezeigt, ob in den Fliegen die 5HT Konzentrationen verändert sind.

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Fütterung von 5HTP für 24 h die 5HT Konzentrationen in den Köpfen der Fliegen erhöht. Dies hat jedoch keinen Einfluss auf Ethanol sensitivität oder Toleranz. Dabei ist nicht geklärt, wo sich die erhöhten 5HT Konzentrationen im Kopf der Fliege befinden; in den Zellen, in Neurotransmitter Vesikeln oder im extrazellulären Gewebe. Eine Veränderung der 5HT Signaltransduktion könnte mit einer veränderten 5HT Konzentration im synaptischen Spalt einhergehen. Die Messung der 5HT Konzentration im synaptischen Spalt der Fliege ist bis heute noch nicht möglich.

In Ratten konnte mit Hilfe von *in vivo* Mikrodialyse und *ex vivo* HPLC gezeigt werden, dass nach Fütterung von 5HTP extrazelluläre 5HT Konzentrationen erhöht sind (HALLADAY et al. 2006). Gleichzeitig ist die Ethanolaufnahme dieser Tiere reduziert. Gibt man Ratten eine 5HTP Injektion intra peritoneal (i.p.), das heißt in die Bauchhöhle, wird ebenfalls eine Reduktion der Ethanolaufnahme gemessen (ZABIK et al. 1994). Außerdem wird eine konditionierte Geschmacksaversion in Ratten festgestellt. Wird Ratten direkt nach 5HTP Injektion (i.p.) ausschließlich Ethanol als Flüssigkeit zu trinken gegeben, dann verweigern sie diese Flüssigkeit bis der Tod eintritt (ZABIK und ROACHE 1983). Menschen wird 5HTP hauptsächlich gegen Depression und Fettsucht gegeben (CANGIANO et al. 1998; Übersicht, TURNER et al. 2006). Für die Reduzierung der Alkoholaufnahme im Menschen ist der 5HT Agonist 5HTP jedoch nicht geeignet (zum Überblick, TAMBOUR und QUERTEMONT 2007).

Fütterung von p-CPA einem 5HT Syntheseinhibitor reduziert 5HT Konzentrationen, verändert jedoch nicht Ethanol induziertes Verhalten. Fraglich ist, ob durch Füttern von Pharmaka funktionelles 5HT gebildet bzw. reduziert wird und am richtigen Ort einen Effekt ausüben kann.

Nach 4-5 Tagen Fütterung von p-CPA, das dem Futter beigemischt wurde, schneiden Fliegen bei einem Pavlovschen Lernparadigma schlechter ab als Fliegen die mit 5HTP gefüttert wurden (VAYSSE et al. 1988). In dieser Studie wurde gezeigt, dass die Fütterung von p-CPA nach 24 h zu einer Reduktion von 46% der 5HT Konzentration in den Fliegenköpfen führt. Diese Reduktion von 5HT hat jedoch keinen Einfluss auf die Entwicklung von Ethanoltoleranz oder Sensitivität. Allerdings ist die Tendenz einer erhöhten Ethanolsensitivität zu sehen, die jedoch auf Grund einer kleinen Anzahl an Wiederholungen nicht signifikant war. Deshalb sollte p-CPA für 3-4 Tage gefüttert werden, bevor die Fliegen auf Ethanolsensitivität und Toleranz getestet werden.

In Menschen wird Alkoholabhängigkeit unter anderem mit einem Defizit an 5HT Neurotransmission in Verbindung gebracht. Zahlreiche Studien belegen, dass 5HT Syntheseinhibition die Ethanolaufnahme erhöht (GELLER 1973; HILL und GOLDSTEIN 1974; LYNESS und SMITH 1992, Überblick, LeMarquand et al., 1994a). Die Mehrzahl der bisher durchgeführten Studien im Tiermodell ergaben jedoch konträre Ergebnisse, d.h. in 14 Studien trinken die Tiere weniger Ethanol und in sechs Studien bleibt die Ethanolaufnahme unverändert (Überblick, LEMARQUAND et al. 1994). Das kann, unter anderem, an einer konditionierten Geschmacksaversion, hervorgerufen durch die unangenehmen Nebenwirkungen von p-CPA,

die mit dem Konsum von Ethanol assoziiert werden liegen (MYERS und CICERO 1969). Auch wenn die Aufnahme von Ethanol nach p-CPA Gabe nicht notwendiger Weise reduziert ist, konnte im Gehirn von Ratten nach drei Tagen p-CPA Fütterung eine Depletion von 93% 5HT gemessen werden (KOE und WEISSMAN 1966). Dennoch ist nicht sicher, ob dies in Fliegen reproduzierbar ist.

Eine andere Möglichkeit 5HT Konzentrationen zu reduzieren ist, durch Injektion des Neurotoxins 5,7-dihydroxytryptamine (5,7-DHT). Die Injektion von 5,7-DHT in das intracerebrale Ventrikel von Mäusen erhöhte deren Schlaffrequenz und führte zu einem Abfall der Körpertemperatur. Interessanterweise reagierten diese Mäuse auf Ethanol sensitiver als Kontrollmäuse (MELCHIOR und TABAKOFF 1986). Wird Ratten eine einmalige Injektion von 5,7-DHT (200 μ g) in die lateralen Ventrikel gegeben, wird die 5HT Konzentration zu 75% reduziert und die Entwicklung einer Ethanoltoleranz verzögert, was für eine erhöhte Sensitivität nach Ethanoleinfluss sprechen würde. L-Tryptophan dagegen erhöht nach einmaliger oraler Gabe (75mg/kg) 5HT um 39% und erleichtert die Ethanoltoleranzentwicklung (KHANNA et al. 1979). Eine andere Studie konnte hingegen zeigen, dass Ratten, ohne Präferenz für Alkohol, nach 5,7-DHT Gabe erhöhten Alkoholkonsum zeigten und mit HPLC wurden in den meisten Gehirnregionen dieser Ratten post-mortem reduzierte 5HT Konzentrationen gemessen (WANG et al. 1996). Keinen Einfluss auf die Ethanolaufnahme dagegen hatte die Mikroinjektion von 10 g 5,7-DHT in die dorsalen und medianen Raphe Kerne von Ratten, die keine Präferenz für Alkohol zeigten (ADELL und MYERS 1996). Dieses Neurotoxin sollte auch in *Drosophila* angewendet werden, um diese Fliegen anschließend auf Ethanolsensitivität und Toleranz zu testen.

In dieser Arbeit wurde Paroxetin aus einer Reihe von SERT Inhibitoren ausgewählt, weil gezeigt wurde, dass Paroxetin die höchste Affinität zum *Drosophila* SERT hat (DEMCHYSHYN et al. 1994). Im Menschen zeigt Paroxetin jedoch eine geringe Affinität zum hSERT (DEMCHYSHYN et al. 1994). Dagegen hat Fluoxetin, der wohl bekannteste SERT Inhibitor (Prozac), eine ähnlich hohe Affinität für den menschlichen hSERT wie Paroxetin für den dSERT (DEMCHYSHYN et al. 1994). Der SERT Inhibitor Paroxetin (1 mg/ml) wurde, wie die oben beschriebenen Psychopharmaka, ebenfalls 24 h gefüttert. Es konnte gezeigt werden, dass Paroxetin einen Einfluss auf Ethanolsensitivität und Toleranz in *Drosophila* hat. Das Füttern von Paroxetin führt zu einer erhöhten Ethanolsensitivität und einer reduzierten Toleranz. 5HT Konzentrationen in Fliegenköpfen sind nach Paroxetin Gabe jedoch nicht verändert.

Studien in Vertebraten belegen, dass die Inhibition von SERT Bindungsstellen durch SSRIs, die 5HT Signaltransduktion im synaptischen Spalt verlängert. In Ratten wurde nach 15 Tagen mit einer *in vivo* Mikroelektrode die reduzierte 5HT Aufnahme im Hippocampus gemessen. Die 80%ige Reduktion von SERT Bindungsstellen wurde mittels Signalen von Gefrierschnitten gemessen (BENMANSOUR et al. 2002, BENMANSOUR et al. 1999). Die Wirkung von SSRIs führt in Säugetieren unter anderem zu einer reduzierten Ethanolaufnahme (LEJOYEUX 1996; Übersicht, SELLERS et al. 1991). Die reduzierte Ethanolaufnahme wird häufig auf eine geringere Aufnahme von Flüssigkeit und Nahrung zurückgeführt. Tiere und Menschen mit weniger Appetit nehmen auch automatisch weniger Ethanol zu sich (MEERT 1993; HIGGINS et al. 1992; ALVARADO et al. 1990). Dies kann in diesem Experiment ausgeschlossen werden, da die Fliegen mit Ethanoldampf begast wurden.

Eine andere Studie konnte zeigen, dass die Reduzierung der Ethanolaufnahme durch Paroxetin in Mäusen nur kurzzeitig eintrat und schon nach wenigen Tagen eine Toleranz zu diesem Effekt entstand (GULLEY et al. 1995). Es stellt sich die Frage, ob nach Fütterung von Paroxetin über mehrere Tage, das beobachtete ethanolinduzierte Verhalten von Fliegen immer noch messbar ist oder ob eine Toleranz entsteht.

Andererseits konnten Studien in Ratten zeigen, dass SSRIs substituierend für Ethanol wirken. Paroxetin und Fluoxetin substituieren beide die freiwillige Ethanolaufnahme in Ratten. Diese Substitution kann mit einem 5HT_{2a} Rezeptor Antagonist für Fluoxetin, aber nicht für Paroxetin, aufgehoben werden. Die Wirkung von SERT Inhibitoren wird demnach mit einer indirekten Aktivierung von unterschiedlichen 5HT Rezeptorsubtypen in verschiedenen Gehirnregionen assoziiert. Die indirekte Stimulation von 5HT Rezeptoren wird in Zusammenhang mit der stimulierenden Wirkung von Ethanol gebracht. Möglicher Weise gibt es Ähnlichkeiten zwischen den stimulierenden Effekten von SSRIs und Ethanol.

(GARDIER et al. 2003; MAUREL et al. 1999, MAUREL et al. 1997). Welche 5HT Rezeptorsubtypen für die Wirkung von Paroxetin in Frage kommen, ist leider noch nicht geklärt.

Ähnlich wie in Fliegen wird in Mäusen nach Injektion von Paroxetin eine erhöhte Ethanolsensitivität festgestellt. Wird Mäusen Paroxetin (i.p. 5 mg/kg) oder Fluoxetin (i.p. 10 mg/kg) 27 Tage lang injiziert und werden die Tiere am 28. Tag mit Ethanol (i.p. 2 g/kg) behandelt, sieht man eine erhöhte Sensitivität im Bezug auf die stimulierenden und lokomotorischen Effekte von Ethanol (GOELDNER et al. 2005). Vermutlich gibt es einen Zusammenhang zwischen erhöhter Ethanolsensitivität und einer reduzierten Ethanolaufnahme.

4.2. Genetische Manipulation der 5HT Konzentrationen mit dem dSERT in *Drosophila*

Die langfristige Reduktion der 5HT Signaltransduktion in Fliegen sollte durch gesteigerte Wiederaufnahme von 5HT in die Präsynapse nach Überexpression eines wildtypischen dSERTs erreicht werden. Dagegen sollte die Überexpression eines inaktiven dSERTs die Signaltransduktion erhöhen. Geklärt werden muss jedoch, ob der wildtypische und der inaktive dSERT in der Fliege funktionell exprimiert werden.

Postuliert wird, dass der SERT wegen seiner hohen Affinität für 5HT nicht direkt an den aktiven Zonen einer Synapse lokalisiert ist (PICKEL und CHAN 1999; ZHOU et al. 1998). Folglich könnte die 5HT Signaltransduktion unverändert erfolgen, ohne dass eine erhöhte dSERT Dichte einen direkten Einfluss auf die Verweildauer von 5HT im synaptischen Spalt hat. Nur 5HT, welches von der aktiven Zone in äußere Bereiche des synaptischen Spaltes diffundiert wird aufgenommen und wieder in die Präsynapse transportiert.

Ferner wird der SERT post-translational reguliert, unter anderem via Proteinkinase C Phosphorylierung und Glykosylierung (TATE et al. 2003; RAMAMOORTHY und BLAKELY 1999; TATE und BLAKELY 1994), d. h. eine hohe Transkriptionsrate des SERT muss nicht notwendiger Weise zu einer erhöhten Integration in die Zellmembran führen (HAASE et al. 2001; Übersicht, ZAHNISER und DOOLEN 2001). Vermutet wird, dass der SERT mit einem limitierten endogenen Faktor interagiert, der Funktion und Pharmakologie des Transporters reguliert (RAMSEY und DEFELICE 2002). Durchgeführt wurde das Experiment mit *Xenopus* Oozyten, in die *hsert* oder Ratten *sert* (*rsert*) cRNA injiziert wurde. Transport und Spannung wurden für verschiedene Expressionslevel des SERTs gemessen und es konnte gezeigt werden, dass eine Erhöhung der SERT Konzentration nicht zu einem gesteigerten Transport führt, sondern der Transport abhängig von dem endogenen Faktor ist.

Zusammenfassend ist zu sagen, dass die Überexpression des SERTs nicht unbedingt ausreichend sein muss, um eine erhöhte Transportrate zu generieren, da der Transportmechanismus von vielen verschiedenen Faktoren abhängig ist (RAMSEY und DEFELICE 2002; Übersicht, ZAHNISER und DOOLEN 2001).

In dieser Arbeit soll die Erhöhung der 5HT Signaltransduktion während der Entwicklung

mit einem inaktiven dSERT erreicht werden. Dafür wurden zwei Aminosäuren des dSERT verändert, die im rSERT nach Veränderung zur Inaktivierung des Transporters führten (ANDROUTSELLIS-THEOTOKIS und RUDNICK 2002).

Gezeigt werden konnte, dass die Expression des dominant negativen *uas-sert*^{DN15} Konstruktes in den meisten Neuronen zu keiner Veränderung der Ethanol sensitivität oder Toleranz führte. 5HT Konzentrationen in den Köpfen der Fliegen waren jedoch signifikant erhöht in der Kontrolle mit einer *uas-sert*^{DN15} Kopie, in der experimentellen Gruppe *appl-GAL4/+; uas-sert*^{DN15}/*+* und in Fliegen, in denen das *uas-sert*^{DN15} Konstrukt homozygot exprimiert wurde. Dies deutet daraufhin, dass der Insertionsort mitverantwortlich für die erhöhten 5HT Konzentrationen ist.

Um diese ungetriebene Expression zu vermeiden, wurde ein gleiches Konstrukt mit einem anderen Insertionsort eingesetzt: *uas-sert*^{DN29}.

Trotz signifikant erhöhter 5HT Konzentrationen in den Köpfen der experimentellen Fliegen sind Ethanol sensitivität und Ethanol toleranz wildtypisch. Für die erhöhten 5HT Konzentrationen können kompensatorische Prozesse verantwortlich sein. Da der Rücktransport von 5HT in die Präsynapse inhibiert ist, könnte es zu einer verstärkten 5HT Produktion kommen, um die Signaltransduktion aufrecht zu erhalten. In SERT defizienten Mäusen ist die 5HT Syntheserate bis zu 60% erhöht, wobei die erhöhte 5HT Syntheserate kompensatorisch für die bis zu 70% reduzierte 5HT Konzentration in Geweben von verschiedenen Gehirnregionen wirkt. Die Depletion des SERTs in Mäusen verhindert somit die adequate Speicherung von 5HT im Zellgewebe, was unzureichend kompensiert wird mit einer erhöhten 5HT Synthese (KIM et al. 2005).

Mäuse mit einer Defizienz für den SERT nehmen freiwillig weniger Ethanol zu sich als wildtypische Mäuse (KELAI et al. 2003; BENGEL et al. 1998). Der Grund für die reduzierte Ethanol aufnahme ist die höhere Ethanol sensitivität der SERT defizienten Mäuse (BOYCE-RUSTAY et al. 2006).

Auf Grund dieser Ergebnisse stellt sich die Frage, ob die erhöhten 5HT Konzentrationen in *Drosophila* nach Inaktivierung des dSERTs ausreichend sind, um eine wildtypische 5HT Signaltransduktion wiederherzustellen. Hinzuzufügen ist, dass neben dem inaktiven dSERT auch immer noch wildtypischer dSERT vorhanden ist, wenn auch in vermutlich geringfügigen Mengen.

Des Weiteren wurde ein Hypomorph des *dserts* hinsichtlich ethanol induzierten Verhaltens untersucht. Dieses *dsert*⁵⁵ Hypomorph wurde kürzlich hergestellt und hat eine Deletion

in der Promotorregion des *dsert*, was zu einer Reduktion der dSERTs führt (Hirsh, persönliche Kommunikation). Fliegen homozygot für dieses Hypomorph zeigen eine erhöhte Ethanol sensitivität und eine reduzierte Toleranz. Demnach wurde ein ähnliches Verhalten wie nach Fütterung eines dSERT Inhibitors beobachtet.

Interessant ist, dass SERT defiziente Mäuse auch eine reduzierte 5HT_{1a} und 5HT_{1b} Autorezeptoraktivität und Expression aufweisen (FABRE et al. 2000; LI et al. 1999). Die Reduktion von Rezeptoren vermindert die 5HT Signaltransduktion. Die so veränderte Signaltransduktion könnte eine Ursache für die erhöhte Ethanol sensitivität in Mäusen sein.

Auch in *Drosophila* sollte untersucht werden, ob eine chronische Inhibition der dSERT Aktivität die Expression der 5HT Rezeptoren verändert.

4.3. Inhibition der Neurotransmission von serotonergen und dopaminergen Neuronen

Um serotonerge Neuronen zu inhibieren, wurde eine *ddc*-GAL4 Linie verwendet, die in serotonergen und dopaminergen Neuronen Expression zeigt (LI et al. 2000; LUNDELL und HIRSH 1994; BEALL und HIRSH 1987). Die Inhibition der Neurotransmission während der Entwicklung in einer Untergruppe von serotonergen und dopaminergen Neuronen mit Hilfe der *ddc*-GAL4 Linie hat keinen Einfluss auf Ethanol sensitivität oder Toleranz.

Ziel des Projektes war es jedoch, ausschließlich serotonerge Neuronen während der Entwicklung zu inhibieren, um Auswirkungen auf Ethanol sensitivität und Toleranz zu untersuchen. Deshalb wurden mehrere putativ serotonerge GAL4 Linien hergestellt.

Zwei dieser GAL4 Linien, die *sert1+2*-GAL4 und die *5htr1b*-GAL4 Linie, zeigten einen ethanolinduzierten Verhaltensphänotyp. Die Ethanol sensitivität ist erhöht, wenn die Neurotransmission der serotonergen Zellen der *sert1+2*-GAL4 inhibiert wird.

Ähnliche Ergebnisse sieht man in Mäusen nach chronischer Fütterung von Paroxetin und Fluoxetin (GOELDNER et al. 2005), und nach der Gabe des 5HT Neurotoxins 5,7-DHT (MELCHIOR und TABAKOFF 1986). In diesen Studien wurde der SERT in allen Zellen inhibiert, bzw. 5HT aus dem Gehirn der Mäuse weitgehend entfernt. Deshalb lässt sich vermuten, dass eine Inhibition der 5HT Signaltransduktion in allen serotonergen Zellen zu einer erhöhten Ethanol sensitivität und eventuell zu einer reduzierten Ethanol toleranz führt.

Die in dieser Arbeit verwendete *sert1+2*-GAL4 Linie zeigt jedoch nur Expression in ca. 50% der Neurone, was bedeutet, dass die serotonerge Signaltransduktion nicht vollständig

inhibiert werden konnte. Deshalb sollten GAL4 Linien hergestellt werden, in denen alle serotonergen Neuronen inhibiert werden können (siehe 4.4).

Der humane 5HT_{1a} Rezeptor ist nicht nur prä-, sondern auch postsynaptisch lokalisiert (NESTLER et al. 2001) und ist demnach kein reiner Autorezeptor. Deshalb ist es kaum überraschend, dass die GAL4 Linie mit dem *5htr1b* Promotorfragment in serotonergen, dopaminergen und zwei unbekanntem Zellen Expression zeigt. Der Eindruck entsteht, dass dieser Rezeptor in *Drosophila* ebenfalls prä- und postsynaptisch exprimiert wird. Interessant ist außerdem der ethanolinduzierte Verhaltensphänotyp dieser Fliegen. Inhibiert man die Zellen dieser GAL4 Linie mit TNT entwickeln die Fliegen eine sehr hohe Ethanol sensitivität sowie eine stark reduzierte Ethanol toleranz. Da die *ddc*-GAL4 Linie im Vorfeld keinen Phänotyp gezeigt hat, stellt sich die Frage, welche der serotonergen und dopaminergen Neurone der *5htr1b*-GAL4 Linie für den Phänotyp verantwortlich sind.

Um herauszufinden, ob dopaminerge Neuronen bei der Ethanol sensitivität eine Rolle spielen wurde zusätzlich eine *th*-GAL4 Linie mit *uas-tnt* verkreuzt und auf Ethanol sensitivität und Toleranz getestet. Die Inhibition der Neurotransmission der von der *th*-GAL4 Linie getriebenen dopaminergen Neuronen führt zu einer erhöhten Ethanol sensitivität, beeinflusst aber nicht die Ethanol toleranz.

Im folgenden Teil werden die Neurone diskutiert, in denen möglicherweise Neurotransmission stattfinden muss, damit sich normale Ethanol sensitivität entwickeln kann.

4.4. Neuroanatomische Studien von serotonergen und dopaminergen Neuronen zweier GAL4 Linien

Die Verteilung von serotonergen Neuronen im Fliegenhirn wurde untersucht und mit veröffentlichten Ergebnissen verglichen (Vallés und White, 1988). Alle acht schon beschriebenen 5HT Gruppen ließen sich nachweisen, jedoch zählte die IP Zellgruppe sieben statt drei bis vier Zellen. Zusätzliche Neurone wurden wie folgt beschrieben: AS, LE und DP mit jeweils einer Zelle pro Gehirnhälfte, AP und PSE3 mit jeweils drei Zellen und LP3 mit zwei Zellen pro Gehirnhälfte.

Unterschiede können daraus resultieren, dass manche dieser Zellen klein und nur schwach gefärbt sind, andere wiederum sehr weit anterior im Gehirn liegen, so dass sie auf Gefrierschnitten nur schwer detektierbar und auch nicht in jedem *whole-mount* zu sehen sind.

Die *sert1+2*-GAL4 Linie exprimiert GFP in 46% der serotonergen Neuronen und in zwei nicht serotonergen Neuronen im Pars Intercerebralis (PI).

Verschiedene Präparationen zeigen unterschiedliche Anzahlen an 5HT positiven Zellen. Auf den Gefrierschnitten wurde eine erhöhte Anzahl an Neuronen angefärbt. Jeweils ein zusätzliches Neuron ist in der Zellgruppe SE3 und IP zu sehen, zwei Neurone mehr zählt die SP1 Zellgruppe und elf statt fünf Neurone sind in der LP2 Gruppe zu finden. Die fünf Neurone bilden den Mittelwert für 13 *whole-mounts*, wobei von Gehirn zu Gehirn Schwankungen auftraten. Auf den Gefrierschnitten sind insgesamt 32 serotonerge Zellen angefärbt. Das sind ca. 73% aller serotonerger Zellen, im Gegensatz zu nur 46% gefärbten serotonergen Neuronen in den *whole-mounts*.

Diese Unterschiede könnten durch die bessere Zugänglichkeit der Schnitte für den Antikörper erklärt werden.

Da die Zellen auf Gefrierschnitten besser angefärbt werden, sollten mehr 5HT positive Gefrierschnitte von *sert1+2*-GAL4 Gehirnen angefertigt und untersucht werden.

Erwartet wurde, dass in allen serotonergen Zellen Expression zu sehen ist, da in Ratten gezeigt wurde, dass der SERT Transporter mit allen serotonergen Zellen, aber nicht mit Gliazellen kolokalisiert (RATTRAY et al. 1999). Um dies auch für *Drosophila* zu belegen, wurde ein dSERT Antikörper hergestellt. Mit diesem Antikörper konnte gezeigt werden, dass der dSERT mit 5HT Zellkörpern, Axonen und Dendriten kolokalisiert. Im Bezug auf die in dieser Arbeit verwendete *sert1+2*-GAL4 Linie bedeutet dies, dass es sich bei dem Promotorfragment, welches zu Herstellung des *sert1+2*-GAL4 Konstruktes verwendet wurde, nicht um die vollständige Promotorregion handelte.

Um 100%tige dSERT Expression zu bekommen könnte man die gesamte kodierende Region des dSERT in den GAL4-Vektor klonieren. Eine andere Möglichkeit wäre die Promotorregion der Tryptophan Hydroxylase zu benutzen. Die Tryptophan Hydroxylase ist das geschwindigkeitsbestimmende Enzym der 5HT Synthese und kommt deshalb ausschließlich in serotonergen Zellen vor (LOVENBERG et al. 1967; GRAHAME-SMITH 1964). Interessanterweise wurden in Fliegen, Nagetieren und im Menschen zwei Gene dieses Enzyms gefunden: TPH1, was in der Peripherie vorkommt, und TPH2, das ausschließlich im Gehirn transkribiert wird (NECKAMEYER et al. 2007; WALTHER und BADER 2003). Dadurch könnte gezielt die 5HT Konzentration im Gehirn manipuliert werden, ohne den

peripheren 5HT Haushalt zu beeinflussen (WALTHER und BADER 2003).

Vergleicht man die serotonergen Neurone der *sert1+2*-GAL4 Linie mit den serotonergen Neuronen der *5htr1b*-GAL4 Linie gibt es eine sehr hohe Überlappung der gefärbten serotonergen Zellgruppen.

Die Anzahl der Neurone ist für die Zellgruppen SE1, SE2, SP2 und IP identisch. Die Zellgruppe LP1 zählt in der *sert1+2*-GAL4 Linie fünf und in der *5htr1b*-GAL4 Linie acht Neurone. Die zwei Neurone der SE3 Gruppe, die in der *sert1+2*-GAL4 Linie gefärbt sind, finden sich in der *5htr1b*-GAL4 Linie in weniger als drei von acht untersuchten Gehirnen. Dasselbe gilt für die Neuronen der LE und der PSE3 Zellgruppe der *5htr1b*-GAL4 Linie. Keine der beiden Zellgruppen ist in der *sert1+2*-GAL4 Linie angefärbt. Dafür sind die Zellgruppen AP und AS mit jeweils einem Neuron nur in der *sert1+2*-GAL4 Linie angefärbt.

Zusammenfassend kann man sagen, dass beide GAL4 Linien in genau 20 von putativ 44 serotonergen Neuronen Expression zeigen, mit einer Überlappung von 80% bezüglich der Neuronengruppen.

Ob es sich dabei um exakt die gleichen Neurone in den einzelnen Neuronengruppen handelt, muss noch bestimmt werden. Wird die Vesikelausschüttung der serotonergen Neurone der *sert1+2*-GAL4 Linie inhibiert, reagieren die Fliegen mit einer erhöhten Sensitivität auf Ethanol. Inhibiert man die Neurone der *5htr1b*-GAL4 Linie, reagieren die Fliegen mit einer sehr hohen Ethanolsensitivität und mit einer sehr niedrigen Ethanoltoleranz. Dieser erhebliche Unterschied liegt vermutlich daran, dass die *5htr1b*-GAL4 Linie zusätzlich noch in elf dopaminergen Neuronen Expression zeigt.

Falls serotonerge Neuronen Ethanolsensitivität vermitteln, kommen Neuronen der folgende Zellgruppen in Frage: SE1, SE2, LP1, LP2, SP1, SP2, IP.

Wird die Neurotransmission in einer Untergruppe von dopaminergen Neuronen mit Hilfe einer *th*-GAL4 Linie inhibiert wird, führt dies ebenfalls zu einer erhöhten Ethanolsensitivität. In anderen Modellorganismen wurde bereits gezeigt, dass dopaminerge Neurone eine Rolle bei der Entwicklung von Ethanolsensitivität spielen (PHILLIPS et al. 1998; RUBINSTEIN et al. 1997; WEISS et al. 1993; YOSHIMOTO et al. 1992).

4.5. Gehirnregionen und Neurone, die möglicherweise Ethanol sensitivität oder Toleranz vermitteln

Die Projektionen der beiden hier beschriebenen GAL4 Linien sind nicht vergleichbar. Die Neurone der *sert1+2*-GAL4 Linie projizieren in das subösophageale Ganglion und in eine Geweih ähnlichen Struktur im Protocerebrum. Zusätzlich werden Teile des Pilzkörper innerviert, wobei es sich vermutlich um die α , β und γ -Loben handelt.

Die *5htr1b*-GAL4 Linie zeigt Projektionen im Protocerebrum und seitlich vom Ösophagus. Innerviert wird ein Teil des Pilzkörpers und der Ellipsoidkörper bzw. der fächerförmige Körper. Für den Ellipsoidkörper ist bereits gezeigt worden, dass er eine Funktion bei der Entwicklung von Ethanol toleranz hat. Dabei ist hauptsächlich die Neurotransmitterausschüttung in den *small field* Neuronen von Bedeutung (SCHOLZ et al. 2000).

Für *Drosophila* wurde gezeigt, dass eine *homer* Nullmutante verantwortlich für Ethanol toleranz und Sensitivität ist (URIZAR et al. 2007). Das Expressionsmuster von *homer* im Ellipsoidkörper ist dem Expressionsmuster unserer *5htr1b*-GAL4 Linie erstaunlich ähnlich. Des Weiteren konnten die erhöhte Ethanol sensitivität und reduzierte Ethanol toleranz von *homer* den R2 und R4m *large field* Neuronen, die den Ellipsoidkörper innervieren, zugeordnet werden (URIZAR et al. 2007). Die Expression der R4m und R2 Typ Neurone wurde von Renn et al., (1999) ausführlich beschrieben. Die damals verwendeten GAL4 Linien c42 und c819 (c547) zeigen ein sehr ähnliches Expressionsmuster im Ellipsoidkörper im Vergleich zu der in dieser Arbeit beschriebenen *5htr1b*-GAL4 Linie (RENN et al. 1999). Leider ist nicht bekannt, welchen Neurotransmitter/peptide etc. diese Zellen für die Signaltransduktion verwenden. Interessant wäre es festzustellen, ob es sich bei der *5htr1b*-GAL4 Linie eventuell auch um R2 bzw. R4m Neuronen handelt, die den Ellipsoidkörper innervieren. Des Weiteren sollte die Neurotransmission der GAL4 Linien c42 und c819(c547) inhibiert werden und die Fliegen auf Ethanol sensitivität und Toleranz getestet werden.

Eine andere GAL4 Linie, die eine reduzierte Ethanol toleranz nach Inhibition der Neurotransmission mit TNT aufweist und ebenfalls eine ähnliche Expression wie die *5htr1b*-GAL4 zeigt, ist die Linie 078Y. Diese Linie zeigt Expression in den *small field* Neuronen des Ellipsoidkörpers und in ein paar zusätzlichen Neuronen (SCHOLZ et al. 2000).

Andere GAL4 Linien (c107, 201Y und c522), die ebenfalls im Zentralkomplex Expression

aufweisen, zeigen eine reduzierte Ethanol sensitivität wenn sie mit einem *uas-PKA^{inh}* Transgen verkreuzt werden (RODAN et al. 2002). Die Neuroanatomie dieser GAL4 Linien sollte untersucht werden und mit den hier beschriebenen Linien verglichen werden.

Als nächstes müssten die dopaminergen und serotonergen Neurone der *ddc*-GAL4 Linie, sowie die dopaminergen Neurone der *th*-GAL4 Linie genau beschrieben und mit der *5htr1b*-GAL4 Linie verglichen werden. Ziel ist es heraus zu finden, welche Neurone bzw. Neuronengruppen für die Ethanol sensitivität und Toleranz verantwortlich sind. Die vorliegende Studie legt nahe, dass Neurone, die den Ellipsoidkörper innervieren, vermutlich in die Entwicklung von Ethanol sensitivität und Toleranz involviert sind.

4.6. Perspektiven

Drosophila melanogaster ist ein geeignetes Modell, um die Auswirkung von Ethanol im Bezug auf Ethanol sensitivität und Toleranz zu testen. Gründe sind, die relativ hohe Ähnlichkeit dieses Invertebraten zu Säugetieren im Bezug auf das ethanolinduzierte Verhalten, wie gesteigerte Lokomotoraktivität, Verlust der Körperkontrolle und schließlich die Betäubung. Auch das serotonerge System in *Drosophila* ist stark konserviert im Vergleich zu Vertebraten. Psychopharmaka, wie z. B. 5HT Wiederaufnahmehemmer können erfolgreich eingesetzt werden. Da in dieser Arbeit mit Hilfe von GAL4 Linien nur 46% der serotonergen Neurone manipuliert wurden, sollte der Beitrag der restlichen Neuronen zur Ethanol sensitivität und Toleranz untersucht werden. Serotonerge Neuronengruppen, die näher untersucht werden sollten sind: SE1, SE2, LP1, LP2, SP1, SP2 und IP. Dabei gilt es heraus zu finden, welche Neurone wichtig für die Entwicklung einer Ethanol sensitivität und/oder Toleranz sind. Sind diese Neuronen identifiziert, gilt es im nächsten Schritt die mit diesen Neuronen assoziierten Gehirnstrukturen ausfindig zu machen. Schlussendlich gilt es die Funktion der 5HT Signaltransduktion im Bezug auf die Toleranzentwicklung zu verstehen, umso mehr weil Ethanol toleranz zu einer Alkoholabhängigkeit führen kann.

In dieser Arbeit konnte ebenfalls gezeigt werden, dass mindestens elf dopaminerge Neurone eine Rolle bei der ethanolinduzierten Verhaltensantwort spielen. Diese elf dopaminergen Neurone konnten bestimmten dopaminergen Zellgruppen zugeordnet werden, wobei genaue Projektionen jedoch unklar sind und noch definiert werden müssen.

Es ist wichtig anzumerken, dass die hier untersuchte Ethanol sensitivität bzw. Toleranz nach den Richtlinien des DSM-IV nur eines von vielen Kriterien darstellt, die für eine Alkoholabhängigkeit im Menschen charakteristisch sind (ASSOCIATION 2000). Dabei wird eine Alkoholabhängigkeit definiert als a) die unkontrollierte Aufnahme von Ethanol, unbeeinflusst von Umweltfaktoren und b) das Risiko eines Rückfalles in die Alkoholabhängigkeit auch nach mehreren Jahren (HEYNE 1996). In Ratten konnte gezeigt werden, dass die Menge der freiwilligen Ethanolaufnahme primär von Umweltfaktoren, wie soziale Stellung in der Gruppe, isolierte Haltung etc. beeinflusst wurde. Nach sechs bis acht Monaten stellte sich jedoch, unabhängig von Umweltfaktoren, eine erhöhte Ethanolaufnahme ein. Nach neun Monaten Abstinenz tranken diese Ratten doppelt so viel wie Kontrolltiere, auch wenn der Ethanol mit einer bitter schmeckenden Substanz vermischt wurde. Auch hier spielten Umweltfaktoren keine Rolle (WOLFFGRAMM und HEYNE 1995). Diese Abhängigkeit wird psychische Abhängigkeit genannt und tritt nur ein, wenn die Ratten freiwillig Ethanol zu sich nehmen können. Injiziert man Ratten Ethanol, entsteht eine physische, jedoch keine psychische Abhängigkeit (HEYNE 1996; WOLFFGRAMM und HEYNE 1995).

Ein vergleichbares Experiment könnte mit *Drosophila* durchgeführt werden. Die Fliege müsste freiwillig eine Ethanol-Lösung wählen können, wobei die aufgenommene Flüssigkeitsmenge pro Fliege genau gemessen werden müsste. Die Frage ist, ob *Drosophila* tatsächlich alkoholabhängig werden kann und welcher Zeitraum dafür nötig ist. Eine Alkoholabhängigkeit könnte getestet werden, indem die Fliege nach einer Entzugsperiode den Ethanol in einer bitter schmeckenden Lösung bekommt oder sie einen Elektroschock auf sich nehmen muss, um Ethanol zu bekommen (siehe dazu, HEYNE 1996).

Wäre eine Alkoholabhängigkeit in Fliegen nachweisbar, könnte man versuchen, Gene und Mechanismen, die in die Entstehung einer Abhängigkeit involviert sind, zu untersuchen. Diese Gene bzw. Mechanismen wären der Schlüssel für die erfolgreiche Therapie einer weltweit vorherrschenden chronischen Erkrankung, der Alkoholabhängigkeit (Übersicht, TAMBOUR und QUERTEMONT 2007).

5. Zusammenfassung

Der Neurotransmitter Serotonin spielt eine Rolle bei der Entwicklung von Ethanol toleranz und Alkoholismus. Die vorliegende Arbeit untersuchte die Funktion von Serotonin (5HT) im Bezug auf Ethanol sensitivität und Toleranz in *Drosophila melanogaster*. Pharmakologisch wurden die 5HT Konzentrationen durch Füttern eines Vorläufers der 5HT Synthese kurzzeitig erhöht oder mit einem Syntheseinhibitor reduziert. Die Veränderung der 5HT Konzentrationen mittels dieser Pharmaka hatte jedoch keinen Einfluss auf die Entwicklung von Ethanol sensitivität oder Toleranz. 5HT wird durch den 5HT Transporter (SERT) aus dem synaptischen Spalt in die Präsynapse wieder aufgenommen. Die kurzzeitige Fütterung des SERT Inhibitors Paroxetin führt zu erhöhter Ethanol sensitivität und reduzierter Toleranz. Ein ähnlicher Phänotyp wurde in der hypomorphen *sert*⁵⁵ Mutante, die eine reduzierte *dsert* Expression aufweist, beobachtet. Dies legt nahe, dass kurz- wie langfristige Reduktion der SERT Funktion die Entwicklung einer vollständigen Ethanol toleranz verhindern. Folglich hat die Verlängerung der 5HT Signaltransduktion im synaptischen Spalt, nicht aber die allgemeine Erhöhung von 5HT Konzentrationen im Fliegengehirn einen Einfluss auf die Entwicklung von Ethanol toleranz.

Zur genauen Bestimmung der SERT Expression im adulten Gehirn der Fliege wurde ein *Drosophila* SERT (dSERT) Antikörper hergestellt. Mit Hilfe dieses Antikörpers konnte gezeigt werden, dass der dSERT mit serotonergen Somata, Axonen und Dendriten kolokalisiert.

Ferner sollten 5HT Konzentrationen im synaptischen Spalt durch Überexpression des wildtypischen *dsert* in einem Großteil der Neurone mit Hilfe des UAS/GAL4 Systems reduziert werden. Diese Fliegen wiesen weder eine veränderte 5HT Konzentration in den Köpfen auf noch war die Ethanol sensitivität bzw. Toleranz verändert. Das kann einerseits daran liegen, dass der dSERT nicht in die Membran integriert wird oder andererseits daran, dass unser Konstrukt nicht funktional ist. Die Überexpression eines inaktiven dSERTs sollte theoretisch zur Erhöhung von 5HT Konzentrationen im synaptischen Spalt führen. Wurde ein inaktiver dSERT in den meisten Neuronen der Fliege exprimiert, erhöhten sich zwar die 5HT Konzentrationen in den Köpfen der Fliegen, dennoch war das ethanolinduzierte Verhalten nicht verändert.

Zusätzlich wurde untersucht, welchen Einfluss die Inhibition der 5HT Ausschüttung auf die

Entwicklung von Ethansensitivität und Toleranz hat. Zur Inhibition der Neurotransmission in serotonergen Zellen wurde ein Tetanus Toxin (TNT) Transgen in Verbindung mit verschiedenen GAL4 Treiberlinien eingesetzt. Die Inhibition von serotonergen und dopaminergen Neuronen mit Hilfe einer GAL4 Linie, die einen Abschnitt des Gens der Dopamin Decarboxylase (*ddc*) beinhaltet, führte zu keiner Veränderung von Ethansensitivität bzw. Toleranz.

Für weitere GAL4 Linien wurde zunächst das Expressionsmuster neuroanatomisch untersucht. Von vier ausgewählten GAL4 Linien zeigten zwei Expression in serotonergen Neuronen. Die *sert1+2*-GAL4 Linie mit einem Stück Promotorregion des *dsert* zeigt Expression in 46% der serotonergen Neuronen. Wurden diese mit Hilfe von Tetanus Toxin inhibiert, zeigten die Fliegen eine leicht aber signifikant erhöhte Ethansensitivität und eine unveränderte Toleranz. Die zweite GAL4 Linie enthält ein Stück Promotorregion des 5HT1b Rezeptors und zeigt Expression in ebenfalls 46% der serotonergen Neurone, weitgehend überlappend mit der Expression der Linie *sert1+2*-GAL4. Jedoch exprimiert die *5htr1b*-GAL4 Linie zusätzlich in vier serotonergen Neuronen, in elf dopaminergen und einem unbekanntem Neuron. Interessanterweise ist nach Inhibition der Neurotransmission in diesen Neuronen eine stark erhöhte Ethansensitivität sowie eine reduzierte Ethantoleranz zu beobachten. Folglich könnte die Inhibition der Neurotransmission in dopaminergen Neuronen für die Reduktion der Ethansensitivität verantwortlich sein. Deshalb wurde die Neurotransmitterausschüttung in dopaminergen Neuronen mit Hilfe der *th*-GAL4 Linie und TNT unterdrückt und diese Fliegen wurden auf ihre Fähigkeit untersucht, Ethansensitivität und/oder Toleranz zu entwickeln.

Nach Inhibition der von *th*-GAL4 getriebenen dopaminergen Neurone wurde eine erhöhte Ethansensitivität gemessen, aber keine signifikant veränderte Ethantoleranz.

Da die *ddc*-GAL4 Linie im Vorfeld keinen ethanolinduzierten Verhaltensphänotyp gezeigt hat, sollte bestimmt werden, welche dopaminergen Neuronen der *5htr1b*-GAL4 sowie der *th*-GAL4 Linie für die erhöhte Ethansensitivität verantwortlich sind. Serotonerge Neuronengruppen, die in die Entwicklung von Ethansensitivität und Toleranz involviert sein könnten, sind SE1, SE2, SE3, LP1, LP2, SP1, SP2 und IP, während es sich bei den dopaminergen Neuronengruppen um PAL1, PPL1, PPM2, PPM3 und SVP1 handeln könnte.

Einige Neurone der *5htr1b*-GAL4 Linie projizieren in den Ellipsoidkörper, eine Struktur des Zentralkomplexes, für die bereits gezeigt wurde, dass sie in die Entwicklung von

Ethanol toleranz involviert ist. Jedoch muss näher untersucht werden, welche Neuronen für die Innervation verantwortlich sind. Dafür sollten GAL4 Linien verwendet werden, die eine ähnliche Expression wie die *5htr1b*-GAL4 Linie, aber ausschließlich im Ellipsoidkörper, zeigen.

In dieser Arbeit konnte zum ersten Mal gezeigt werden, dass serotonerge und dopaminerge Neurone in die Entwicklung von Ethanol sensitivität und Toleranz in *Drosophila melanogaster* involviert sind. Ferner konnte gezeigt werden, dass eine veränderte 5HT Signaltransduktion zu einer reduzierten Toleranz führt. Weiterführend ist die Identifizierung von serotonergen Neuronen, die für die Entwicklung von Ethanol sensitivität und/oder Toleranz verantwortlich sind, von großem Interesse. Ziel ist es, die neuronalen Schaltkreise aufzudecken, die den Phänomenen Ethanol sensitivität und Toleranz zugrundeliegen.

6. Summary

Serotonin dysregulation is strongly implicated in the development of ethanol tolerance and alcoholism. This work examined the role of the neurotransmitter 5HT in the development of ethanol sensitivity and tolerance in *Drosophila melanogaster*. Using a pharmacologic approach 5HT concentrations were increased after feeding a 5HT precursor or decreased after feeding a 5HT synthesis inhibitor. This change of 5HT concentrations did not influence the development of ethanol sensitivity or tolerance. Reuptake of 5HT into the pre-synapse is regulated via a 5HT transporter (SERT). After feeding the SERT reuptake inhibitor Paroxetine an increase in ethanol sensitivity and a reduction in tolerance was observed. A reduction of SERT expression in the hypomorph *sert*⁵⁵ mutant leads to a similar phenotype. Supposing short-term as well as long-term reduction of SERT function inhibits the development of normal ethanol tolerance. Therefore, the prolonged 5HT signalling within the synaptic cleft, but not the overall raising of 5HT concentrations in fly brains has an influence on the development of ethanol tolerance. To determine the SERT expression in the adult brain of the fly, a *Drosophila* SERT (dSERT) antibody was generated. This antibody co-localizes with serotonergic somata, axons and dendrites.

Furthermore, 5HT concentrations were reduced in the synaptic cleft, through over-expression of a wildtype dSERT in most neurons using the UAS/GAL4 system. Those flies neither showed a change in 5HT concentrations in heads, nor a changed development of ethanol sensitivity and tolerance. On the one hand this can be due to dSERT that is not integrated in the membrane of the pre-synapse or on the other hand that our construct is not functioning. Over-expression of an inactive dSERT should theoretically lead to an increased 5HT signalling in the synaptic cleft. The inactive dSERT was expressed in most neurons and increased 5HT concentrations in heads, but had no influence on ethanol induced behavior.

Moreover it was investigated, what influence the inhibition of 5HT neurotransmission has on the development of ethanol sensitivity and tolerance. To inhibit the neurotransmission of serotonergic cells a tetanus toxin transgene in combination with various GAL4 driver lines was used. The inhibition of serotonergic and dopaminergic neurons using a GAL4 driver line

that contains a fragment of the dopamine decarboxylase gene does not influence ethanol sensitivity, or tolerance.

For additional GAL4 lines first the expression pattern was studied by neuroanatomy. Out of four selected GAL4 lines two showed expression in serotonergic neurons. The *sert1+2*-GAL4 line which included a fragment of the *dsert* promotor region shows expression in 46% of the serotonergic neurons. Inhibition of those neurons with tetanus toxin shows a slight, but significant increase in ethanol sensitivity, but normal tolerance.

The second GAL4 line contains a promotor fragment of the 5HT1b receptor gene and also expresses GAL4 in 46% of the serotonergic neurons, largely overlapping with the expression pattern of the *sert1+2*-GAL4 line. However, the *5htr1b*-GAL4 line in addition expresses GAL4 in four serotonergic, eleven dopaminergic and one unknown neuron. Interestingly, after inhibition of those neurons, increased ethanol sensitivity and reduced tolerance was observed. The inhibition of neurotransmission in those dopaminergic neurons could be responsible for increased ethanol sensitivity. In the next step, we therefore inhibited neurotransmission exclusively in dopaminergic neurons using a GAL4 line with a gen fragment of the enzyme tyrosine hydroxylase (*th*-GAL4) and tested those flies for ethanol sensitivity and tolerance. After inhibition of neurons driven by the *th*-GAL4 line increased ethanol sensitivity was measured, but normal tolerance. We wanted to find out, which dopaminergic neurons of the *5htr1b*-GAL4 and the *th*-GAL4 line are responsible for increased ethanol sensitivity.

Serotonergic groups of neurons that could be involved in the development of ethanol sensitivity and tolerance are SE1, SE2, SE3, LP1, LP2, SP1, SP2 and IP, whereas dopaminergic neurons that might play a role could belong to the groups PAL1, PPL1, PPM2, PPM3 and SVP1.

Some neurons of the *5htr1b*-GAL4 line project into the ellipsoid body, a structure of the central complex that was shown previously to be involved in the development of ethanol tolerance. Therefore it should be investigated which neurons are responsible for the innervation of the ellipsoid body. In this case GAL4 lines should be used, that show a similar expression pattern as our *5htr1b*-GAL4 line, but exclusively express GAL4 in neurons that project into the ellipsoid body, to investigate if inhibition of a small subset of neurons influences ethanol sensitivity and/or tolerance.

In this work, for the first time, the involvement of the serotonergic and dopaminergic system in the development of ethanol sensitivity and tolerance was demonstrated in the fly. Furthermore

we showed that modified 5HT signalling leads to a reduced tolerance. The next step is to identify serotonergic and dopaminergic neurons that are responsible for the development of ethanol sensitivity and tolerance. Our intention is to reveal neuronal frameworks that underlie ethanol sensitivity and tolerance.

7. Literaturverzeichnis

- [ADAMS und DeFELICE 2003] ADAMS, SCOTT V und L. J. DeFELICE (2003). *Ionic currents in the human serotonin transporter reveal inconsistencies in the alternating access hypothesis.* Biophys J, 85(3):1548–1559.
- [ADELL und MYERS 1996] ADELL, A. und R. D. MYERS (1996). *Lesioning of midbrain raphe nuclei with 5,7-DHT fails to alter ethanol intake in the low alcohol drinking (LAD) rat.* Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry, 20(3):473–481.
- [ADKINS et al. 2001] ADKINS, E. M., E. L. BARKER und R. D. BLAKELY (2001). *Interactions of tryptamine derivatives with serotonin transporter species variants implicate transmembrane domain I in substrate recognition.* Mol Pharmacol, 59(3):514–523.
- [AISTRUP et al. 1999] AISTRUP, G. L., W. MARSZALEC und T. NARAHASHI (1999). *Ethanol modulation of nicotinic acetylcholine receptor currents in cultured cortical neurons.* Mol Pharmacol, 55(1):39–49.
- [ALVARADO et al. 1990] ALVARADO, R., S. CONTRERAS, N. SEGOVIA-RIQUELME und J. MARDONES (1990). *Effects of serotonin uptake blockers and of 5-hydroxytryptophan on the voluntary consumption of ethanol, water and solid food by UChA and UChB rats.* Alcohol, 7(4):315–319.
- [ANDROUTSELLIS-THEOTOKIS und RUDNICK 2002] ANDROUTSELLIS-THEOTOKIS, ANDREAS und G. RUDNICK (2002). *Accessibility and conformational coupling in serotonin transporter predicted internal domains.* J Neurosci, 22(19):8370–8378.
- [ANSORGE et al. 2004] ANSORGE, MARK S, M. ZHOU, A. LIRA, R. HEN und J. A. GINGRICH (2004). *Early-life blockade of the 5-HT transporter alters emotional behavior in adult mice.* Science, 306(5697):879–881.
- [ASSOCIATION 2000] ASSOCIATION, AMERICAN PSYCHIATRIC (2000). *Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders DSM-IV-TR Fourth Edition (Text Revision)*. American Psychiatric Publishing.
- [BABOR et al. 1992a] BABOR, T. F., Z. S. DOLINSKY, R. E. MEYER, M. HESSELBROCK, M. HOFMANN und H. TENNEN (1992a). *Types of alcoholics: concurrent and predictive validity of some common classification schemes.* Br J Addict, 87(10):1415–1431.
- [BABOR et al. 1992b] BABOR, T. F., M. HOFMANN, F. K. DELBOCA, V. HESSELBROCK, R. E. MEYER, Z. S. DOLINSKY und B. ROUNSAVILLE (1992b). *Types of alcoholics, I. Evidence for an empirically derived typology based on indicators of vulnerability and severity.* Arch Gen Psychiatry, 49(8):599–608.
- [BADAWY et al. 1989] BADAWY, A A, C. J. MORGAN, J. LANE, K. DHALIWAL und D. M. BRADLEY (1989). *Liver tryptophan pyrrolase. A major determinant of the lower brain 5-hydroxytryptamine concentration in alcohol-preferring C57BL mice.* Biochem J, 264(2):597–599.
- [BALLENGER et al. 1979] BALLENGER, J. C., F. K. GOODWIN, L. F. MAJOR und G. L. BROWN (1979). *Alcohol and central serotonin metabolism in man.* Arch Gen Psychiatry, 36(2):224–227.
- [BANERJEE et al. 2004] BANERJEE, SANTANU, J. LEE, K. VENKATESH, C.-F. WU und G. HASAN (2004). *Loss of flight and associated neuronal rhythmicity in inositol 1,4,5-trisphosphate receptor mutants of Drosophila.* J Neurosci, 24(36):7869–7878.
- [BANKI 1981] BANKI, C M (1981). *Factors influencing monoamine metabolites and tryptophan in patients with alcohol dependence.* J Neural Transm, 50(2-4):89–101. Comparative Study.

- [BARKER et al. 1998] BARKER, E. L., M. A. PERLMAN, E. M. ADKINS, W. J. HOULIHAN, Z. B. PRISTUPA, H. B. NIZNIK und R. D. BLAKELY (1998). *High affinity recognition of serotonin transporter antagonists defined by species-scanning mutagenesis. An aromatic residue in transmembrane domain I dictates species-selective recognition of citalopram and mazindol.* J Biol Chem, 273(31):19459–19468.
- [BARNES und SHARP 1999] BARNES, N. M. und T. SHARP (1999). *A review of central 5-HT receptors and their function.* Neuropharmacology, 38(8):1083–1152.
- [BEALL und HIRSH 1987] BEALL, C. J. und J. HIRSH (1987). *Regulation of the Drosophila dopa decarboxylase gene in neuronal and glial cells.* Genes Dev, 1(5):510–520.
- [BECK et al. 1983] BECK, O, S. BORG und G. SEDVALL (1983). *Tryptophan levels in human cerebrospinal fluid after acute and chronic ethanol consumption.* Drug Alcohol Depend, 12(3):217–222. Comparative Study.
- [BELL et al. 2006] BELL, RICHARD L, Z. A. RODD, L. LUMENG, J. M. MURPHY und W. J. MCBRIDE (2006). *The alcohol-preferring P rat and animal models of excessive alcohol drinking.* Addict Biol, 11(3-4):270–288.
- [BELLEN et al. 2004] BELLEN, HUGO J, R. W. LEVIS, G. LIAO, Y. HE, J. W. CARLSON, G. TSANG, M. EVANS-HOLM, P. R. HIESINGER, K. L. SCHULZE, G. M. RUBIN, R. A. HOSKINS und A. C. SPRADLING (2004). *The BDGP gene disruption project: single transposon insertions associated with 40 Genetics*, 167(2):761–781.
- [BENGEL et al. 1998] BENGEL, D., D. L. MURPHY, A. M. ANDREWS, C. H. WICHEMS, D. FELTNER, A. HEILS, R. MÖSSNER, H. WESTPHAL und K. P. LESCH (1998). *Altered brain serotonin homeostasis and locomotor insensitivity to 3, 4-methylenedioxymethamphetamine ("Ecstasy") in serotonin transporter-deficient mice.* Mol Pharmacol, 53(4):649–655.
- [BENMANSOUR et al. 1999] BENMANSOUR, S., M. CECCHI, D. A. MORILAK, G. A. GERHARDT, M. A. JAVORS, G. G. GOULD und A. FRAZER (1999). *Effects of chronic antidepressant treatments on serotonin transporter function, density, and mRNA level.* J Neurosci, 19(23):10494–10501.
- [BENMANSOUR et al. 2002] BENMANSOUR, SALOUA, W. A. OWENS, M. CECCHI, D. A. MORILAK und A. FRAZER (2002). *Serotonin clearance in vivo is altered to a greater extent by antidepressant-induced downregulation of the serotonin transporter than by acute blockade of this transporter.* J Neurosci, 22(15):6766–6772.
- [BERGER et al. 2004] BERGER, KAREN H, U. HEBERLEIN und M. S. MOORE (2004). *Rapid and chronic: two distinct forms of ethanol tolerance in Drosophila.* Alcohol Clin Exp Res, 28(10):1469–1480.
- [BLAKELY et al. 1991] BLAKELY, R. D., H. E. BERSON, R. T. FREMEAU, M. G. CARON, M. M. PEEK, H. K. PRINCE und C. C. BRADLEY (1991). *Cloning and expression of a functional serotonin transporter from rat brain.* Nature, 354(6348):66–70.
- [BLAKELY et al. 1998] BLAKELY, R. D., S. RAMAMOORTHY, S. SCHROETER, Y. QIAN, S. APPARSUNDARAM, A. GALLI und L. J. DEFELICE (1998). *Regulated phosphorylation and trafficking of antidepressant-sensitive serotonin transporter proteins.* Biol Psychiatry, 44(3):169–178.
- [BLENAU und BAUMANN 2001] BLENAU, W. und A. BAUMANN (2001). *Molecular and pharmacological properties of insect biogenic amine receptors: lessons from Drosophila melanogaster and Apis mellifera.* Arch Insect Biochem Physiol, 48(1):13–38.
- [BMG 2007] BMG (2007). *Alkohol. Bundesministerium für Gesundheit.*
- [BOILEAU et al. 2003] BOILEAU, ISABELLE, J.-M. ASSAAD, R. O. PIHL, C. BENKELFAT, M. LEYTON, M. DIKSIC, R. E. TREMBLAY und A. DAGHER (2003). *Alcohol promotes dopamine release in the human nucleus accumbens.* Synapse, 49(4):226–231.
- [BORG et al. 1985] BORG, S, H. KVANDE, P. LILJEBERG, D. MOSSBERG und P. VALVERIUS (1985). *5-Hydroxyindoleacetic acid in cerebrospinal fluid in alcoholic patients under different clinical conditions.* Alcohol, 2(3):415–418.

- [BOSSING *et al.* 1996] BOSSING, T., G. M. TECHNAU *und* C. Q. DOE (1996). huckebein is required for glial development and axon pathfinding in the neuroblast 1-1 and neuroblast 2-2 lineages in the *Drosophila* central nervous system.. *Mech Dev*, 55(1):53–64.
- [BOYCE-RUSTAY *et al.* 2006] BOYCE-RUSTAY, JANEL M, L. M. WIEDHOLZ, R. A. MILLSTEIN, J. CARROLL, D. L. MURPHY, L. C. DAWS *und* A. HOLMES (2006). Ethanol-related behaviors in serotonin transporter knockout mice.. *Alcohol Clin Exp Res*, 30(12):1957–1965.
- [BRADBERRY 2002] BRADBERRY, CHARLES W (2002). Dose-dependent effect of ethanol on extracellular dopamine in mesolimbic striatum of awake rhesus monkeys: comparison with cocaine across individuals.. *Psychopharmacology (Berl)*, 165(1):67–76.
- [BRANCHEY *et al.* 1981] BRANCHEY, L, S. SHAW *und* C. S. LIEBER (1981). Ethanol impairs tryptophan transport into the brain and depresses serotonin. *Life Sci*, 29(26):2751–2755.
- [BRODY *und* CRAVCHIK 2000] BRODY, T *und* A. CRAVCHIK (2000). *Drosophila melanogaster* G protein-coupled receptors. *J Cell Biol*, 150(2):83–88.
- [BRUNS *et al.* 1993] BRUNS, D., F. ENGERT *und* H. D. LUX (1993). A fast activating presynaptic reuptake current during serotonergic transmission in identified neurons of *Hirudo*.. *Neuron*, 10(4):559–572.
- [BUDNIK *und* WHITE 1988] BUDNIK, V. *und* K. WHITE (1988). Catecholamine-containing neurons in *Drosophila melanogaster*: distribution and development.. *J Comp Neurol*, 268(3):400–413.
- [BUTTON *et al.* 2007] BUTTON, TANYA M M, S. H. RHEE, J. K. HEWITT, S. E. YOUNG, R. P. CORLEY *und* M. C. STALLINGS (2007). The role of conduct disorder in explaining the comorbidity between alcohol and illicit drug dependence in adolescence. *Drug Alcohol Depend*, 87(1):46–53.
- [BUYDENS-BRANCHEY *et al.* 1989] BUYDENS-BRANCHEY, L, M. H. BRANCHEY, D. NOUMAIR *und* C. S. LIEBER (1989). Age of alcoholism onset. II. Relationship to susceptibility to serotonin precursor availability. *Arch Gen Psychiatry*, 46(3):231–236.
- [CANGIANO *et al.* 1998] CANGIANO, C., A. LAVIANO, M. D. BEN, I. PREZIOSA, F. ANGELICO, A. CASCINO *und* F. ROSSIFANELLI (1998). Effects of oral 5-hydroxy-tryptophan on energy intake and macronutrient selection in non-insulin dependent diabetic patients.. *Int J Obes Relat Metab Disord*, 22(7):648–654.
- [CHANG *et al.* 1998] CHANG, A S, D. M. STARNES *und* S. M. CHANG (1998). Possible existence of quaternary structure in the high-affinity serotonin transport complex. *Biochem Biophys Res Commun*, 249(2):416–421.
- [CHENG *et al.* 2001] CHENG, Y., K. ENDO, K. WU, A. R. RODAN, U. HEBERLEIN *und* R. L. DAVIS (2001). *Drosophila fasciclinII* is required for the formation of odor memories and for normal sensitivity to alcohol.. *Cell*, 105(6):757–768.
- [CHIARA *et al.* 2004] CHIARA, GAETANO DI, V. BASSAREO, S. FENU, M. A. D. LUCA, L. SPINA, C. CADONI, E. ACQUAS, E. CARBONI, V. VALENTINI *und* D. LECCA (2004). Dopamine and drug addiction: the nucleus accumbens shell connection.. *Neuropharmacology*, 47 Suppl 1:227–241.
- [CHO *et al.* 2004] CHO, W., U. HEBERLEIN *und* F. W. WOLF (2004). Habituation of an odorant-induced startle response in *Drosophila*.. *Genes Brain Behav*, 3(3):127–137.
- [COHAN *und* GRAF 1985] COHAN, FREDERICK M. *und* J.-D. GRAF (1985). Latitudinal Cline in *Drosophila melanogaster* for Knockdown Resistance to Ethanol Fumes and for Rates of Response to Selection for Further Resistance. *Evolution*, 39:278–293.
- [COREY *et al.* 1994] COREY, J. L., M. W. QUICK, N. DAVIDSON, H. A. LESTER *und* J. GUASTELLA (1994). A cocaine-sensitive *Drosophila* serotonin transporter: cloning, expression, and electrophysiological characterization.. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 91(3):1188–1192.

- [COUCH *et al.* 2004] COUCH, JESSICA A, J. CHEN, H. I. RIEFF, E. M. URI *und* B. G. CONDRON (2004). robo2 and robo3 interact with eagle to regulate serotonergic neuron differentiation. *Development*, 131(5):997–1006.
- [COWMEADOW *et al.* 2005] COWMEADOW, R. B., H. R. KRISHNAN *und* N. S. ATKINSON (2005). The slowpoke gene is necessary for rapid ethanol tolerance in *Drosophila*.. *Alcohol Clin Exp Res*, 29(10):1777–1786.
- [COWMEADOW *et al.* 2006] COWMEADOW, ROSHANI B, H. R. KRISHNAN, A. GHEZZI, Y. M. AL'HASAN, Y. Z. WANG *und* N. S. ATKINSON (2006). Ethanol tolerance caused by slowpoke induction in *Drosophila*.. *Alcohol Clin Exp Res*, 30(5):745–753.
- [CUNNINGHAM *et al.* 2002] CUNNINGHAM, CHRISTOPHER L, L. E. TULL, K. E. RINDAL *und* P. J. MEYER (2002). Distal and proximal pre-exposure to ethanol in the place conditioning task: tolerance to aversive effect, sensitization to activating effect, but no change in rewarding effect. *Psychopharmacology (Berl)*, 160(4):414–424. *Comparative Study*.
- [DACKS *et al.* 2006] DACKS, ANDREW M, T. A. CHRISTENSEN *und* J. G. HILDEBRAND (2006). Phylogeny of a serotonin-immunoreactive neuron in the primary olfactory center of the insect brain.. *J Comp Neurol*, 498(6):727–746.
- [DAVIES 2003] DAVIES, MARTIN (2003). The role of GABAA receptors in mediating the effects of alcohol in the central nervous system.. *J Psychiatry Neurosci*, 28(4):263–274.
- [DEMCHYSHYN *et al.* 1994] DEMCHYSHYN, L. L., Z. B. PRISTUPA, K. S. SUGAMORI, E. L. BARKER, R. D. BLAKELY, W. J. WOLFGANG, M. A. FORTE *und* H. B. NIZNIK (1994). Cloning, expression, and localization of a chloride-facilitated, cocaine-sensitive serotonin transporter from *Drosophila melanogaster*.. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 91(11):5158–5162.
- [DZITOYEVA *et al.* 2003] DZITOYEVA, SVETLANA, N. DIMITRIJEVIC *und* H. MANEV (2003). 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(9):5485–5490.
- [ENOCH 2006] ENOCH, MARY-ANNE (2006). Genetic and environmental influences on the development of alcoholism: resilience vs. risk.. *Ann N Y Acad Sci*, 1094:193–201.
- [EPSTEIN *et al.* 2002] EPSTEIN, ELIZABETH E, E. LABOUVIE, B. S. MCCRADY, N. K. JENSEN *und* J. HAYAKI (2002). A multi-site study of alcohol subtypes: classification and overlap of unidimensional and multi-dimensional typologies.. *Addiction*, 97(8):1041–1053.
- [ERSPAMER *und* VIALLI 1937] ERSPAMER, V. *und* M. VIALLI (1937). Ricerche sul secreto delle cellule enterocromaffini.. *Boll d Soc Med-chir Pavia*, 51:357–363.
- [FABRE *et al.* 2000] FABRE, V., C. BEAUFOR, A. EVRARD, A. RIOUX, N. HANOUN, K. P. LESCH, D. L. MURPHY, L. LANFUMEY, M. HAMON *und* M. P. MARTRES (2000). Altered expression and functions of serotonin 5-HT1A and 5-HT1B receptors in knock-out mice lacking the 5-HT transporter.. *Eur J Neurosci*, 12(7):2299–2310.
- [FADDA *et al.* 1991] FADDA, F, B. GARAU, F. MARCHEI, G. COLOMBO *und* G. L. GESSA (1991). MDL 72222, a selective 5-HT3 receptor antagonist, suppresses voluntary ethanol consumption in alcohol-preferring rats. *Alcohol Alcohol*, 26(2):107–110.
- [FADDA *und* ROSSETTI 1998] FADDA, F. *und* Z. L. ROSSETTI (1998). Chronic ethanol consumption: from neuroadaptation to neurodegeneration.. *Prog Neurobiol*, 56(4):385–431.
- [FELICE *und* ADAMS 2001] FELICE, L. J. DE *und* S. V. ADAMS (2001). Serotonin and norepinephrine transporters: possible relationship between oligomeric structure and channel modes of conduction.. *Mol Membr Biol*, 18(1):45–51.
- [FRIGGI-GRELIN *et al.* 2003] FRIGGI-GRELIN, FLORENCE, H. COULOM, M. MELLER, D. GOMEZ, J. HIRSH *und* S. BIRMAN (2003). Targeted gene expression in *Drosophila* dopaminergic cells using regulatory sequences from tyrosine hydroxylase.. *J Neurobiol*, 54(4):618–627.

- [GALLI *et al.* 1997] GALLI, A., C. I. PETERSEN, M. DEBLAQUIERE, R. D. BLAKELY *und* L. J. DEFELICE (1997). *Drosophila* serotonin transporters have voltage-dependent uptake coupled to a serotonin-gated ion channel.. *J Neurosci*, 17(10):3401–3411.
- [GARDIER *et al.* 2003] GARDIER, A. M., D. J. DAVID, G. JEGO, C. PRZYBYLSKI, C. JACQUOT, S. DURIER, B. GRUWEZ, E. DOUVIER, P. BEAUVERIE, N. POISSON, R. HEN *und* M. BOURIN (2003). Effects of chronic paroxetine treatment on dialysate serotonin in 5-HT1B receptor knockout mice.. *J Neurochem*, 86(1):13–24.
- [GELERNTER *et al.* 1999] GELERNTER, J., J. F. CUBELLS, J. R. KIDD, A. J. PAKSTIS *und* K. K. KIDD (1999). Population studies of polymorphisms of the serotonin transporter protein gene. *Am J Med Genet*, 88(1):61–66.
- [GELERNTER *et al.* 1997] GELERNTER, J., H. KRANZLER *und* J. F. CUBELLS (1997). Serotonin transporter protein (SLC6A4) allele and haplotype frequencies and linkage disequilibria in African- and European-American and Japanese populations and in alcohol-dependent subjects.. *Hum Genet*, 101(2):243–246.
- [GELLER 1973] GELLER, I. (1973). Effects of para-chlorophenylalanine and 5-hydroxytryptophan on alcohol intake in the rat.. *Pharmacol Biochem Behav*, 1(3):361–365.
- [GOELDNER *et al.* 2005] GOELDNER, F. O., G. PIGATTO, A. F. RIBEIRO, H. B. MACHADO *und* R. BOERNGEN-LACERDA (2005). Influence of fluoxetine and paroxetine in behavioral sensitization induced by ethanol in mice.. *Pharmacol Biochem Behav*, 82(2):388–396.
- [GONGWER *et al.* 1989] GONGWER, M A, J. M. MURPHY, W. J. MCBRIDE, L. LUMENG *und* T. K. LI (1989). Regional brain contents of serotonin, dopamine and their metabolites in the selectively bred high- and low-alcohol drinking lines of rats. *Alcohol*, 6(4):317–320.
- [GORWOOD *et al.* 2000] GORWOOD, P., P. BATEL, J. ADÃO'S, M. HAMON *und* C. BONI (2000). Serotonin transporter gene polymorphisms, alcoholism, and suicidal behavior.. *Biol Psychiatry*, 48(4):259–264.
- [GRAHAME-SMITH 1964] GRAHAME-SMITH, D. G. (1964). Tryptophan hydroxylation in brain.. *Biochem Biophys Res Commun*, 16(6):586–592.
- [GREENBERG *et al.* 1999] GREENBERG, B. D., T. J. TOLLIVER, S. J. HUANG, Q. LI, D. BENDEL *und* D. L. MURPHY (1999). Genetic variation in the serotonin transporter promoter region affects serotonin uptake in human blood platelets.. *Am J Med Genet*, 88(1):83–87.
- [GUARNIERI *und* HEBERLEIN 2003] GUARNIERI, DOUGLAS J *und* U. HEBERLEIN (2003). *Drosophila melanogaster*, a genetic model system for alcohol research.. *Int Rev Neurobiol*, 54:199–228.
- [GULLEY *et al.* 1995] GULLEY, J. M., C. MCNAMARA, T. J. BARBERA, M. C. RITZ *und* F. R. GEORGE (1995). Selective serotonin reuptake inhibitors: effects of chronic treatment on ethanol-reinforced behavior in mice.. *Alcohol*, 12(3):177–181.
- [GUNAWARDENA *und* GOLDSTEIN 2001] GUNAWARDENA, S. *und* L. S. GOLDSTEIN (2001). Disruption of axonal transport and neuronal viability by amyloid precursor protein mutations in *Drosophila*.. *Neuron*, 32(3):389–401.
- [HAASE *et al.* 2001] HAASE, J., A. M. KILLIAN, F. MAGNANI *und* C. WILLIAMS (2001). Regulation of the serotonin transporter by interacting proteins.. *Biochem Soc Trans*, 29(Pt 6):722–728.
- [HALLADAY *et al.* 2006] HALLADAY, A. K., G. C. WAGNER, A. SEKOWSKI, R. B. ROTHMAN, M. H. BAUMANN *und* H. FISHER (2006). Alterations in alcohol consumption, withdrawal seizures, and monoamine transmission in rats treated with phentermine and 5-hydroxy-L-tryptophan.. *Synapse*, 59(5):277–289.
- [HARAGUCHI *et al.* 1990] HARAGUCHI, M., H. H. SAMSON *und* G. A. TOLLIVER (1990). Reduction in oral ethanol self-administration in the rat by the 5-HT uptake blocker fluoxetine.. *Pharmacol Biochem Behav*, 35(1):259–262.

- [HARDIE 2004] HARDIE, ROGER C (2004). Regulation of Drosophila TRP channels by lipid messengers.. *Novartis Found Symp*, 258:160–7; discussion 167–71, 263–6.
- [HARDIE und HIRSH 2006] HARDIE, SHANNON L und J. HIRSH (2006). An improved method for the separation and detection of biogenic amines in adult Drosophila brain extracts by high performance liquid chromatography.. *J Neurosci Methods*, 153(2):243–249.
- [HEILS et al. 1996] HEILS, A., A. TEUFEL, S. PETRI, G. STÄUBER, P. RIEDERER, D. BENDEL und K. P. LESCH (1996). Allelic variation of human serotonin transporter gene expression.. *J Neurochem*, 66(6):2621–2624.
- [HERB 2005] HERB, ANDREA (2005). Herstellung von genetischen Werkzeugen zur Manipulation der Serotoninkonzentration in der Fliege Drosophila melanogaster. *Diplomarbeit, University of Würzburg*.
- [HEYNE 1996] HEYNE, A. (1996). The development of opiate addiction in the rat.. *Pharmacol Biochem Behav*, 53(1):11–25.
- [HIGGINS et al. 1992] HIGGINS, G. A., D. M. TOMKINS, P. J. FLETCHER und E. M. SELLERS (1992). Effect of drugs influencing 5-HT function on ethanol drinking and feeding behaviour in rats: studies using a drinkometer system.. *Neurosci Biobehav Rev*, 16(4):535–552.
- [HILL und GOLDSTEIN 1974] HILL, S. Y. und R. GOLDSTEIN (1974). Effect of p-chlorophenylalanine and stress on alcohol consumption by rats.. *Q J Stud Alcohol*, 35(1 pt A):34–41.
- [HINCKERS et al. 2006] HINCKERS, ANNE S, M. LAUCHT, M. H. SCHMIDT, K. F. MANN, G. SCHUMANN, M. A. SCHUCKIT und A. HEINZ (2006). Low level of response to alcohol as associated with serotonin transporter genotype and high alcohol intake in adolescents.. *Biol Psychiatry*, 60(3):282–287.
- [HOFFMAN et al. 1991] HOFFMAN, B. J., E. MEZEY und M. J. BROWNSTEIN (1991). Cloning of a serotonin transporter affected by antidepressants.. *Science*, 254(5031):579–580.
- [HOLDSTOCK et al. 2000] HOLDSTOCK, L., A. C. KING und H. DE WIT (2000). Subjective and objective responses to ethanol in moderate/heavy and light social drinkers.. *Alcohol Clin Exp Res*, 24(6):789–794.
- [ISHIGURO et al. 1999] ISHIGURO, H., T. SAITO, S. AKAZAWA, H. MITUSHIO, K. TADA, M. ENOMOTO, H. MIFUNE, M. TORU, H. SHIBUYA und T. ARINAMI (1999). Association between drinking-related antisocial behavior and a polymorphism in the serotonin transporter gene in a Japanese population.. *Alcohol Clin Exp Res*, 23(7):1281–1284.
- [JOHNSON et al. 2000] JOHNSON, B. A., N. AIT-DAOUD und T. J. PRIHODA (2000). Combining ondansetron and naltrexone effectively treats biologically predisposed alcoholics: from hypotheses to preliminary clinical evidence.. *Alcohol Clin Exp Res*, 24(5):737–742.
- [JOORDENS et al. 1998] JOORDENS, R. J., T. H. HIJZEN und B. OLIVIER (1998). The anxiolytic effect on the fear-potentiated startle is not due to a non-specific disruption.. *Life Sci*, 63(25):2227–2232.
- [JUST et al. 2004] JUST, HERWIG, H. H. SITTE, J. A. SCHMID, M. FREISSMUTH und O. KUDLACEK (2004). Identification of an additional interaction domain in transmembrane domains 11 and 12 that supports oligomer formation in the human serotonin transporter. *J Biol Chem*, 279(8):6650–6657.
- [KELAI et al. 2003] KELAI, SABAH, F. AISSI, K. P. LESCH, C. COHEN-SALMON, M. HAMON und L. LANFUMEY (2003). Alcohol intake after serotonin transporter inactivation in mice.. *Alcohol Alcohol*, 38(4):386–389.
- [KENT 2000] KENT, J. M. (2000). SNaRIs, NaSSAs, and NaRIs: new agents for the treatment of depression.. *Lancet*, 355(9207):911–918.
- [KHANNA et al. 1979] KHANNA, J. M., A. E. LEBLANC und A. D. LE (1979). Role of serotonin in tolerance to ethanol and barbiturates: evidence for a specific vs. non-specific concept of tolerance.. *Drug Alcohol Depend*, 4(3-4):207–219.

- [KILIC und RUDNICK 2000] KILIC, F. und G. RUDNICK (2000). Oligomerization of serotonin transporter and its functional consequences.. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 97(7):3106–3111.
- [KIM et al. 2005] KIM, DONG-KYU, T. J. TOLLIVER, S.-J. HUANG, B. J. MARTIN, A. M. ANDREWS, C. WICHEMS, A. HOLMES, K.-P. LESCH und D. L. MURPHY (2005). Altered serotonin synthesis, turnover and dynamic regulation in multiple brain regions of mice lacking the serotonin transporter.. *Neuropharmacology*, 49(6):798–810.
- [KOE und WEISSMAN 1966] KOE, B. K. und A. WEISSMAN (1966). p-Chlorophenylalanine: a specific depletor of brain serotonin.. *J Pharmacol Exp Ther*, 154(3):499–516.
- [KRANZLER et al. 2002] KRANZLER, HENRY, J. LAPPALAINEN, M. NELLISSERY und J. GELERNTER (2002). Association study of alcoholism subtypes with a functional promoter polymorphism in the serotonin transporter protein gene.. *Alcohol Clin Exp Res*, 26(9):1330–1335.
- [LE et al. 1981] LE, A. D., J. M. KHANNA, H. KALANT und A. E. LEBLANC (1981). Effect of modification of brain serotonin (5-HT), norepinephrine (NE) and dopamine (DA) on ethanol tolerance.. *Psychopharmacology (Berl)*, 75(3):231–235.
- [LEE und LUO 1999] LEE, T. und L. LUO (1999). Mosaic analysis with a repressible cell marker for studies of gene function in neuronal morphogenesis.. *Neuron*, 22(3):451–461.
- [LEJOYEUX 1996] LEJOYEUX, M. (1996). Use of serotonin (5-hydroxytryptamine) reuptake inhibitors in the treatment of alcoholism.. *Alcohol Alcohol*, 31 Suppl 1:69–75.
- [LEMARQUAND et al. 1994] LEMARQUAND, D., R. O. PIHL und C. BENKELFAT (1994). Serotonin and alcohol intake, abuse, and dependence: findings of animal studies.. *Biol Psychiatry*, 36(6):395–421.
- [LESCH et al. 1996] LESCH, K. P., D. BENDEL, A. HEILS, S. Z. SABOL, B. D. GREENBERG, S. PETRI, J. BENJAMIN, C. R. MÄLLER, D. H. HAMER und D. L. MURPHY (1996). Association of anxiety-related traits with a polymorphism in the serotonin transporter gene regulatory region.. *Science*, 274(5292):1527–1531.
- [LESCH et al. 1993] LESCH, K. P., B. L. WOLOZIN, H. C. ESTLER, D. L. MURPHY und P. RIEDERER (1993). Isolation of a cDNA encoding the human brain serotonin transporter.. *J Neural Transm Gen Sect*, 91(1):67–72.
- [LESCH 2005] LESCH, KLAUS-PETER (2005). Alcohol dependence and gene x environment interaction in emotion regulation: Is serotonin the link?. *Eur J Pharmacol*, 526(1-3):113–124.
- [LI et al. 2000] LI, H., S. CHANEY, I. J. ROBERTS, M. FORTE und J. HIRSH (2000). Ectopic G-protein expression in dopamine and serotonin neurons blocks cocaine sensitization in *Drosophila melanogaster*.. *Curr Biol*, 10(4):211–214.
- [LI et al. 1999] LI, Q., C. WICHEMS, A. HEILS, L. D. V. D. KAR, K. P. LESCH und D. L. MURPHY (1999). Reduction of 5-hydroxytryptamine (5-HT)(1A)-mediated temperature and neuroendocrine responses and 5-HT(1A) binding sites in 5-HT transporter knockout mice.. *J Pharmacol Exp Ther*, 291(3):999–1007.
- [LINNOILA et al. 1989] LINNOILA, M., J. DE JONG und M. VIRKKUNEN (1989). Family history of alcoholism in violent offenders and impulsive fire setters. *Arch Gen Psychiatry*, 46(7):613–616. *Comparative Study*.
- [LINNOILA 1989] LINNOILA, M. I. (1989). Anxiety and alcoholism.. *J Clin Psychiatry*, 50 Suppl:26–29.
- [LITT et al. 1992] LITT, M. D., T. F. BABOR, F. K. DELBOCA, R. M. KADDEN und N. L. COONEY (1992). Types of alcoholics, II. Application of an empirically derived typology to treatment matching.. *Arch Gen Psychiatry*, 49(8):609–614.
- [LITTLE et al. 1998] LITTLE, K. Y., D. P. McLAUGHLIN, L. ZHANG, C. S. LIVERMORE, G. W. DALACK, P. R. McFINTON, Z. S. DELPROPOSTO, E. HILL, B. J. CASSIN, S. J. WATSON und E. H. COOK (1998). Cocaine, ethanol, and genotype effects on human midbrain serotonin transporter binding sites and mRNA levels.. *Am J Psychiatry*, 155(2):207–213.

- [LOVENBERG *et al.* 1967] LOVENBERG, W., E. JEQUIER *und* A. SJOERDSMA (1967). Tryptophan hydroxylation: measurement in pineal gland, brainstem, and carcinoid tumor.. *Science*, 155(759):217–219.
- [LOVINGER 1997] LOVINGER, D. M. (1997). Serotonin's role in alcohol's effects on the brain.. *Alcohol Health Res World*, 21(2):114–120.
- [LOVINGER *et al.* 2000] LOVINGER, D. M., K. W. SUNG *und* Q. ZHOU (2000). Ethanol and trichloroethanol alter gating of 5-HT₃ receptor-channels in NCB-20 neuroblastoma cells.. *Neuropharmacology*, 39(4):561–570.
- [LOVINGER *et al.* 1989] LOVINGER, D. M., G. WHITE *und* F. F. WEIGHT (1989). Ethanol inhibits NMDA-activated ion current in hippocampal neurons.. *Science*, 243(4899):1721–1724.
- [LUNDELL *et al.* 1996] LUNDELL, M. J., Q. CHU-LAGRAFF, C. Q. DOE *und* J. HIRSH (1996). The engrailed and huckebein genes are essential for development of serotonin neurons in the Drosophila CNS.. *Mol Cell Neurosci*, 7(1):46–61.
- [LUNDELL *und* HIRSH 1994] LUNDELL, M. J. *und* J. HIRSH (1994). Temporal and spatial development of serotonin and dopamine neurons in the Drosophila CNS.. *Dev Biol*, 165(2):385–396.
- [LUNDELL *und* HIRSH 1998] LUNDELL, M. J. *und* J. HIRSH (1998). *egl* is required for the specification of serotonin neurons and other neuroblast 7-3 progeny in the Drosophila CNS.. *Development*, 125(3):463–472.
- [LYNESS *und* SMITH 1992] LYNESS, W. H. *und* F. L. SMITH (1992). Influence of dopaminergic and serotonergic neurons on intravenous ethanol self-administration in the rat.. *Pharmacol Biochem Behav*, 42(1):187–192.
- [MARICQ *et al.* 1991] MARICQ, A. V., A. S. PETERSON, A. J. BRAKE, R. M. MYERS *und* D. JULIUS (1991). Primary structure and functional expression of the 5HT₃ receptor, a serotonin-gated ion channel.. *Science*, 254(5030):432–437.
- [MAUREL *et al.* 1997] MAUREL, S., R. SCHREIBER *und* J. D. VRY (1997). Substitution of the selective serotonin reuptake inhibitors fluoxetine and paroxetine for the discriminative stimulus effects of ethanol in rats.. *Psychopharmacology (Berl)*, 130(4):404–406.
- [MAUREL *et al.* 1999] MAUREL, S., J. D. VRY *und* R. SCHREIBER (1999). Comparison of the effects of the selective serotonin-reuptake inhibitors fluoxetine, paroxetine, citalopram and fluvoxamine in alcohol-preferring cAA rats.. *Alcohol*, 17(3):195–201.
- [MCBRIDE *und* LI 1998] MCBRIDE, W. J. *und* T. K. LI (1998). Animal models of alcoholism: neurobiology of high alcohol-drinking behavior in rodents.. *Crit Rev Neurobiol*, 12(4):339–369.
- [MCBRIDE *et al.* 1989] MCBRIDE, W. J., J. M. MURPHY, L. LUMENG *und* T. K. LI (1989). Serotonin and ethanol preference.. *Recent Dev Alcohol*, 7:187–209.
- [MEERT 1993] MEERT, T. F. (1993). Effects of various serotonergic agents on alcohol intake and alcohol preference in Wistar rats selected at two different levels of alcohol preference.. *Alcohol Alcohol*, 28(2):157–170.
- [MEIGEN 1830] MEIGEN, JOHAN WILHELM (1830). Systematische Beschreibung der bekannten europäischen zweiflügeligen Insekten. *Hamm, Schulzische Buchhandlung*.
- [MELCHIOR *und* TABAKOFF 1986] MELCHIOR, C. L. *und* B. TABAKOFF (1986). The effect of 5,7-dihydroxytryptamine treatment on the response to ethanol in mice.. *Pharmacol Biochem Behav*, 24(4):955–961.
- [MIHIC 1999] MIHIC, S. J. (1999). Acute effects of ethanol on GABA_A and glycine receptor function.. *Neurochem Int*, 35(2):115–123.
- [MOORE *et al.* 1998] MOORE, M. S., J. DEZAZZO, A. Y. LUK, T. TULLY, C. M. SINGH *und* U. HEBERLEIN (1998). Ethanol intoxication in Drosophila: Genetic and pharmacological evidence for regulation by the cAMP signaling pathway.. *Cell*, 93(6):997–1007.

- [MOROZOVA *et al.* 2006] MOROZOVA, TATIANA V, R. R. H. ANHOLT *und* T. F. C. MACKAY (2006). Transcriptional response to alcohol exposure in *Drosophila melanogaster*.. *Genome Biol*, 7(10):R95.
- [MORTENSEN *et al.* 1999] MORTENSEN, O. V., M. THOMASSEN, M. B. LARSEN, S. R. WHITTEMORE *und* O. WIBORG (1999). Functional analysis of a novel human serotonin transporter gene promoter in immortalized raphe cells.. *Brain Res Mol Brain Res*, 68(1-2):141–148.
- [MURPHY *et al.* 1982] MURPHY, J. M., W. J. MCBRIDE, L. LUMENG *und* T. K. LI (1982). Regional brain levels of monoamines in alcohol-preferring and -nonpreferring lines of rats.. *Pharmacol Biochem Behav*, 16(1):145–149.
- [MYERS *und* CICERO 1969] MYERS, R. D. *und* T. J. CICERO (1969). Effects of serotonin depletion on the volitional alcohol intake of rats during a condition of psychological stress.. *Psychopharmacologia*, 15(5):373–381.
- [NAESSEL *und* ELEKES 1992] NAESSEL, D. R. *und* K. ELEKES (1992). Aminergic neurons in the brain of blowflies and *Drosophila*: dopamine- and tyrosine hydroxylase-immunoreactive neurons and their relationship with putative histaminergic neurons.. *Cell Tissue Res*, 267(1):147–167.
- [NARANJO *und* BREMNER 1994] NARANJO, C. A. *und* K. E. BREMNER (1994). Serotonin-altering medications and desire, consumption and effects of alcohol-treatment implications.. *EXS*, 71:209–219.
- [NARANJO *et al.* 1990] NARANJO, C. A., K. E. KADLEC, P. SANHUEZA, D. WOODLEY-REMUS *und* E. M. SELLERS (1990). Fluoxetine differentially alters alcohol intake and other consummatory behaviors in problem drinkers.. *Clin Pharmacol Ther*, 47(4):490–498.
- [NARANJO *und* KNOKE 2001] NARANJO, C. A. *und* D. M. KNOKE (2001). The role of selective serotonin reuptake inhibitors in reducing alcohol consumption.. *J Clin Psychiatry*, 62 Suppl 20:18–25.
- [NECKAMEYER *et al.* 2007] NECKAMEYER, W. S., C. M. COLEMAN, S. EADIE *und* S. F. GOODWIN (2007). Compartmentalization of neuronal and peripheral serotonin synthesis in *Drosophila melanogaster*.. *Genes Brain Behav*.
- [NESTLER *et al.* 2001] NESTLER, ERIC J., S. E. HYMAN *und* R. C. MALENKA (2001). Molecular Basis of Neuropharmacology: A Foundation for Clinical Neuroscience. *McGraw-Hill Medical*.
- [NEWLIN *und* THOMSON 1999] NEWLIN, D. B. *und* J. B. THOMSON (1999). Chronic tolerance and sensitization to alcohol in sons of alcoholics: II. Replication and reanalysis.. *Exp Clin Psychopharmacol*, 7(3):234–243.
- [NIE *et al.* 1994] NIE, Z., S. G. MADAMBA *und* G. R. SIGGINS (1994). Ethanol inhibits glutamatergic neurotransmission in nucleus accumbens neurons by multiple mechanisms.. *J Pharmacol Exp Ther*, 271(3):1566–1573.
- [O'REILLY *und* REITH 1988] O'REILLY, C. A. *und* M. E. REITH (1988). Uptake of [3H]serotonin into plasma membrane vesicles from mouse cerebral cortex.. *J Biol Chem*, 263(13):6115–6121.
- [PANOCKA *et al.* 1995] PANOCKA, I, R. CICCOCIOPPO, C. POLIDORI, P. POMPEI *und* M. MASSI (1995). The 5-HT₄ receptor antagonist, GR113808, reduces ethanol intake in alcohol-preferring rats. *Pharmacol Biochem Behav*, 52(2):255–259.
- [PARK *et al.* 2000] PARK, S. K., S. A. SEDORE, C. CRONMILLER *und* 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(27):20588–20596.
- [PARR *et al.* 2001] PARR, J., A. LARGE, X. WANG, S. C. FOWLER, K. L. RATZLAFF *und* D. M. RUDEN (2001). The inebri-actometer: a device for measuring the locomotor activity of *Drosophila* exposed to ethanol vapor.. *J Neurosci Methods*, 107(1-2):93–99.
- [PENDLETON *et al.* 2002] PENDLETON, ROBERT G, F. PARVEZ, M. SAYED *und* R. HILLMAN (2002). Effects of pharmacological agents upon a transgenic model of Parkinson's disease in *Drosophila melanogaster*.. *J Pharmacol Exp Ther*, 300(1):91–96.

- [PENICK *et al.* 1999] PENICK, E. C., E. J. NICKEL, B. J. POWELL, B. I. LISKOW, J. CAMPBELL, T. M. DALE, R. E. HASSANEIN *und* E. NOBLE (1999). The comparative validity of eleven alcoholism typologies.. *J Stud Alcohol*, 60(2):188–202.
- [PETERSEN *und* DEFELICE 1999] PETERSEN, C. I. *und* L. J. DEFELICE (1999). Ionic interactions in the Drosophila serotonin transporter identify it as a serotonin channel.. *Nat Neurosci*, 2(7):605–610.
- [PHILLIPS *et al.* 1998] PHILLIPS, T. J., K. J. BROWN, S. BURKHART-KASCH, C. D. WENGER, M. A. KELLY, M. RUBINSTEIN, D. K. GRANDY *und* M. J. LOW (1998). Alcohol preference and sensitivity are markedly reduced in mice lacking dopamine D2 receptors.. *Nat Neurosci*, 1(7):610–615.
- [PICKEL *und* CHAN 1999] PICKEL, V. M. *und* J. CHAN (1999). Ultrastructural localization of the serotonin transporter in limbic and motor compartments of the nucleus accumbens.. *J Neurosci*, 19(17):7356–7366.
- [PORSCH 2002] PORSCH, MATTHIAS (2002). OMB and ORG-1: Homologous Drosophila T-box proteins with functional specificity. *Doktorarbeit, Julius-Maximilians-Universität Würzburg*.
- [QUICKFALL *und* EL GUEBALY 2006] QUICKFALL, JEREMY *und* N. EL GUEBALY (2006). Genetics and alcoholism: how close are we to potential clinical applications?. *Can J Psychiatry*, 51(7):461–467.
- [RAMAMOORTHY *und* BLAKELY 1999] RAMAMOORTHY, S. *und* R. D. BLAKELY (1999). Phosphorylation and sequestration of serotonin transporters differentially modulated by psychostimulants.. *Science*, 285(5428):763–766.
- [RAMSEY *und* DEFELICE 2002] RAMSEY, I. SCOTT *und* L. J. DEFELICE (2002). Serotonin transporter function and pharmacology are sensitive to expression level: evidence for an endogenous regulatory factor.. *J Biol Chem*, 277(17):14475–14482.
- [RAPPORT *et al.* 1948a] RAPPORT, MM, A. GREEN *und* I. PAGE (1948a). Crystalline Serotonin.. *Science*, 108:329–330.
- [RAPPORT *et al.* 1948b] RAPPORT, MM, A. GREEN *und* I. PAGE (1948b). Partial purification of the vasoconstrictor in beef serum.. *J Biol Chem*, 174:735–738.
- [RATTRAY *et al.* 1999] RATTRAY, M., G. J. MICHAEL, J. LEE, G. WOTHERSPOON, C. BENDOTTI *und* J. V. PRIESTLEY (1999). Intraregional variation in expression of serotonin transporter messenger RNA by 5-hydroxytryptamine neurons.. *Neuroscience*, 88(1):169–183.
- [RENN *et al.* 1999] RENN, S. C., J. D. ARMSTRONG, M. YANG, Z. WANG, X. AN, K. KAISER *und* P. H. TAGHERT (1999). Genetic analysis of the Drosophila ellipsoid body neuropil: organization and development of the central complex.. *J Neurobiol*, 41(2):189–207.
- [ROBERTS *et al.* 1998] ROBERTS, A. J., R. A. MCARTHUR, E. E. HULL, C. POST *und* G. F. KOOB (1998). Effects of amperozide, 8-OH-DPAT, and FG 5974 on operant responding for ethanol.. *Psychopharmacology (Berl)*, 137(1):25–32.
- [RODAN *et al.* 2002] RODAN, AYLIN R, J. A. KIGER *und* U. HEBERLEIN (2002). Functional dissection of neuroanatomical loci regulating ethanol sensitivity in Drosophila.. *J Neurosci*, 22(21):9490–9501.
- [RODRIGUEZ *et al.* 2003] RODRIGUEZ, G. J., D. L. ROMAN, K. J. WHITE, D. E. NICHOLS *und* E. L. BARKER (2003). Distinct recognition of substrates by the human and Drosophila serotonin transporters.. *J Pharmacol Exp Ther*, 306(1):338–346.
- [ROSENTHAL *et al.* 1980] ROSENTHAL, N E, Y. DAVENPORT, R. W. COWDRY, M. H. WEBSTER *und* F. K. GOODWIN (1980). Monoamine metabolites in cerebrospinal fluid of depressive subgroups. *Psychiatry Res*, 2(1):113–119.
- [ROTHENFLUH *et al.* 2006] ROTHENFLUH, ADRIAN, R. J. THRELKELD, R. J. BAINTON, L. T.-Y. TSAI, A. W. LASEK *und* U. HEBERLEIN (2006). Distinct behavioral responses to ethanol are regulated by alternate RhoGAP18B isoforms.. *Cell*, 127(1):199–211.

- [RUBINSTEIN *et al.* 1997] RUBINSTEIN, M., T. J. PHILLIPS, J. R. BUNZOW, T. L. FALZONE, G. DZIEWCZAPOLSKI, G. ZHANG, Y. FANG, J. L. LARSON, J. A. MCDUGALL, J. A. CHESTER, C. SAEZ, T. A. PUGSLEY, O. GERSHANIK, M. J. LOW *und* D. K. GRANDY (1997). Mice lacking dopamine D4 receptors are supersensitive to ethanol, cocaine, and methamphetamine.. *Cell*, 90(6):991–1001.
- [RUDNICK 2006] RUDNICK, GARY (2006). Serotonin transporters - structure and function.. *J Membr Biol*, 213(2):101–110.
- [SCHOLZ *et al.* 2000] SCHOLZ, H., J. RAMOND, C. M. SINGH *und* U. HEBERLEIN (2000). Functional ethanol tolerance in *Drosophila*.. *Neuron*, 28(1):261–271.
- [SCHOLZ *et al.* 2005] SCHOLZ, HENRIKE, M. FRANZ *und* U. HEBERLEIN (2005). The hangover gene defines a stress pathway required for ethanol tolerance development.. *Nature*, 436(7052):845–847.
- [SCHUCKIT 1998] SCHUCKIT, M. A. (1998). Biological, psychological and environmental predictors of the alcoholism risk: a longitudinal study.. *J Stud Alcohol*, 59(5):485–494.
- [SCHUCKIT *und* SMITH 2000] SCHUCKIT, M. A. *und* T. L. SMITH (2000). The relationships of a family history of alcohol dependence, a low level of response to alcohol and six domains of life functioning to the development of alcohol use disorders.. *J Stud Alcohol*, 61(6):827–835.
- [SELLERS *et al.* 1991] SELLERS, E. M., G. A. HIGGINS, D. M. TOMKINS, M. K. ROMACH *und* T. TONEATTO (1991). Opportunities for treatment of psychoactive substance use disorders with serotonergic medications.. *J Clin Psychiatry*, 52 Suppl:49–54.
- [SIGGINS *et al.* 2005] SIGGINS, GEORGE ROBERT, M. ROBERTO *und* Z. NIE (2005). The tipsy terminal: presynaptic effects of ethanol.. *Pharmacol Ther*, 107(1):80–98.
- [SINGH *und* HEBERLEIN 2000] SINGH, C. M. *und* U. HEBERLEIN (2000). Genetic control of acute ethanol-induced behaviors in *Drosophila*.. *Alcohol Clin Exp Res*, 24(8):1127–1136.
- [SNELL *und* REED 1993] SNELL, G. D. *und* S. REED (1993). William Ernest Castle, pioneer mammalian geneticist.. *Genetics*, 133(4):751–753.
- [SWEENEY *et al.* 1995] SWEENEY, S. T., K. BROADIE, J. KEANE, H. NIEMANN *und* C. J. O’KANE (1995). Targeted expression of tetanus toxin light chain in *Drosophila* specifically eliminates synaptic transmission and causes behavioral defects.. *Neuron*, 14(2):341–351.
- [TABAKOFF *et al.* 1986] TABAKOFF, B., N. CORNELL *und* P. L. HOFFMAN (1986). Alcohol tolerance.. *Ann Emerg Med*, 15(9):1005–1012.
- [TAMBOUR *und* QUERTEMONT 2007] TAMBOUR, SOPHIE *und* E. QUERTEMONT (2007). Preclinical and clinical pharmacology of alcohol dependence.. *Fundam Clin Pharmacol*, 21(1):9–28.
- [TATE *und* BLAKELY 1994] TATE, C. G. *und* R. D. BLAKELY (1994). The effect of N-linked glycosylation on activity of the Na(+)- and Cl(-)-dependent serotonin transporter expressed using recombinant baculovirus in insect cells.. *J Biol Chem*, 269(42):26303–26310.
- [TATE *et al.* 2003] TATE, CHRISTOPHER G, J. HAASE, C. BAKER, M. BOORSMA, F. MAGNANI, Y. VALLIS *und* D. C. WILLIAMS (2003). Comparison of seven different heterologous protein expression systems for the production of the serotonin transporter.. *Biochim Biophys Acta*, 1610(1):141–153.
- [THIELE *et al.* 2000] THIELE, T. E., B. WILLIS, J. STADLER, J. G. REYNOLDS, I. L. BERNSTEIN *und* G. S. MCKNIGHT (2000). High ethanol consumption and low sensitivity to ethanol-induced sedation in protein kinase A-mutant mice.. *J Neurosci*, 20(10):RC75.

- [THOME *et al.* 2000] THOME, J., J. C. GEWIRTZ, H. G. WEIJERS, G. A. WIESBECK *und* F. A. HENN (2000). Genome polymorphism and alcoholism.. *Pharmacogenomics*, 1(1):63–71.
- [TOMKINS *und* O'NEILL 2000] TOMKINS, D M *und* M. F. O'NEILL (2000). Effect of 5-HT1B receptor ligands on self-administration of ethanol in an operant procedure in rats. *Pharmacol Biochem Behav*, 66(1):129–136.
- [TOWER *et al.* 1993] TOWER, J., G. H. KARPEN, N. CRAIG *und* A. C. SPRADLING (1993). Preferential transposition of *Drosophila* P elements to nearby chromosomal sites.. *Genetics*, 133(2):347–359.
- [TUERKER *et al.* 1998] TUERKER, T., R. SODMANN, U. GOEBEL, S. JATZKE, M. KNAPP, K. P. LESCH, R. SCHUSTER, H. SCHÄTZ, G. WEILER *und* G. STÄUBER (1998). High ethanol tolerance in young adults is associated with the low-activity variant of the promoter of the human serotonin transporter gene.. *Neurosci Lett*, 248(3):147–150.
- [TURNER *et al.* 2006] TURNER, ERICK H, J. M. LOFTIS *und* A. D. BLACKWELL (2006). Serotonin a la carte: supplementation with the serotonin precursor 5-hydroxytryptophan.. *Pharmacol Ther*, 109(3):325–338.
- [TWAROG *und* PAGE 1953] TWAROG, B M *und* I. H. PAGE (1953). Serotonin content of some mammalian tissues and urine and a method for its determination. *Am J Physiol*, 175(1):157–161.
- [URIZAR *et al.* 2007] URIZAR, NANCY L, Z. YANG, H. J. EDENBERG *und* 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(17):4541–4551.
- [VALLES *und* WHITE 1986] VALLES, A M *und* K. WHITE (1986). Development of serotonin-containing neurons in *Drosophila* mutants unable to synthesize serotonin. *J Neurosci*, 6(5):1482–1491.
- [VALLES *und* WHITE 1988] VALLES, A M *und* K. WHITE (1988). Serotonin-containing neurons in *Drosophila melanogaster*: development and distribution. *J Comp Neurol*, 268(3):414–428.
- [VALLES *und* WHITE 1990] VALLES, A M *und* K. WHITE (1990). Serotonin synthesis and distribution in *Drosophila* dopa decarboxylase genetic mosaics. *J Neurosci*, 10(11):3646–3652.
- [VAYSSE *et al.* 1988] VAYSSE, G., M. GALISSIÀ *und* M. CORBIÀRE (1988). Induced variation of serotonin in *Drosophila melanogaster* and its relation to learning performance.. *J Comp Psychol*, 102(3):225–229.
- [VERHEUL 2001] VERHEUL, R. (2001). Co-morbidity of personality disorders in individuals with substance use disorders.. *Eur Psychiatry*, 16(5):274–282.
- [VIRKKUNEN *und* LINNOILA 1997] VIRKKUNEN, M. *und* M. LINNOILA (1997). Serotonin in early-onset alcoholism.. *Recent Dev Alcohol*, 13:173–189.
- [WALTHER *und* BADER 2003] WALTHER, DIEGO J *und* M. BADER (2003). A unique central tryptophan hydroxylase isoform.. *Biochem Pharmacol*, 66(9):1673–1680.
- [WANG *et al.* 1996] WANG, J. Y., A. Y. SHUM, T. C. LIN *und* Y. WANG (1996). Central serotonergic lesions increase voluntary alcohol consumption in Sprague Dawley rats: moderation by long-term ethanol administration.. *Alcohol Clin Exp Res*, 20(7):1252–1259.
- [WEINER *et al.* 1994] WEINER, J L, L. ZHANG *und* P. L. CARLEN (1994). Guanosine phosphate analogs modulate ethanol potentiation of GABAA-mediated synaptic currents in hippocampal CA1 neurons. *Brain Res*, 665(2):307–310.
- [WEISS *et al.* 1993] WEISS, F., M. T. LORANG, F. E. BLOOM *und* G. F. KOOB (1993). Oral alcohol self-administration stimulates dopamine release in the rat nucleus accumbens: genetic and motivational determinants.. *J Pharmacol Exp Ther*, 267(1):250–258.

- [WEN *et al.* 2005] WEN, TIEQIAO, C. A. PARRISH, D. XU, Q. WU *und* P. SHEN (2005). Drosophila neuropeptide F and its receptor, NPFR1, define a signaling pathway that acutely modulates alcohol sensitivity.. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 102(6):2141–2146.
- [WOLF *und* HEBERLEIN 2003] WOLF, FRED W *und* U. HEBERLEIN (2003). Invertebrate models of drug abuse.. *J Neurobiol*, 54(1):161–178.
- [WOLFFGRAMM *und* HEYNE 1995] WOLFFGRAMM, J. *und* A. HEYNE (1995). From controlled drug intake to loss of control: the irreversible development of drug addiction in the rat.. *Behav Brain Res*, 70(1):77–94.
- [WU *et al.* 1994] WU, G., P. H. TONNER *und* K. W. MILLER (1994). Ethanol stabilizes the open channel state of the Torpedo nicotinic acetylcholine receptor.. *Mol Pharmacol*, 45(1):102–108.
- [YOSHIMOTO *et al.* 1992] YOSHIMOTO, K., W. J. MCBRIDE, L. LUMENG *und* T. K. LI (1992). Ethanol enhances the release of dopamine and serotonin in the nucleus accumbens of HAD and LAD lines of rats.. *Alcohol Clin Exp Res*, 16(4):781–785.
- [YUAN *et al.* 2006] YUAN, QUAN, W. J. JOINER *und* A. SEHGAL (2006). A sleep-promoting role for the Drosophila serotonin receptor 1A.. *Curr Biol*, 16(11):1051–1062.
- [YUAN *et al.* 2005] YUAN, QUAN, F. LIN, X. ZHENG *und* A. SEHGAL (2005). Serotonin modulates circadian entrainment in Drosophila.. *Neuron*, 47(1):115–127.
- [ZABIK *und* ROACHE 1983] ZABIK, J. E. *und* J. D. ROACHE (1983). 5-hydroxytryptophan-induced conditioned taste aversion to ethanol in the rat.. *Pharmacol Biochem Behav*, 18(5):785–790.
- [ZABIK *et al.* 1994] ZABIK, J. E., J. E. SPRAGUE *und* K. BINKERD (1994). Central and peripheral components of the inhibitory actions of 5-HTP on ethanol consumption in the rat.. *Pharmacol Biochem Behav*, 47(3):547–551.
- [ZAHNISER *und* DOOLEN 2001] ZAHNISER, N. R. *und* S. DOOLEN (2001). Chronic and acute regulation of Na⁺/Cl⁻ - dependent neurotransmitter transporters: drugs, substrates, presynaptic receptors, and signaling systems.. *Pharmacol Ther*, 92(1):21–55.
- [ZHANG *et al.* 2005] ZHANG, YONG Q, D. B. FRIEDMAN, Z. WANG, E. WOODRUFF, L. PAN, J. O'DONNELL *und* K. BROADIE (2005). Protein expression profiling of the drosophila fragile X mutant brain reveals up-regulation of monoamine synthesis.. *Mol Cell Proteomics*, 4(3):278–290.
- [ZHOU *et al.* 1998] ZHOU, F. C., J. H. TAO-CHENG, L. SEGU, T. PATEL *und* Y. WANG (1998). Serotonin transporters are located on the axons beyond the synaptic junctions: anatomical and functional evidence.. *Brain Res*, 805(1-2):241–254.

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
5HT	5-Hydroxytryptamin
SERT	Serotonin Transporter
dSERT	Drosophila SERT
hSERT	humaner SERT
rSERT	Ratten SERT
5HTR	5-Hydroxytryptamin Rezeptor
wt	Wildtyp

<i>sert1+2</i> -GAL4	Serotonin Transporterkonstrukt 1+2 GAL4 Linie
<i>5htr1b</i> -GAL4	<i>5htr1b</i> Konstrukt
<i>sert</i> ⁵⁵	Hypomorph des <i>dsert</i>
<i>uas</i>	upstream activator sequenz
<i>uas-sert</i> ³⁴	wiltypisches <i>uas-sert</i> Konstrukt 34
<i>uas-sert</i> ^{DN15}	dominant negatives <i>uas-sert</i> Konstrukt 15
<i>uas-sert</i> ^{DN29}	dominant negatives <i>uas-sert</i> Konstrukt 29
5HTP	5-Hydroxytryptophan
p-CPA	p-Chlorphenylalanin
<i>ddc</i>	Dopamin Decarboxylase
<i>th</i>	Tyramin Hydroxylase
NHS	<i>normal horse serum</i>
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
ad	hinzufügen
max.	Maximum
bzw.	beziehungsweise
z.B.	zum Beispiel
etc.	et cetera
et al.	et alii (und andere)

A. Anhang: Tabellen

Tab. A.1.: MET1, MET2 und Ethanol toleranz nach Fütterung von 5HTP

5HTP	MET1	SEM	MET2	SEM	Toleranz %	SEM	n=
Vehikel	23,79	0,54	30,99	0,56	22,66	2,71	16
0,04 mg	23,4	0,35	30,41	0,88	22,58	3,01	7
0,4 mg	22,72	0,82	28,3	0,91	19,3	3,34	8
4 mg	23,11	0,52	30,06	0,5	22,88	2,09	14

Tab. A.2.: MET1, MET2 und Ethanol toleranz nach Fütterung von p-CPA

p-CPA	MET1	SEM	MET2	SEM	Toleranz %	SEM	n=
Vehikel	24,21	0,65	31,39	0,57	22,76	2,1	12
0,1 mg	24,11	0,94	30,22	0,95	23,94	4,62	3
1 mg	25,24	2,01	31,38	0,73	19,92	3,61	4
10 mg	21,98	0,37	29	0,83	20,59	2,55	8

Tab. A.3.: MET1, MET2 und Ethanol toleranz nach Fütterung von Paroxetin.

Paroxetin	MET1	SEM	MET2	SEM	Toleranz %	SEM	n=
Vehikel	23,73	0,54	31,07	0,4	23,43	1,99	16
0,01 mg	23,42	0,42	29,96	0,74	22,01	2,02	12
0,1 mg	24,64	0,63	31,82	1,31	22,38	2,26	12
1 mg	21,27	1,22	25,82	1,31	17,2	2,26	12

Tab. A.4.: MET1, MET2 und Ethanol toleranz nach Überexpression des dSERT in Neuronen.

	MET1	SEM	MET2	SEM	Toleranz %	SEM	n=
<i>w¹¹¹⁸</i>	17,73	0,39	24,96	1,12	28,21	2,93	8
<i>w¹¹¹⁸, uas-sert³⁴/+</i>	17,84	0,87	24,74	1,11	27,79	1,96	8
<i>w¹¹¹⁸, appl-GAL4/+</i>	19,74	0,44	29,65	0,95	33,23	1,12	8
<i>appl-GAL4/uas-sert³⁴</i>	17,64	0,56	25,83	0,65	31,71	1,33	8

Tab. A.5.: MET1, MET2 und Ethanol toleranz nach Inaktivierung des dSERT(15) in Neuronen.

	MET1	SEM	MET2	SEM	Toleranz%	SEM	n=
<i>w¹¹¹⁸</i>	17,47	0,43	24,45	0,91	27,66	3,62	8
<i>w¹¹¹⁸, +, uas-sert^{DN15}/+</i>	21,01	0,73	28,66	1,03	26,64	0,87	8
<i>w¹¹¹⁸, appl-GAL4/+</i>	15,7	0,44	23,74	0,9	33,47	2,27	8
<i>appl-GAL4/+, uas-sert^{DN15}/+</i>	16,2	0,29	22,94	0,51	29,2	1,58	8

Tab. A.6.: MET1, MET2 und Ethanol toleranz nach Inaktivierung des dSERT(29) in Neuronen.

	MET1	SEM	MET2	SEM	Toleranz%	SEM	n=
<i>w¹¹¹⁸</i>	18,44	0,39	26,52	0,8	30,46	1,88	12
<i>w¹¹¹⁸, uas-sert^{DN29}/+</i>	24,18	0,23	34,34	0,36	29,6	0,67	12
<i>w¹¹¹⁸, appl-GAL4/+</i>	18,32	0,41	27,86	0,83	33,76	2,05	12
<i>appl-GAL4/uas-sert^{DN29}</i>	19,74	0,23	27,93	0,36	29,29	0,67	12

Tab. A.7.: MET1, MET2 und Ethanol toleranz nach Inhibition von serotonergen und dopaminergen Neuronen.

	MET1	SEM	MET2	SEM	Toleranz%	SEM	n=
<i>w¹¹¹⁸</i>	19,23	0,46	28,63	1,19	32,09	2,37	10
<i>w¹¹¹⁸, +, ddc-GAL4/+</i>	18,62	0,41	27,78	0,57	32,91	1,03	9
<i>w¹¹¹⁸, uas-tnt/+</i>	16,68	0,37	23,88	1,11	29,57	2,41	7
<i>uas-tnt/+, ddc-GAL4/+</i>	18,12	0,51	26,07	0,62	30,45	1,4	9

Tab. A.8.: MET1, MET2 und Ethanol toleranz nach Inhibition einer Untergruppe von serotonergen Neuronen.

	MET1	SEM	MET2	SEM	Toleranz%	SEM	n=
<i>w</i> ¹¹¹⁸	19,12	0,49	27,5	0,33	30,41	1,78	12
<i>w</i> ¹¹¹⁸ , <i>sert1+2-GAL4</i>	18,93	0,72	28,62	0,71	33,75	2,28	11
<i>w</i> ¹¹¹⁸ , <i>uas-tnt/+</i>	16,67	0,39	24,59	0,63	31,95	1,66	12
<i>sert1+2, uas-tnt/+</i>	15,13	0,37	23,23	0,84	34,32	2	12

Tab. A.9.: MET1, MET2 und Ethanol toleranz nach Überexpression des dSERT in einer Untergruppe von serotonergen Neuronen.

	MET1	SEM	MET2	SEM	Toleranz%	SEM	n=
<i>w</i> ¹¹¹⁸	20,84	0,75	27,63	0,5	24,62	1,93	8
<i>w</i> ¹¹¹⁸ , <i>sert1+2-GAL4</i>	19,58	0,57	26,93	0,79	27,08	2,21	8
<i>w</i> ¹¹¹⁸ , <i>uas-sert</i> ³⁴ / <i>+</i>	19,55	0,67	29,22	1,01	33,05	1,25	5
<i>sert1+2, uas-sert</i> ³⁴ / <i>+</i>	19,37	0,84	26,96	0,89	27,69	3,97	7

Tab. A.10.: MET1, MET2 und Ethanol toleranz nach Inhibition von 5HT Rezeptor Neuronen.

	MET1	SEM	MET2	SEM	Toleranz%	SEM	n=
<i>w</i> ¹¹¹⁸	22,64	1,54	28,4	1,37	20,77	1,93	8
<i>w</i> ¹¹¹⁸ , +, <i>5htr1b-GAL4/+</i>	23,26	1,05	27,61	1	15,89	1,49	8
<i>w</i> ¹¹¹⁸ , <i>uas-tnt/+</i>	18,7	0,93	25,35	1,27	25,78	2,97	8
<i>uas-tnt/+</i> , <i>5htr1b-GAL4/+</i>	12,57	0,95	13,72	0,88	8,75	2,45	6

Tab. A.11.: MET2 und Ethanol toleranz nach Inhibition von 5HT Rezeptor Neuronen und 10 min EtOH Begasung.

10min.	MET2	SEM	n=
<i>w</i> ¹¹¹⁸	24,65	1,14	7
<i>w</i> ¹¹¹⁸ , +, <i>5htr1b-GAL4/+</i>	24,96	0,45	6
<i>w</i> ¹¹¹⁸ , <i>uas-tnt/+</i>	20,84	0,4	7
<i>uas-tnt/+</i> , <i>5htr1b-GAL4/+</i>	12,5	1,06	7

Tab. A.12.: MET2 nach Inhibition von 5HT Rezeptor Neuronen und 20 min EtOH Begasung.

20min.	MET2	SEM	n=
<i>w</i> ¹¹¹⁸	26,2	1,46	6
<i>w</i> ¹¹¹⁸ , +, <i>5htr1b</i> -GAL4/+	25,75	0,93	6
<i>w</i> ¹¹¹⁸ , <i>uas-tnt</i> /+	25,14	1,07	7
<i>uas-tnt</i> /+, <i>5htr1b</i> -GAL4/+	11,24	0,78	9

Tab. A.13.: MET1, MET2 und Ethanol toleranz nach Inhibition von dopaminergen Neuronen.

	MET1	SEM	MET2	SEM	Toleranz%	SEM	n=
<i>w</i> ¹¹¹⁸	19,64	0,68	29,19	1,5	31,84	2,19	12
<i>w</i> ¹¹¹⁸ , +, <i>th</i> -GAL4/+	18,78	0,89	28,64	0,66	34,41	2,52	12
<i>w</i> ¹¹¹⁸ , <i>uas-tnt</i> /+	15,94	0,55	23,15	0,56	31,1	1,78	12
<i>uas-tnt</i> /+, <i>th</i> -GAL4/+	12,4	0,48	16,71	0,57	25,53	2,07	12

Tab. A.14.: MET1, MET2 und Ethanol toleranz einer hypomorphen dSERT Linie mit Deletion in der 5' Promotorregion des dSERT.

	MET1	SEM	MET2	SEM	Toleranz%	SEM	n=
<i>w</i> ¹¹¹⁸	21,94	0,37	29,37	0,46	25,19	1,17	12
<i>w</i> ¹¹¹⁸ , <i>sert</i> ⁵⁵ /+	21,54	0,68	27,91	0,59	22,72	2,72	8
<i>sert</i> ⁵⁵ / <i>sert</i> ⁵⁵	20,88	0,31	25,48	0,41	18	0,9	12

B. Anhang: Bilder

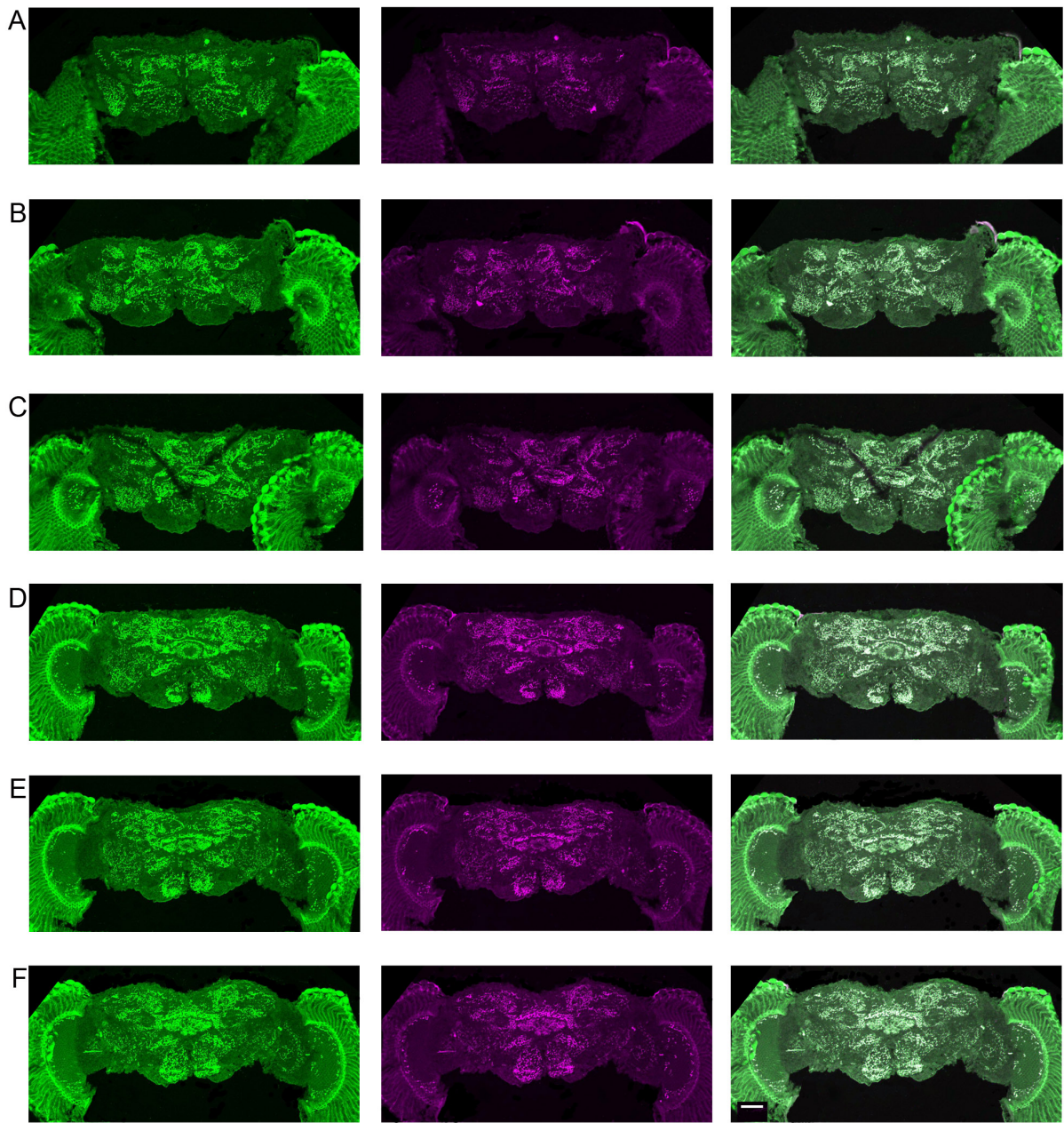


Abb. B.1.: dSERT und 5HT Antikörperfärbungen. Gefrierschnitte vom Kopf einer männlicher CantonS Fliege wurden angefertigt. Die linke Reihe zeigt die dSERT Antikörperfärbung (grün), in der Mitte ist die 5HT Färbung (magenta) zu sehen und die rechte Spalte zeigt die Kolokalisation der dSERT Antikörperfärbung mit 5HT. Gefrierschnitte A-F (weißer Balken $50 = \mu\text{m}$).

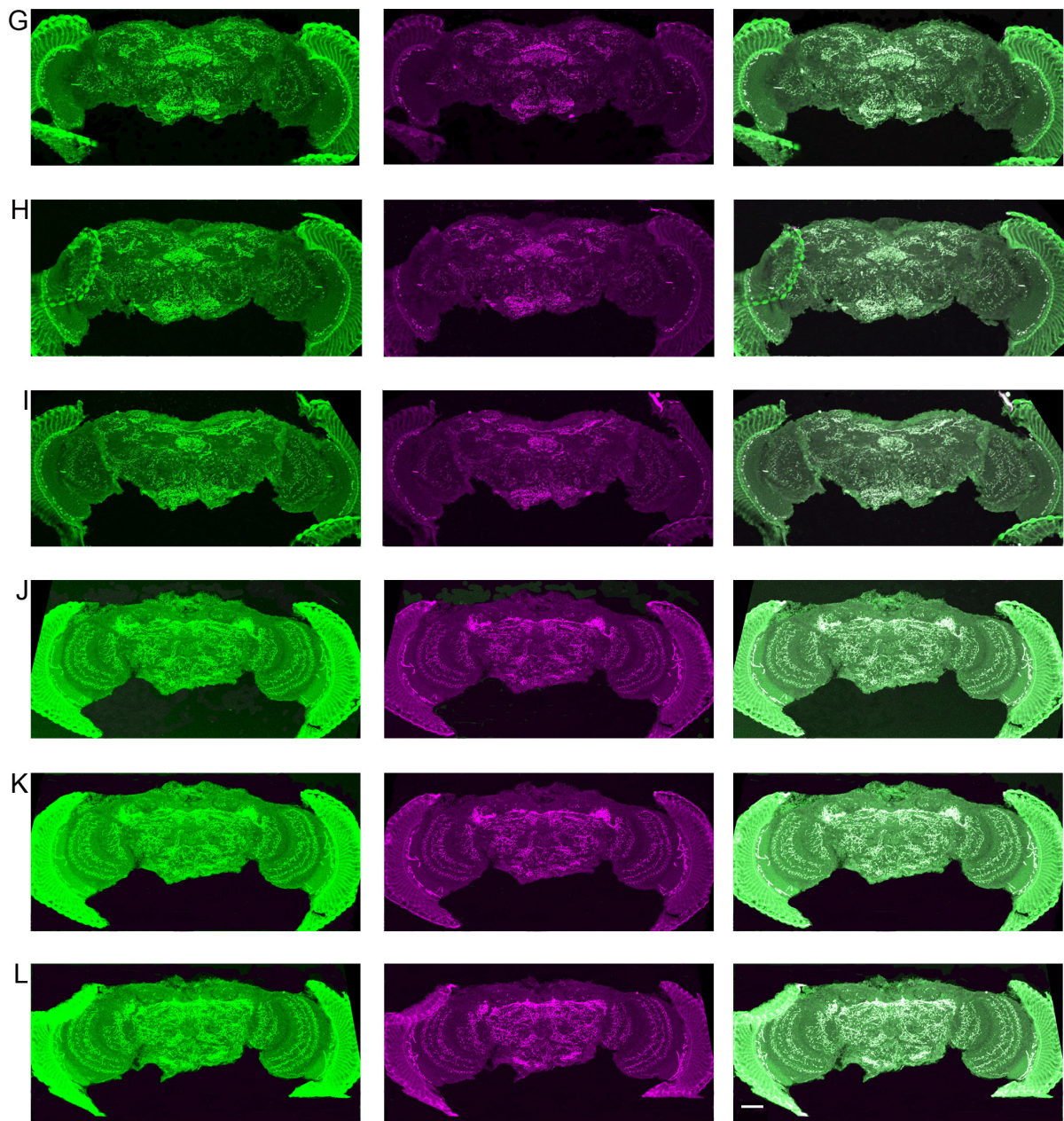


Abb. B.2.: dSERT und 5HT Antikörperfärbungen. Gefrierschnitte G-L (weißer Balken 50 = μm).

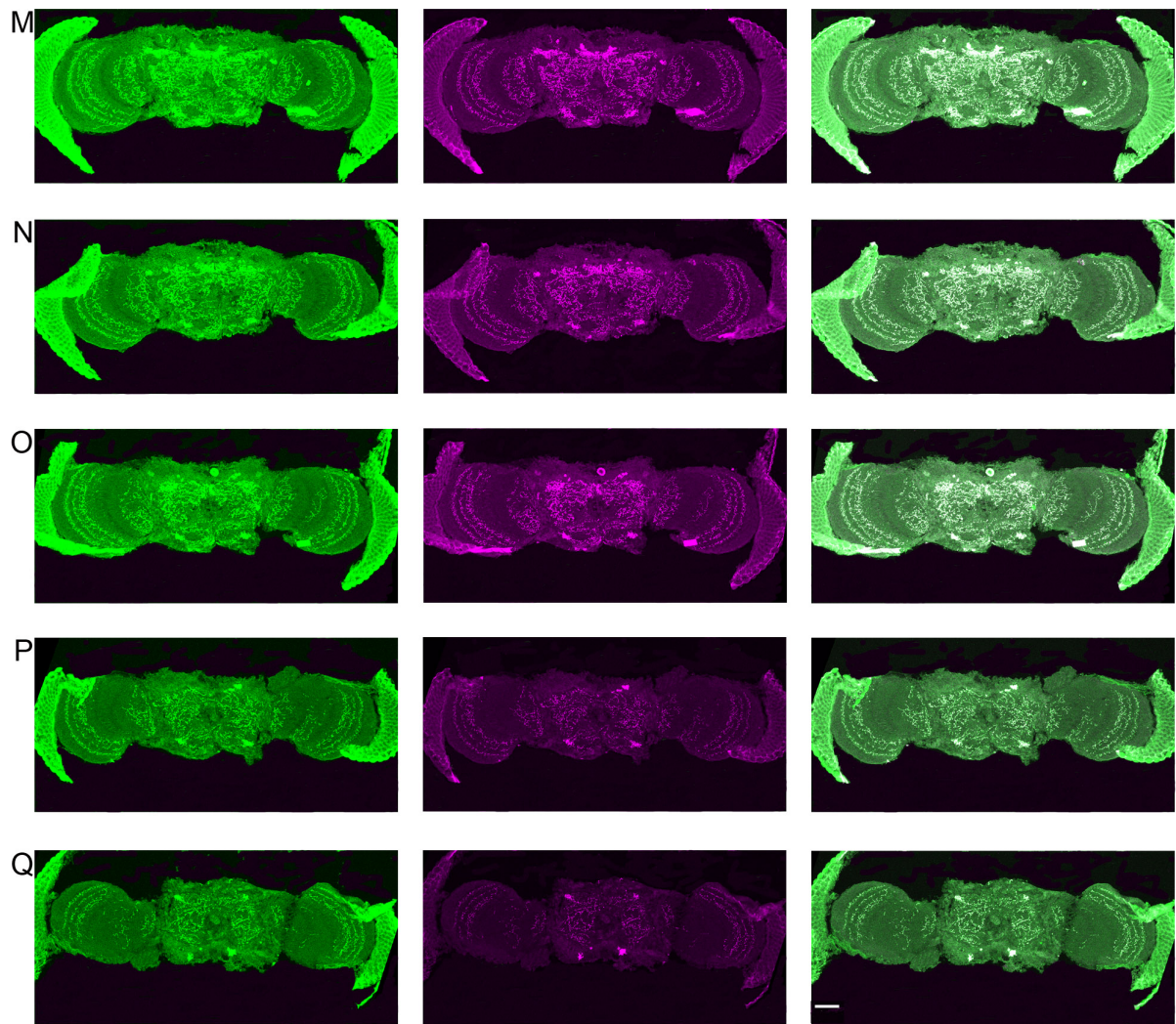


Abb. B.3.: dSERT und 5HT Antikörperfärbungen. Gefrierschnitte M-Q (weißer Balken 50 = μm).

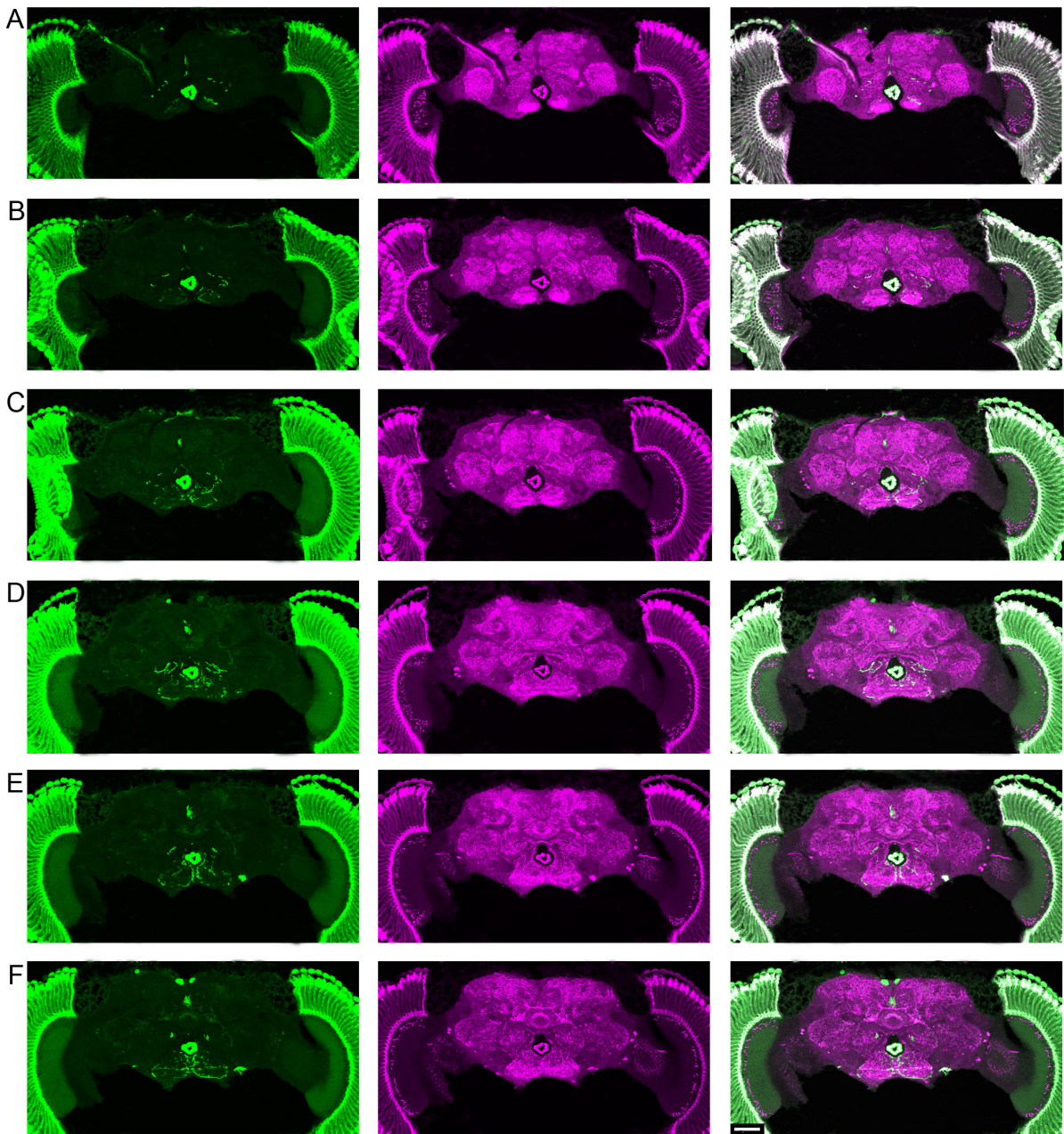


Abb. B.4.: GFP und 5HT Antikörperfärbung von *sert1+2-GAL4*, *uas-mCD8gfp* transgenen Fliegen. Gefrierschnitte vom Kopf einer männlichen Fliege wurden angefertigt. Die linke Reihe zeigt die GFP Antikörperfärbung (grün), in der Mitte ist die 5HT Färbung (magenta) zu sehen und die rechte Spalte zeigt die Kolokalisation der GFP Färbung mit 5HT. Gefrierschnitte A-F (weißer Balken 50 = μm).

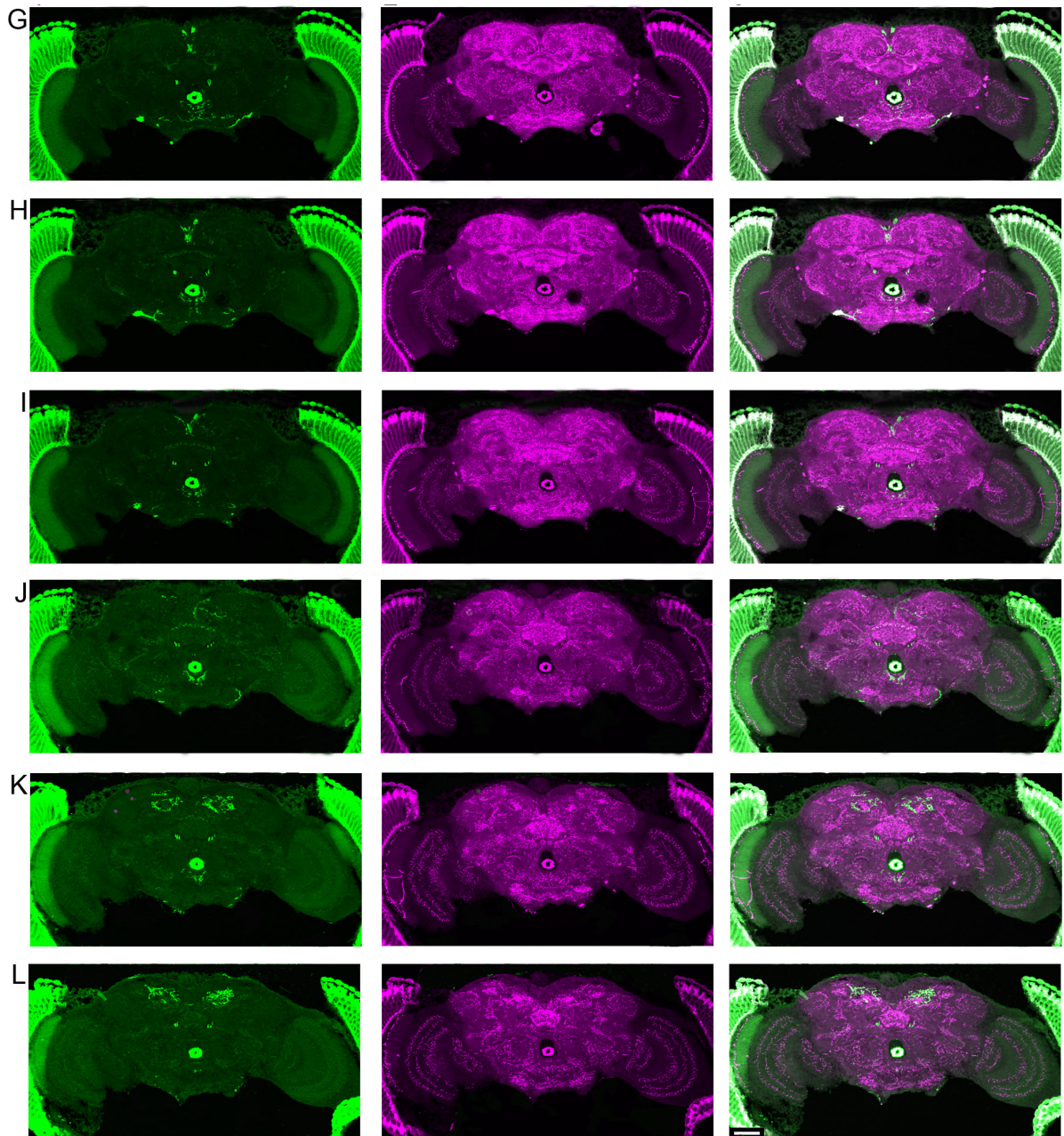


Abb. B.5.: GFP und 5HT Antikörperfärbung von *sert1+2-GAL4, uas-mCD8gfp* transgenen Fliegen. Gefrierschnitte G-L (weißer Balken 50 = μm).

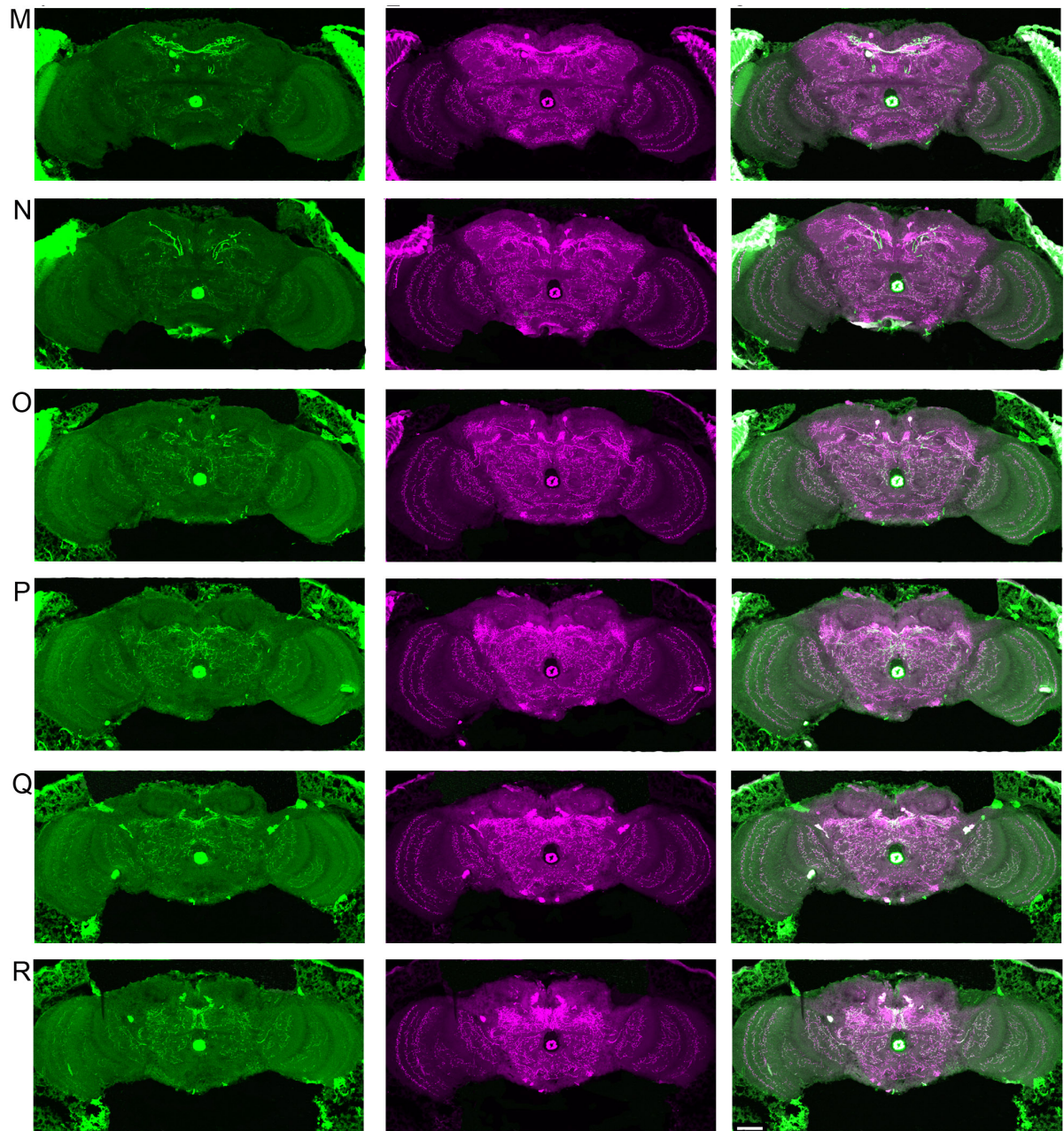


Abb. B.6.: GFP und 5HT Antikörperfärbung von *sert1+2-GAL4, uas-mCD8gfp* transgenen Fliegen (weißer Balken 50 μm). Gefrierschnitte M-R (weißer Balken 50 = μm).

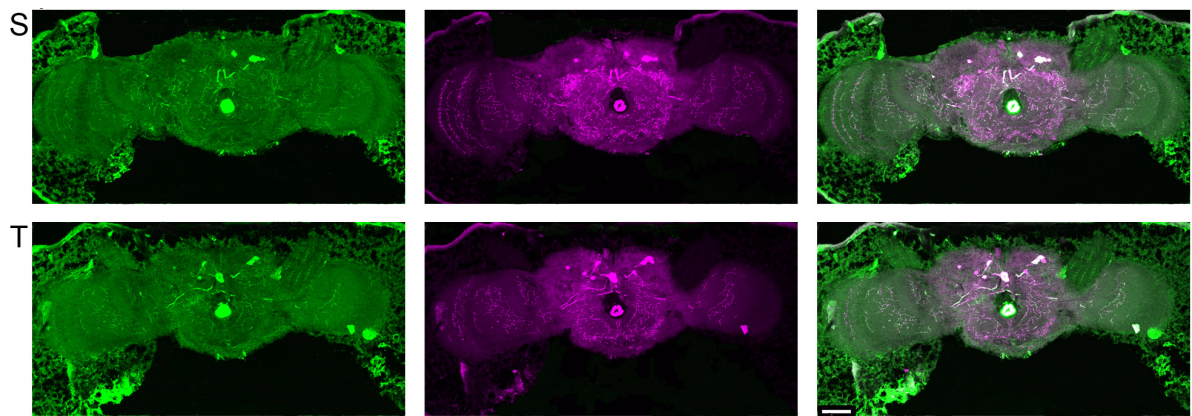


Abb. B.7.: GFP und 5HT Antikörperfärbung von *sert1+2-GAL4*, *uas-mCD8gfp* transgenen Fliegen.
 Gefrierschnitte S-T (weißer Balken 50 = μm).

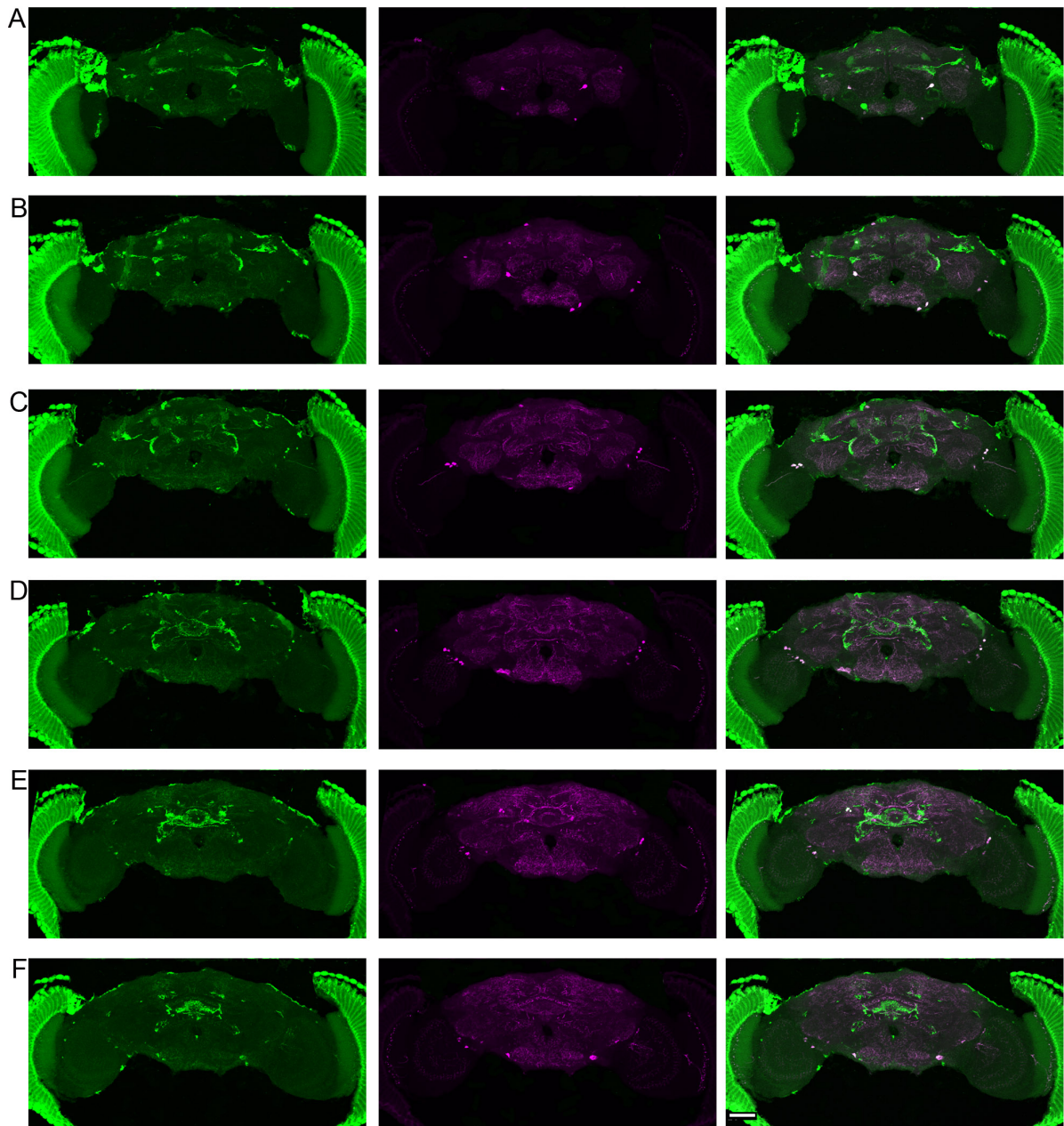


Abb. B.8.: GFP und 5HT Antikörperfärbung von *5htr1b*-GAL4, *uas-mCD8gfp* transgenen Fliegen. Gefrierschnitte vom Kopf einer männlicher Fliegen wurden angefertigt. Die linke Reihe zeigt die GFP Antikörperfärbung (grün), in der Mitte ist die 5HT Färbung (magenta) zu sehen und die rechte Spalte zeigt die Kolokalisation der GFP Färbung mit 5HT. Gefrierschnitte A-F (weißer Balken 50 = μm).

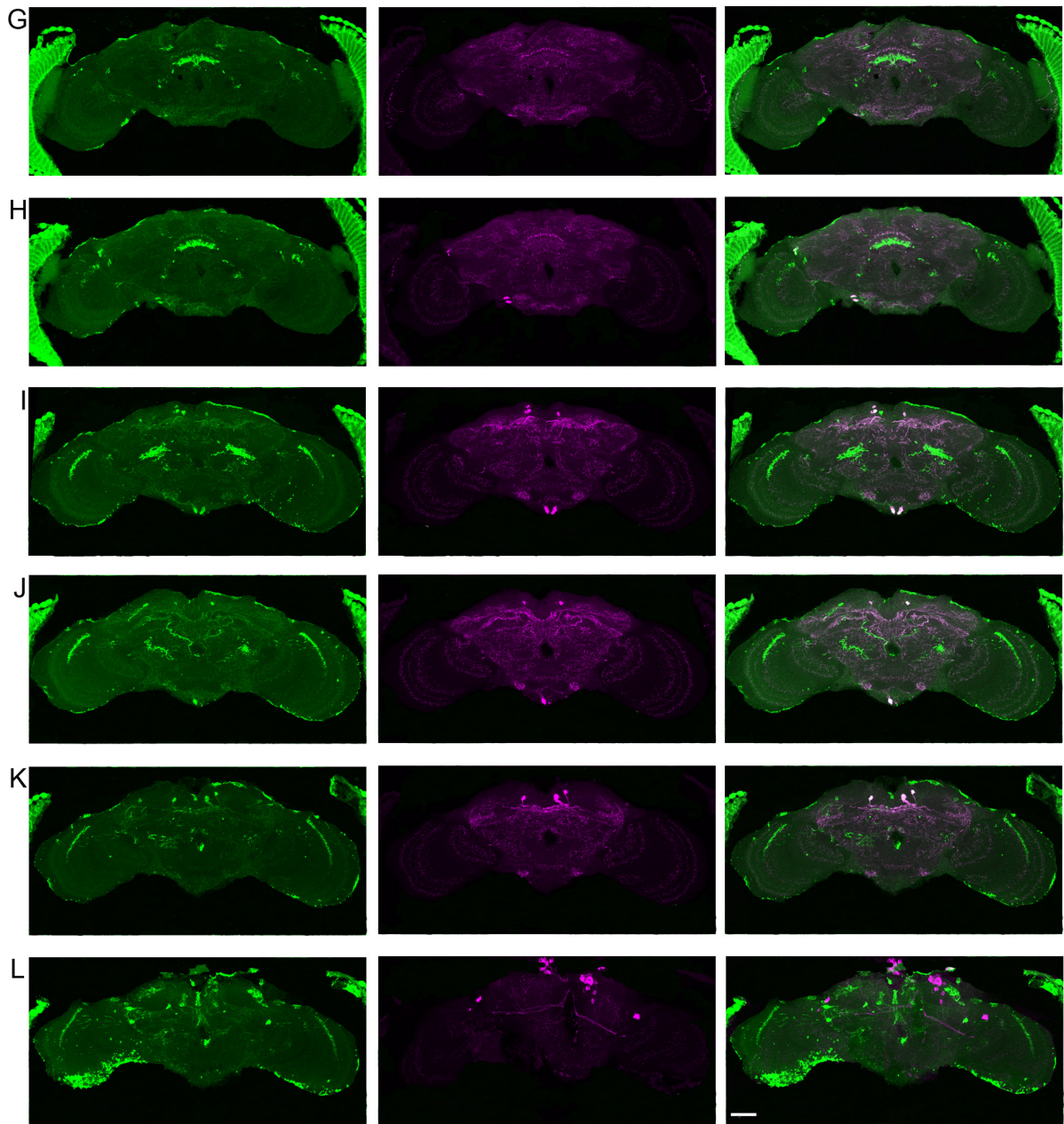


Abb. B.9.: GFP und 5HT Antikörperfärbung von *5htr1b*-GAL4, *uas-mCD8gfp* transgenen Fliegen. Gefrierschnitte G-L (weißer Balken 50 = μm).

Lebenslauf



Persönliche Daten

Name: Yvonne Ritze
Anschrift: Bertha-v.-Suttner Str. 33
97218 Gerbrunn
Tel.: 0931 886762
E-mail: yvonne.ritze@biozentrum.uni-wuerzburg.de
Geburtsdatum/-ort: 02.06.1978 in Lich
Geschlecht: weiblich
Nationalität: deutsch
Familienstand: ledig

Ausbildung

Weiterbildung

04/2006 - 06/2006 Universität Würzburg, Sprachkurs Chinesisch
05/2004 - 05/2004 AFS Interkulturelle Begegnung e.V., Würzburg Führen und Leiten
05/2004 - 05/2004 AFS Interkulturelle Begegnung e.V., Würzburg Projektleitung
03/2000 - 06/2000 Universität Würzburg, Sprachkurse Spanisch I und II

Hochschule

10/2003 - 06/2007 Universität Würzburg, Würzburg
Promotion Neurobiologie und Genetik
07/2006 - 09/2006 Institute of Neuroscience, Shanghai
Forschungsaufenthalt im Rahmen des Graduierten Kollegs China
10/1997 - 04/2003 Universität Würzburg, Würzburg
Diplom Mikrobiologie, Neurochemie, Tierphysiologie
03/2001 - 03/2001 Universität Würzburg, Tawau (Sabah), Malaysia
Spezifizierung von cranivoren Ameisen
10/2000 - 02/2001 Universitat de Barcelona, Barcelona (Katalonien), Spanien, Krebsforschung

Schule

08/1988 - 06/1997	Wilhelmsgymnasium Kassel, Kassel Allgemeine Hochschulreife, 20.06.1997
09/1994 - 06/1995	Lake Fenton Highschool, Lake Fenton (Michigan), U.S.A. Highschool Diploma

Publikationen

Wohlleben G, Trujillo C, Muller J, Ritze Y, Grunewald S, Tatsch U, Erb KJ. (2004): Helminth infection modulates the development of allergen-induced airway inflammation. In: Oxford Journals (Hrsg.): International Immunology, S. 585-596. Würzburg, 2004.

Stipendien

10/2005 - 12/2006	Graduiertenkolleg China (Universität Würzburg)
10/2000 - 02/2001	Auslandsstipendium (Erasmus)

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.

Würzburg, den 15. Juni 2007

Yvonne Ritze

Mann muss viel studiert haben, um wenig zu wissen

Charles de Secondat

oder

Was wir wissen, ist ein Tropfen,
Was wir nicht wissen, ein Ozean.

Isaac Newton

Danksagung

Diese Doktorarbeit wäre nicht zustande gekommen, ohne die Unterstützung einer Vielzahl von Menschen.

Bevor ich diesen Menschen danke, möchte ich meinen Respekt gegenüber den mehr als 200.000 Fliegen ausdrücken, die maßgeblich zu dieser Arbeit beigetragen haben und mit denen ich gerne gearbeitet habe.

Ein ganz herzliches Dankeschön gilt:

Rafael, der mich emotional während meiner ganzen Doktorarbeit unterstützt und mir tagelang bei der Formatierung dieser geholfen hat.

Meinen Eltern, die mich immer und in allem was ich gemacht habe unterstützt haben und die mein gesamtes Studium finanziert haben.

Meinen lieben Omas.

Meinen Würzburger Freunden, Suse, Manu und Claudi, die immer für mich da waren und mit denen ich alles bequatschen konnte. Vor allem Suse, für die vielen wissenschaftlichen Ratschläge und das Durchsehen der Doktorarbeit.

Hannes und Ruppert für die freundschaftliche und wissenschaftliche Unterstützung.

Meinen Baunataler Freunden für tolle Unternehmungen und vieles mehr...

Natalia, von der ich fast alles über das Klonieren gelernt habe und die immer für gute Stimmung gesorgt hat.

Mirjam, Vanessa und Steffi, für die geniale Kooperation und Eure Hilfsbereitschaft. Das war eine tolle Zeit mit Euch.

Gertrud, für die vielen Hilfestellungen und Erklärungen am Anfang und für die liebe und freundschaftliche Art. Danke auch für die Kartierung des P-Elementes.

Meinen F2 Praktikantinnen, **Tina, Maite und Eva** für die tolle Zusammenarbeit und Maite, dafür, dass sie sogar noch einmal aus Spanien gekommen ist, um bei uns Diplomarbeit zu machen.

Der Gruppe von André Fiala, insbesondere **Thomas Riemensperger** und **Thomas Völler** für das lockere Klima und die gute Zusammenarbeit.

Der Gruppe von Erich Buchner.

Susanne, Sylwia, Barbara meinen Fliegenglas-Feen und allen anderen super lieben und immer hilfsbereiten MitarbeiterInnen des Lehrstuhls.

Dieter, für die schönen Gefrierschnitte.

Hans, Michael, Konrad und **Andreas**, ohne die so manches Gerät nicht funktioniert hätte und die immer zu Stelle waren, wenn man sie gebraucht hat.

Margot und **Jessica** für die ganz liebe Unterstützung mit Verträgen, Rechnungen etc.

Anne für die Organisation des Chinaaufenthaltes.

Den Doktoranden des Heisenberglehrstuhls, **Arnim, Stephan, Mareike, Tilman, Jens, Birgit, Benjamin, Sebastian**, etc. für die super Atmosphäre und die Hilfsbereitschaft.

Burkhard für geniale wissenschaftliche Ratschläge zu jeder Zeit.

Reinhard Wolf, für wissenschaftliche Diskussionen und besonders für die Informationen China betreffend.

Den Gruppenleitern **Roland Strauss, André Fiala, Bertram Gerber** für hilfreiche wissenschaftliche Diskussionen.

Insbesondere **Hiromu Tanimoto**, der mich während der letzten Phase der Doktorarbeit finanziert und sich immer viel Zeit für die Besprechung von neuroanatomischen und anderen Fragen genommen hat (außerdem hat mir sein Hund Chokki sehr viel Freude bereitet).

Henrike Scholz, für die vielen wissenschaftlichen Diskussionen und die sehr schnelle Korrektur der Doktorarbeit.

Erich Buchner dafür, dass Du dir immer für einen Zeit genommen hast und für Deine nette und freundliche Art. Ich hätte gerne noch mehr von Dir gelernt. Vielen Dank auch dafür, dass Du die Doktorarbeit angesehen hast.

Martin Heisenberg, für die tolle Atmosphäre die am Lehrstuhl für Genetik in Würzburg herrscht und für die vielen anregenden Abende bei Ihnen auf Schloss Reichenberg. An dieser Stelle möchte ich mich auch bei Ihrer Frau bedanken für die anregenden Unterhaltungen und die immer leckere Verköstigung.

Des Weiteren möchte ich mich bei Ihnen für das Praktikum in der Kinder- und Jugendpsychiatrie bedanken, zu dem Sie mir verholfen haben und ganz besonders dafür, dass Sie mir den Chinaaufenthalt ermöglicht haben.