

**Analyse der Hangover Funktion während der
Entwicklung von
Ethanol-induziertem Verhalten**

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

vorgelegt von

Mirjam Franz

aus

Weiden

Würzburg, 2008

Eingereicht am:

Mitglieder der Prüfungskommission:

Vorsitzender: Prof. Dr. M. Müller

Gutachter: PD Dr. H. Scholz

Gutachter: Prof. Dr. G. Krohne

Tag des Promotionskolloquiums:

Doktorurkunde ausgehändigt am:

Meiner Familie
zum Dank für Eure Unterstützung

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	9
1.1. Der Einfluss von Ethanol auf den Organismus	9
1.1.1. Alkoholkonsum beeinflusst das menschliche Verhalten	9
1.1.2. Die Wirkungsweise von Ethanol auf zellulärer Ebene	9
1.1.3. Es gibt verschiedene Formen von Ethanoltoleranz	10
1.1.4. Die Ethanoltoleranz wird teilweise durch eine gelernte Komponente vermittelt	11
1.2. <i>Drosophila</i> als Modell für Ethanol-induziertes Verhalten bei höheren Organismen	12
1.3. Ethanol beeinflusst den cAMP-Signalweg in <i>Drosophila</i>	13
1.4. Hangover ist notwendig für die Entwicklung von Ethanoltoleranz	15
1.4.1. Ethanol-induziertes Verhalten in <i>hang</i> ^{AE10} Mutanten	15
1.4.2. Das HANG Protein	17
1.4.3. <i>dunce</i> ist ein mögliches Zielgen von Hangover	18
1.5. Ziele der Doktorarbeit	22
2. Material und Methoden	24
2.1. Fliegenstämme	24
2.2. <i>Drosophila</i> Aufzucht und Haltung	25
2.2.1. Standardmedium <i>Drosophila</i>	25
2.2.2. Haltungsbedingungen	25
2.3. DNA- und Proteinmarker	25
2.4. Enzyme	26
2.5. Antikörper	26
2.6. DNA-Material	26
2.6.1. Nukleotide	26
2.6.2 Vektoren	29
2.7. Bakterienstämme	30
2.7.1. Medien und Agarplatten	30
2.8. Puffer und Lösungen	30
2.8.1. Plasmid-Minipräparation	30
2.8.2. Puffer und Lösungen für SDS-PAGE und Western-Blot Analysen	31
2.8.3. Puffer und Lösungen für Immunhistochemie und <i>in-situ</i> Hybridisierung	32

2.8.4. Sonstige Puffer und Lösungen	33
2.9. Sequenzierungen	34
2.10. Antibiotika	34
2.11. Chemikalien	34
2.12. Methoden auf RNA-Ebene	34
2.12.1. Isolierung von RNA und cDNA Synthese	34
2.12.2. Semiquantitative RT-PCR	36
2.12.3. Semiquantitative RT-PCR mit Hilfe des OneStep RT-PCR Kit	37
2.12.4. RNA-Gelelektrophorese	38
2.13. Methoden auf DNA-Ebene	38
2.13.1. DNA-Gelelektrophorese	38
2.13.2. Linker-PCR	39
2.13.3. Plasmid-DNA Minipräparation	39
2.13.4. Plasmid-DNA Midipräparation	39
2.13.5. Restriktionsverdau	39
2.13.6. Fällung von DNA	40
2.13.7. DNA-Ligation	40
2.13.8. DNA Transformation in hitzekompetente <i>E.coli</i> Zellen	40
2.13.9. Verwendete Kits	40
2.14. Immunhistochemische Methoden	41
2.14.1. Antikörperfärbung von whole-mount <i>Drosophila</i> Köpfen	41
2.14.2. Gefrierschnitte	41
2.14.3. Präparation, Fixierung und Fluoreszenzfärbung von polytären Chromosomen	41
2.14.4. RNA <i>in-situ</i> Hybridisierung an Embryonen, Larven und Adulten <i>Drosophila</i>	42
2.15. Proteinbiochemische Methoden	46
2.15.1. SDS-PAGE	46
2.15.2. Western-Blot Analyse	46
2.15.3. Herstellung von 6 x His Fusionsproteinen	47
2.15.4. Induktion und Expression von 6 x His markierten Proteinen	48
2.15.5. RNA Bindung an 6 x His Fusionsproteinen	48
2.16. Verhaltensanalysen	49
2.16.1. Messung von Ethanol sensitivität und Toleranz	49

2.16.2. Messung von Hitze-Ethanol Resistenz	49
2.16.3. Messung von olfaktorischem Lernen und Gedächtnis	50
2.16.4. Auswertung und Statistik	50
3. Ergebnisse	52
3.1. Interagiert Hangover mit Nukleinsäuren?	52
3.1.1. Lokalisation von Hangover an larvalen polytären Chromosomen	52
3.1.2. Die Überexpression von <i>hang</i> führt zu HANG Clustern im Zellkern	54
3.1.3. Hangover bindet <i>in vitro</i> an RNA	56
3.2. Mögliche Zielgene von Hangover	58
3.2.1. In <i>hang^{AE10}</i> Fliegen liegen spezifische <i>dunce</i> Transkripte reduziert vor	58
3.2.2. Eine Reduktion der beiden <i>fasciclin II</i> Transkripte in adulten <i>hang^{AE10}</i> Mutanten kann nicht gezeigt werden	62
3.3. Charakterisierung der Transkriptspezifität der <i>dnc^{A143}</i> Mutante und des <i>dnc^{RMRA}</i> -GAL4 Expressionsmusters	63
3.3.1. Die <i>dnc^{A143}</i> Mutation ist spezifisch für die <i>dnc^{RMRA}</i> Transkripte	63
3.3.2. Analyse des <i>dnc^{RMRA}</i> -GAL4 Expressionsmusters	65
3.4. Einfluss von <i>dunce</i> auf Ethanol-induziertes Verhalten	72
3.4.1. <i>dnc^l</i> und <i>dnc^{A143}</i> Mutanten entwickeln reduzierte Ethanoltoleranz	72
3.4.2. <i>dnc^l</i> und <i>dnc^{A143}</i> Mutanten haben Defekte in der zellulären Stressantwort	73
3.4.3. Die Expression von <i>dnc</i> mit der <i>dnc^{RMRA}</i> -GAL4 Linie rettet die reduzierte Ethanoltoleranz der <i>dnc^{A143}</i> Mutanten	74
3.4.4. Die Expression von <i>dnc</i> mit der <i>dnc^{RMRA}</i> -GAL4 Linie rettet nicht die Defekte in der zellulären Stressantwort von <i>dnc^{A143}</i> Fliegen	78
3.5. Hat eine Veränderung der zellulären cAMP Konzentration Auswirkungen auf die Ethanoltoleranzentwicklung?	81
3.5.1. Die Überexpression von <i>dnc</i> mit der <i>dnc^{RMRA}</i> -GAL4 Linie hat keinen Einfluss auf die Ethanoltoleranz	81
3.5.2. Die Überexpression von <i>rutabaga</i> hat keinen Einfluss auf die Toleranzentwicklung	83
3.5.3. Die Überexpression von <i>pka-c</i> in <i>dnc^{RMRA}</i> spezifischen Zellen führt zu einer erhöhten Ethanolresistenz dieser Fliegen	85
3.6. Gibt es eine Interaktion von Hangover und <i>dunce</i> auf der Verhaltensebene?	86

3.6.1. Die Expression von <i>hang</i> in adulten Fliegen durch <i>dnc^{RMRA}</i> -GAL4 verbessert die reduzierte Toleranz der <i>hang^{AE10}</i> Fliegen	86
3.6.2. Die Expression von <i>dnc</i> mit der <i>dnc^{RMRA}</i> -GAL4 Linie rettet nicht die reduzierte Toleranz von <i>hang^{AE10}</i> Mutanten	88
3.6.3. Komplementationstest von heterozygoten <i>hang^{AE10}</i> und <i>dnc^{A143}</i> Mutanten	90
3.6.4. <i>dnc^{A143}</i> und <i>hang^{AE10}</i> Fliegen haben eine unterschiedliche Kinetik in der Toleranzentwicklung	91
3.6.5. Die Mutanten <i>dnc^l</i> und <i>dnc^{A143}</i> haben Defekte im olfaktorischen Kurzzeitgedächtnis	93
3.6.6. Die <i>hang^{AE10}</i> Mutante hat keinen Defekt im olfaktorischen Kurzzeitgedächtnis	95
3.6.7. Die Expression von <i>dnc</i> mit der <i>dnc^{RMRA}</i> -GAL4 Linie rettet scheinbar nicht den olfaktorischen Kurzzeitgedächtnisdefekt von <i>dnc^{A143}</i> Mutanten	97
4. Diskussion	100
4.1. HANG ist möglicherweise ein RNA-modifizierendes Protein, das in nukleären Kompartimenten lokalisiert ist	100
4.2. cAMP hat eine wichtige Funktion im Ethanol-induzierten Verhalten	102
4.3. Die zelluläre Stressantwort wird über cAMP Level reguliert	105
4.4. Ist die reduzierte Ethanoltoleranz in <i>dnc^{A143}</i> und <i>hang^{AE10}</i> Fliegen auf Defekte im Lernen bzw. Gedächtnis zurückzuführen?	107
4.5. Ausblick	109
5. Zusammenfassung	111
6. Summary	115
7. Literaturverzeichnis	118
8. Abkürzungen	129
9. Anhang	131
9.1. Vektoren	131
9.2. Die Hangover Aminosäuresequenz	133

9.3. Vergleich der Aminosäuresequenzen der Duncce Isoformen	137
9.4. Tabellen	140
10. Danksagung	149

1. Einleitung

1.1. Der Einfluss von Ethanol auf den Organismus

1.1.1. Alkoholkonsum beeinflusst das menschliche Verhalten

Der Missbrauch und die Abhängigkeit von Alkohol sind weltweite Gesundheitsprobleme. An den Mechanismen und Faktoren, die zur Alkoholabhängigkeit führen, wird schon lange geforscht. Bis heute sind jedoch nur einzelne Faktoren, die Alkoholismus fördern, bekannt. Der Konsum von großen Mengen an Ethanol beeinträchtigt alle Körperorgane und führt je nach Menge und Dauer der Ethanolaufnahme zu verschiedenen Verhaltensmustern. Diese äußern sich zunächst durch eine Art Hemmungslosigkeit und Euphorie, gefolgt von einem beruhigenden Effekt, später führen sie zu Verwirrung und Koordinationsproblemen. Wiederholter Ethanolkonsum kann zu Toleranz, physischer Abhängigkeit und Sucht führen (Fadda und Rossetti, 1998). Das Risiko alkoholabhängig zu werden hängt sowohl von genetischen als auch von Umwelteinflüssen ab. So haben Menschen, die in jungen Jahren weniger sensitiv auf Alkohol reagieren, ein höheres Risiko Alkoholiker zu werden (Schuckit, 1994). Bei Asiaten gibt es zum Beispiel eine sehr geringe Rate an Alkoholikern. Der Grund hierfür liegt an dem Enzym Aldehyddehydrogenase (ALDH), das eine reduzierte Aktivität aufweist. Normalerweise wandelt die ALDH das, durch die Alkoholdehydrogenase (ADH) aus Alkohol erzeugte, toxische Acetaldehyd in Acetat um. Bei Asiaten kommt es jedoch nach Alkoholkonsum zu einer Ansammlung von Acetaldehyd im Körper, diese Substanz verursacht Schmerzen und Übelkeit (Bosran und Li, 1986). Aufgrund dieser Erfahrungen mit Alkohol ist das Risiko bei Asiaten Alkoholiker zu werden sehr gering.

1.1.2. Die Wirkungsweise von Ethanol auf zellulärer Ebene

Eine wichtige physikalische Eigenschaft von Ethanol ist seine Löslichkeit in Wasser und Fetten. Der Alkohol kann somit leicht die Blut-Hirn-Schranke durchdringen und Neurone in vielen Bereichen des Gehirns beeinflussen (Bellen, 1998). Ethanol reagiert unspezifisch auf viele membrangebundene Proteine, kann aber die Aktivität verschiedener Rezeptoren modellieren, indem es an hydrophobe Proteinregionen dieser Proteine bindet (Fadda und Rossetti, 1998). Einige dieser Rezeptoren sind u.a. der 5-Hydroxytryptamin- (5-HT₃) Rezeptor (Zhang *et al.*, 1997), der γ -Aminobuttersäure- (GABA_A) Rezeptor, der N-methyl-D-Aspartat- (NMDA) Rezeptor und der Glycin-Rezeptor (Wright *et al.*, 1996). Die Bindung von

Ethanol an diese Rezeptoren führt zur Induktion von weiteren Molekülen und Systemen. So wird zum Beispiel das Neurotransmittersystem aktiviert, welches positive bzw. negative Erfahrungen mit Ethanol vermittelt. Eine erhöhte Dopaminausschüttung im Nucleus Accumbens durch das mesolimbische System, bewirkt eine belohnende Wirkung des Ethanols, wohingegen das GABA β -System eine negative Wirkung erzielt (Lewis, 1996). Außerdem wird durch chronischen Ethanolkonsum die Aktivität der cAMP-abhängigen Proteinkinase A im Nucleus Accumbens erhöht. Dies wiederum führt zu Veränderungen der Adenylatzyklase und somit zur cAMP Synthese (Ortiz *et al.*, 1995). Eine weitere Reaktion der Zelle auf chronischen oder exzessiven Alkoholkonsum ist die zelluläre Stressantwort (Zima *et al.*, 1998; Koch *et al.*, 2004). Damit schützt sich der Organismus vor der zellulären Zerstörung von Proteinen und Membranen durch äußere Einflüsse wie z.B. Hitze, UV-Licht oder Alkohol. In der Zelle führt Ethanolkonsum zur Inhibierung der Nukleinsäuresynthese, der Transkription, der RNA-Prozessierung und der Translation. Außerdem wird die Produktion von freien Radikalen, den so genannten reaktiven oxigenen Substanzen (ROS), aktiviert. Diese verursachen die Degradation von Proteinen durch Lipidperoxidation (Montolin *et al.*, 1994). Die Zelle bewahrt sich davor, indem die Aktivität von molekularen Chaperonen und den dazugehörigen Genen aktiviert wird (Lindquist, 1986; Feder und Hofmann, 1999). Chaperone sind sog. Hitze-Schock Proteine (HSP), die den Transport, die Faltung und die Sekretion von neu gebildeten Proteinen schützen (Morrow und Tanguay, 2003; Soerensen *et al.*, 2003). Länger andauernder Ethanolkonsum kann schließlich zu neuronalen Veränderungen im zentralen Nervensystem führen (De la Monte *et al.*, 2008), wie z.B. vermindertes Zellwachstum und Defekte in der Zelldifferenzierung (Guerra und Renau-Piqueras, 1997; Guerra *et al.*, 2001).

1.1.3. Es gibt verschiedene Formen von Ethanoltoleranz

Ein wichtiger Aspekt des Ethanol-induzierten Verhaltens ist die Entwicklung von Ethanoltoleranz. Schon sehr früh hat sich die Wissenschaft mit diesem Aspekt beschäftigt. Das erste Mal wird über die Toleranzentwicklung 1872 geschrieben (Canniff, 1872). Im Menschen führt chronischer Alkoholkonsum zur Entwicklung von Toleranz. Toleranz wird definiert als eine entwickelte Resistenz gegenüber dem berauschenden Effekt von Ethanol, diese kann sowohl gegenüber den negativen als auch den positiven Effekten von Ethanol gebildet werden. Eine vermehrte Aufnahme von Ethanol führt zur Entwicklung von Abhängigkeit und Sucht (Tabakoff *et al.*, 1986). Ethanoltoleranz ist ein wichtiger Bestandteil der Alkoholsucht. Sie ist als ein diagnostisches Kriterium im psychiatrischen

Diagnosehandbuch DSM-IV (American Psychiatric Association) für Alkohol-induzierte Krankheiten aufgeführt. Es gibt verschiedene Formen von Ethanol-toleranz. Man unterscheidet prinzipiell zwischen der Toleranz, die den Metabolismus (dispositionelle Toleranz) betrifft und funktioneller Toleranz. Die dispositionelle Toleranz wird von Faktoren vermittelt, welche die Aufnahme und Ausscheidung von Ethanol und die enzymatische Umsetzung von Ethanol regulieren. Dazu gehört u.a. die Alkoholdehydrogenase. Die funktionelle Toleranz wird über Veränderungen auf zellulärer Ebene erreicht (Kalant *et al.*, 1971; Tabakoff *et al.*, 1986), wobei es auch zu adaptiven Veränderungen im zentralen Nervensystem kommt (Cunningham *et al.*, 1984; Fadda und Rossetti 1998). Des Weiteren unterscheidet man zwischen rapider und chronischer Toleranz. Die chronische Toleranz setzt eine wiederholte Behandlung mit Ethanol über mehrere Tage voraus, wohingegen die rapide Toleranz nach einer einzigen kurzen Ethanol-aufnahme entwickelt wird (Kalant *et al.*, 1971; Tabakoff *et al.*, 1986). In Nagetieren wird die rapide Toleranz innerhalb von zwei Tagen entwickelt. Dabei bekommen die Tiere am ersten Tag eine einmalige Dosis Ethanol verabreicht und am zweiten Tag kann bereits die Toleranz gemessen werden (Crabbe *et al.*, 1998).

1.1.4. Die Ethanol-toleranz wird teilweise durch eine gelernte Komponente vermittelt

Die Ausbildung von Ethanol-toleranz hängt nicht nur von der Menge und der Dauer des verabreichten Ethanols ab, sondern auch von den jeweiligen Umweltbedingungen während des Ethanol-konsums (Kalant *et al.*, 1971; Tabakoff *et al.*, 1982; Kalant und Le, 1984). In einer Studie wurde die Ethanol-aufnahme von Mäusen auf eine bestimmte Umgebung konditioniert und anschließend das Verhalten dieser Tiere im nüchternen Zustand in dieser Umgebung getestet. Es konnte gezeigt werden, dass Mäuse mit Training unter Ethanoleinfluss sich in dieser Umgebung anders verhielten als Tiere mit Training im nüchternen Zustand. Die mit Alkohol trainierten Mäuse verhielten sich, im Vergleich zu der anderen Gruppe, in dieser Umgebung viel gelassener und versuchten sich weniger zu verstecken (Cole *et al.*, 1999). Andere Studien mit Nagern zeigen eine deutliche Korrelation zwischen der Entwicklung von Ethanol-toleranz und Pavlov'scher Konditionierung. Die Toleranz wird schneller erreicht und ist stärker in Tieren, die im berauschten Zustand ein bestimmtes, durch Ethanol-induziertes Verhalten trainieren (LeBlanc *et al.*, 1975; Wenger *et al.*, 1981). Dieses unter Ethanoleinfluss stehende Training ist für die Entwicklung von Toleranz nur bei der Gabe von geringen Mengen Ethanol notwendig, jedoch nicht bei hohen Dosen von Ethanol (Le, Kalant und Khanna, 1987a). In Ratten wurde gezeigt, dass eine kontinuierliche Stimulation mit Ethanol ohne Konditionierung zum Verlust von Toleranz führt (Greeley *et al.*, 1984). Dies

widerspricht vollkommen der pharmakologischen Theorie, bei der ein anhaltender Ethanolkonsum, unabhängig von äußeren Einflüssen, zur Toleranz führt. Es zeigt jedoch, dass die Toleranzentwicklung eine sehr starke gelernte Komponente beinhaltet. Dass Alkoholkonsum und die Konditionierung auf bestimmte Umweltreize auch beim Menschen eine wichtige Rolle spielen, wurde von Marlatt und Rohsenow (1980) untersucht. Die Studie zeigt, dass ein Umweltreiz welcher mit Alkohol konditioniert wurde, zum Beispiel eine bestimmte Bar, bei Abstinenz ein starker Anreiz für einen Rückfall ist.

1.2. *Drosophila* als Modell für Ethanol-induziertes Verhalten bei höheren Organismen

Die Fruchtfliege *Drosophila melanogaster* ist ein geeignetes Modell um Ethanol-induziertes Verhalten zu untersuchen. Sie zeigt bei Aufnahme von Ethanol ein Verhaltensmuster ähnlich zu dem im Menschen. Es beginnt mit Hyperaktivität, unkoordiniertem Verhalten, Verlust des Körpergleichgewichtes bis hin zur Bewusstlosigkeit (Moore *et al.*, 1998). Auch die molekulare Architektur des Nervensystems von Vertebraten und Invertebraten stimmt in großen Teilen überein (Littleton und Ganetzky 2000; Rubin *et al.*, 2000). *Drosophila* besitzt die gleichen Neurotransmitter, wie z.B. Serotonin und Dopamin (Valles und White, 1988; Budnik *et al.*, 1986). Darüber hinaus sind molekulare Komponenten und Funktionen konserviert. Zum Beispiel sind ähnliche Moleküle bzw. Proteine an der synaptischen Vesikelfreisetzung, dem Recycling und an Signaltransduktionskaskaden beteiligt, die auch in der neuronalen Funktion von Vertebraten involviert sind. Außerdem besitzen Fliegen die wichtigsten Kanäle, die durch Ethanol aktiviert werden können, wie z.B. bestimmte Liganden- und spannungsabhängige Ionenkanäle bzw. G-Protein aktivierte Kaliumkanäle (Harris, 1999). Sowohl in *Drosophila* als auch in Nagern sind die gleichen Gene bzw. Signalwege am Ethanol-induzierten Verhalten beteiligt. So hat der cAMP-gekoppelte GABA-Rezeptor in Fliegen eine wichtige Funktion bei der Ethanoltoleranzentwicklung (Dimitrijevic *et al.*, 2005). Mäusen, denen der GABA-Rezeptor fehlt, entwickeln eine reduzierte Ethanoltoleranz (Zaleski *et al.*, 2001). Eine Mutation in der regulatorischen Untereinheit PKA-R11 β der Proteinkinase A (PKA) führt in Mäusen zu reduzierter Sensitivität gegenüber Ethanol und zu einem freiwillig erhöhten Alkoholkonsum (Thiele *et al.*, 2000). Die *pka-R11* Mutante in *Drosophila* zeigt ebenfalls eine reduzierte Sensitivität gegenüber Ethanol (Park *et al.*, 2000). Außerdem zeigen Mäuse mit fehlendem Neuropeptid Y eine reduzierte lokomotorische Aktivität und erhöhten

Alkoholkonsum (Thiele *et al.*, 2000). Auch das *Drosophila* Homolog Neuropeptid F hat Einfluss auf die Sensitivität der Fliegen gegenüber Ethanol (Wen *et al.*, 2005).

Die Sensitivität und Toleranz gegenüber Ethanol kann in *Drosophila* mithilfe des Inebriometers gemessen werden. Der Apparat misst den Effekt von Ethanol auf das Körpergleichgewicht (Cohan und Hoffman, 1986; Moore *et al.*, 1998). Die Sensitivität gegenüber Ethanol wird anhand der Verweildauer der Fliegen im Inebriometer während einer einzigen berauschenden Dosis Ethanol ermittelt (Moore *et al.*, 1998). Diese macht die Fliegen resistenter gegenüber dem Effekt von Ethanol und sie können bei einem zweiten Durchgang im Inebriometer länger das Gleichgewicht halten. Demzufolge entwickelt *Drosophila* eine rapide Toleranz nach nur einer Dosis Ethanol. Die entwickelte Toleranz der Fliegen im Inebriometer ist funktionell, da sie nicht auf Veränderungen in der Ethanol Absorption bzw. dem Metabolismus beruht (Scholz *et al.*, 2000). Rapide Toleranz wird in Ratten und Mäusen ähnlich untersucht (Crabbe *et al.*, 1979). Die Toleranz wird hier jedoch erst 24 Stunden nach der ersten Ethanoldosis gemessen. In den Fliegen kann die Toleranz bereits 2-4 Stunden nach der ersten Ethanolexposition analysiert werden (Scholz *et al.*, 2000). Für die Ethanoltoleranz in Nagern wird vorgeschlagen, dass sie eine gelernte Komponente beinhaltet (Kalant *et al.*, 1971; LeBlanc *et al.*, 1975; Wenger *et al.*, 1981; Cole *et al.*, 1999). In *Drosophila* fällt auf, dass viele Gene, die bei der Sensitivität oder der Toleranzentwicklung gegenüber Ethanol involviert sind, auch beim Lernen und der Gedächtnisbildung eine wichtige Rolle spielen. So zeigen die Mutanten der Gene *cheapdate* (Feany und Quinn, 1995; Moore *et al.*, 1998; Keene und Waddel, 2007), *rutabaga*, *pka-c1*, *fasII* (Moore *et al.*, 1998; Cheng *et al.*, 2001; Keene und Waddel, 2007), *synapsin* (Godenschwege *et al.*, 2004) und *homer* (Urizar *et al.*, 2007) sowohl Defekte in der Ethanolsensitivität bzw. Toleranz, als auch im Lernen und Gedächtnis.

1.3. Ethanol beeinflusst den cAMP-Signalweg in *Drosophila*

Der Botenstoff zyklisches Adenosinmonophosphat (cAMP) dient der intrazellulären Weiterleitung eines extrazellulären Signals, welches die Zellmembran nicht passieren kann (Sutherland und Rull, 1957). cAMP spielt sowohl bei akutem als auch bei chronischem Ethanolkonsum eine Rolle. Bei der akuten Antwort auf Ethanol kommt es zu einer Rezeptor-aktivierten cAMP Synthese, bei der chronischen Antwort zu einer Erniedrigung der cAMP Produktion (Diamond und Gordon, 1997). In *Drosophila* spielt der cAMP Metabolismus, vor allem bei der akuten Antwort auf Ethanol, eine wichtige Rolle. *amnesiac* kodiert für ein Neuropeptid, welches homolog zu den Säuger Neuropeptiden PACAP (pituitary adenylyl

cyclase activating peptide) und GHRH (growth hormone releasing hormone) ist (Feany und Quinn, 1995). In Säugern sind beide Peptide positiv über G-Proteine an eine Ca^{2+} /Calmodulin abhängige Adenylzyklase gekoppelt. In *Drosophila* ist Rutabaga das Homolog dazu (Livingstone *et al.*, 1984). Rutabaga wandelt ATP in cAMP um und trägt somit zur Aktivierung der Proteinkinase A (PKA) bei. Die katalytische Untereinheit pKA-C1 (Lane und Kalderon, 1993) der PKA aktiviert durch Phosphorylierung den Transkriptionsfaktor CREB (cAMP response element-binding protein).

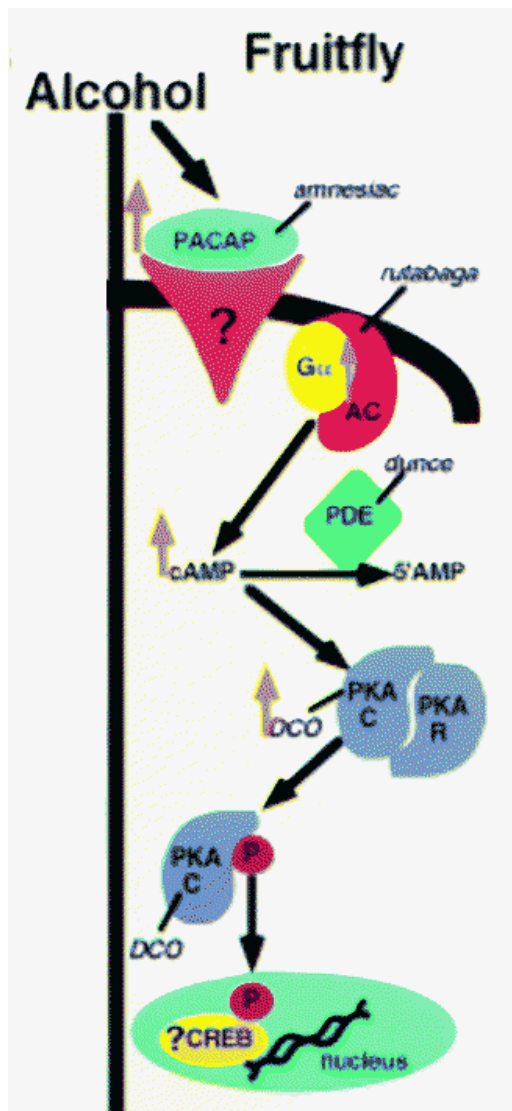


Abb. 1.1: Vereinfacht dargestellter cAMP-Signalweg in *Drosophila*

Amnesiac, ein Neuropeptid, führt zur Aktivierung von Rutabaga, einer Adenylatzyklase. Rutabaga wandelt ATP in cAMP um, dabei kommt es zu einer erhöhten cAMP Konzentration in der Zelle. Das cAMP kann von Duncce, einer Phosphodiesterase zu AMP hydrolysiert werden oder aber es aktiviert die Proteinkinase A. Die katalytische Untereinheit PKA-C, der aktivierten PKA, wandert in den Nucleus und phosphoryliert den Transkriptionsfaktor CREB. Dies führt zu einer erhöhten Transkriptionsrate von bestimmten, CREB abhängigen, Genen (Die Abbildung stammt leicht verändert aus der Veröffentlichung von Bellen, 1998).

Dadurch kommt es zur verstärkten Transkription von Genen, die eine CREB Bindungsstelle besitzen. Der cAMP Abbau in der Zelle erfolgt über die Phosphodiesterase Duncce (Chen *et al.*, 1986; Qiu *et al.*, 1991). Sie hydrolysiert cAMP zu AMP (Bellen, 1998). Viele Proteine des cAMP Metabolismus in *Drosophila* sind am Ethanol induzierten Verhalten beteiligt. Die *amnesiac* Mutante *cheapdate*, *rutabaga* Mutanten und die *pka-c1* Mutanten zeigen eine erhöhte Sensitivität gegenüber Ethanol. Auffallend ist jedoch, dass *amnesiac*, *rutabaga*

Doppelmutanten keine erhöhte Sensitivität gegenüber Ethanol aufweisen. Dies deutet daraufhin, dass die Sensitivität gegenüber Ethanol vermutlich nicht nur durch eine Erhöhung der cAMP Konzentration herbei geführt wird, sondern noch komplexeren Mechanismen unterliegt (Moore *et al.*, 1998).

1.4. Hangover ist notwendig für die Entwicklung von Ethanoltoleranz

1.4.1. Ethanol-induziertes Verhalten in *hang*^{AE10} Mutanten

Nach einer Mutagenese mit einem transposablen P-Element wurden X-chromosomale Insertionslinien auf ihre Fähigkeit, Ethanoltoleranz zu entwickeln, untersucht. Infolgedessen wurde die *hang*^{AE10} Mutante isoliert. Diese entwickelt normale Sensitivität gegenüber Ethanol, aber eine bis zu 50 % reduzierte Toleranz. Der mutante Phänotyp kann durch die HANG Expression in neuronalen Zellen des Gehirns mithilfe der *Appl*-GAL4 Linie wieder auf Wildtyp-Level gebracht werden. Dies zeigt, dass der Verlust der HANG Funktion zur Reduktion von Ethanoltoleranz führt.

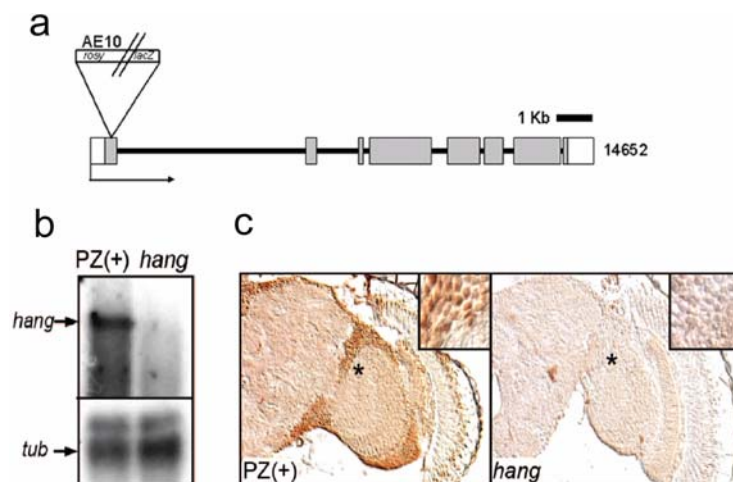


Abb. 1.2: Die P-Element Insertion im *hangover* Gen und seine Auswirkungen auf die Transkription und Proteinsynthese

a) Das P-Element mit den Markergenen *rosy* und *lacZ* im ersten Exon von *hangover* unterbricht das Leseraster des Gens. Dies führt zur Inhibierung der Transkription, wie das Fehlen der *hang*

RNA in der *hang*^{AE10} Mutante im Northern-Blot zeigt (b). HANG ist in neuronalen Zellen des Gehirns exprimiert. Dies zeigt die Antikörperfärbung mit anti-HANG an Gehirnschnitten in *PZ[+]* Fliegen. In der *hang*^{AE10} Mutante fehlt die HANG Expression (c). Die Abbildung wurde leicht modifiziert aus der Veröffentlichung von Scholz *et al.*, 2005 entnommen.

Das P-Element ist in das erste von acht Exons des Gens CG4411 inseriert und unterbricht das Leseraster von *hang* (Scholz *et al.*, 2005). Der *hang* Locus befindet sich auf dem X-Chromosom in Position 14C4-6 und erstreckt sich über 14,6 kb (<http://flybase.org/>). In den *hang*^{AE10} Fliegen lässt sich kein HANG Protein und keine *hang* mRNA nachweisen (Abb. 1.2 b, c). Dies legt nahe, dass es sich bei *hang*^{AE10} um eine Nullmutante handelt. Außerdem

zeigen *hang*^{AE10} Fliegen Defekte in ihrer Antwort auf zellulären Stress gegenüber Hitze und freien Radikalen (Scholz *et al.*, 2005). In zahlreichen Microarray Studien wurde gezeigt, dass Ethanol- und Hitzebehandlung in der Zelle zur Aktivierung der gleichen Hitzeschockproteine führt. Das heißt, Hitze und Ethanol werden von der Zelle als ähnliche zelluläre Stressfaktoren empfunden (Lewohl *et al.*, 2000; Guatala *et al.*, 2004; Worst *et al.*, 2005).

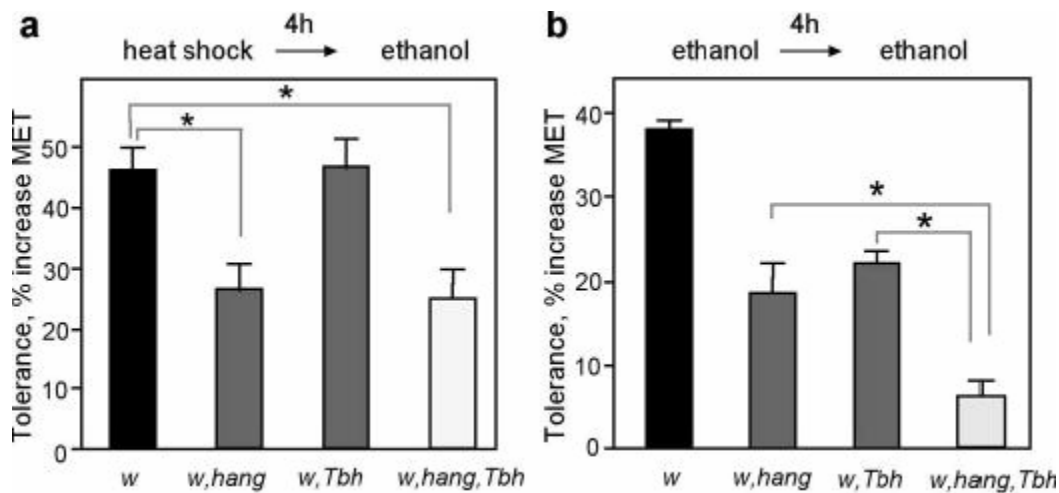


Abb. 1.3: *hang*^{AE10} Fliegen entwickeln reduzierte Hitze-Ethanol-Crosstoleranz

a) Die Fliegen erhielten anstelle von Ethanol einen Hitzeschock von 30 Minuten bei 37°C und wurden anschließend im Inebriometer auf ihre Toleranz gegenüber Ethanol untersucht. Die *hang*^{AE10} Mutanten und *w, hang*^{AE10}, *TβH* Doppelmutanten entwickeln signifikant weniger Crosstoleranz im Vergleich zu den Kontrollfliegen. Die Crosstoleranzentwicklung von *TβH* Mutanten ist nicht beeinträchtigt. b) Sowohl *hang*^{AE10} als auch *TβH* Mutanten haben eine reduzierte Ethanoltoleranz. Die Doppelmutante *w, hang*^{AE10}, *TβH* entwickelt außerdem eine signifikant geringere Toleranz im Vergleich zu den beiden Einzelmutanten. Die Abbildung ist aus der Veröffentlichung von Scholz *et al.*, 2005 entnommen.

In einem Crosstoleranz Versuch (Abb. 1.3), in dem die erste Ethanolbehandlung durch einen Hitzeschock ersetzt wird, wurde die *hang*^{AE10} Mutante untersucht. Der Begriff Crosstoleranz kommt aus dem pharmakologischen Bereich und bezeichnet einen Mechanismus, bei dem die Toleranzentwicklung gegenüber einer Substanz auf eine andere Substanz, mit ähnlichem chemischem Aufbau, übertragen werden kann (Le *et al.*, 1986a; Jorgensen *et al.*, 1986). Die *hang*^{AE10} Fliegen entwickeln eine signifikant geringere Toleranz gegenüber Ethanol und Hitze im Vergleich zu den Kontrollfliegen. Eine weitere Mutante, welche eine reduzierte Ethanoltoleranz aufweist, ist *TβH*^{M18}. In dieser Mutante ist das Enzym Tyramin-β-hydroxylase (TβH) defekt, das normalerweise die Synthese des Neurotransmitters Oktopamin katalysiert (Monastirioti, 1996). Diese Fliegen entwickeln eine zu den Kontrollfliegen vergleichbare Hitze-Ethanol-Crosstoleranz. Die Doppelmutante *w, hang*^{AE10}, *TβH*^{M18} weist

auch eine reduzierte Crosstoleranz auf und eine signifikant schlechtere Ethanol toleranzentwicklung im Vergleich zu den beiden Einzelmutanten. Das heißt, die reduzierte Ethanol toleranzentwicklung in *hang*^{AE10} Mutanten ist auf Defekte in der zellulären Stressantwort zurückzuführen, während der Defekt in *TβH* Mutanten wahrscheinlich auf Veränderungen des otopaminergen Netzwerkes zurückzuführen ist (Scholz *et al.*, 2005).

1.4.2. Das HANG Protein

Die C₂H₂ Zinkfinger repräsentieren die größte Klasse der Nukleinsäure-bindenden Motive in höheren Eukaryoten (Rubin *et al.*, 2000). Diese Klasse findet man in Transkriptionsfaktoren (Rosenberg *et al.*, 1986), Chromatin-assoziierten Komponenten (Reuter *et al.*, 1990) und RNA-bindenden Proteinen (Joho *et al.*, 1990). Ein Zinkfingermotiv ist eine kleine Peptid-Domäne mit einer speziellen Sekundärstruktur. Diese Struktur wird durch ein Zinkion, das an Cystidin- und Histidin-Reste des Fingers bindet, stabilisiert. Das C₂H₂ Motiv ist der klassische Zinkfinger, der auch als CX₂₋₄ CX₁₂ HX₂₋₆H beschrieben wird (Iuchi, 2001). Es beinhaltet 2-3 β-Faltblätter in der N-terminalen Sequenz und eine α-Helix in der C-terminalen Hälfte von X₁₂H (Pavletich und Pabo, 1991). Die vorherrschende Funktion der C₂H₂ Finger ist die Bindung von DNA. Diese DNA-spezifische Affinität wird durch verschiedene Aminosäurereste in der α-Helix und den konservierten Linkern zwischen den Fingern hergestellt (Iuchi, 2001). Es gibt aber auch C₂H₂ Proteine, die sowohl DNA, als auch RNA binden können, wie z.B. der Transkriptionsfaktor TFIIIA aus *Xenopus* Oocyten (Miller *et al.*, 1985). Generell gilt, je größer die Anzahl an Zinkfingern, desto mehr spezifische Bindungen zu verschiedenen Liganden sind möglich (Iuchi, 2001). Das Gen *hangover* kodiert für ein großes Zinkfingerprotein mit 16 Zinkfingerdomänen der Klasse C₂H₂ und einer Kalzium-bindenden EF-Hand.

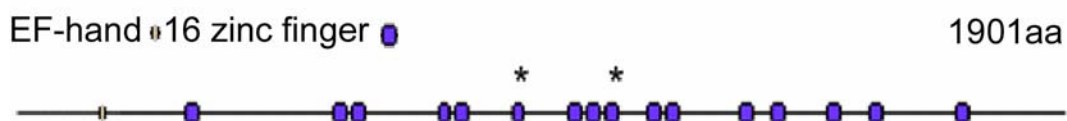


Abb. 1.4: *hangover* kodiert für ein Zinkfingerprotein

Das Hangover Protein besteht aus 1901 Aminosäuren. Es besitzt 16 Zinkfingerdomänen der Klasse C₂H₂ (blaue Kreise) und am N-terminalen Ende eine Kalzium-bindende EF-Hand (heller Kreis). Die Zinkfingerklasse C₂H₂ kann sowohl RNA, als auch DNA binden. Zwei der Zinkfingerdomänen gehören zu der U1-ähnlichen Unterklasse (Sternchen). Diese findet man oft in RNA modifizierenden Proteinen.

In Abbildung 1.4 ist die genomische Struktur von Hangover dargestellt. Zwei der C₂H₂ Zinkfinger gehören der U1-ähnlichen Unterklasse an, die in RNA-modifizierenden Proteinen zu finden sind (Nelissen *et al.*, 1991). Die große Anzahl an Zinkfingerdomänen und die zwei spezifischen Domänen sprechen dafür, dass Hangover nicht nur DNA sondern auch RNA bzw. Proteine binden könnte. Das Motiv der EF-Hand findet man in vielen Ca²⁺ bindenden Proteinen (Ikura *et al.*, 2002). Kalzium ist ein Botenstoff, der in vielen Signalwegen genutzt wird, um Proteine zu aktivieren. Dies spricht dafür, dass Hangover Kalzium binden kann, wodurch es möglicherweise aktiviert wird.

1.4.3. *dunce* ist ein mögliches Zielgen von Hangover

Aufgrund seiner genomischen Struktur kann Hangover wahrscheinlich DNA und/ oder RNA binden. Zur Identifizierung möglicher Zielgene von Hangover wurde ein cDNA Microarray durchgeführt. Dabei wurde das Gen *dunce* als ein putatives Ziel von Hangover entdeckt (Abbildung 1.5).

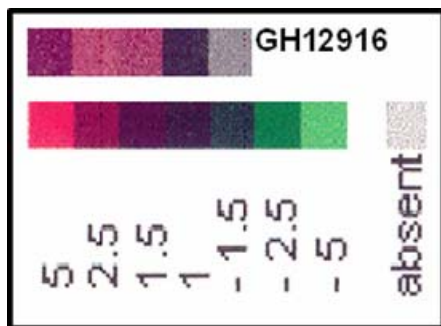


Abb. 1.5: **Ergebnis des cDNA Microarray Experiments für *dunce* (GH12916)**

Die Transkriptkomposition von *hang^{AE10}* wird mit der Kontrolle *PZ[+]* verglichen. Verschiedene EST (*expressed sequence tags*) Klone wurden auf eine Microarrayplatte gespottet und mit den cDNAs von Mutante und Kontrolle inkubiert. Die Hybridisierungen wurden fünfmal wiederholt. Dabei konkurriert die, mit einem roten Farbstoff markierte, wildtypische cDNA mit der grün markierten mutanten cDNA um die Bindungsstellen der ESTs. Rote Kästchen bedeuten demnach, dass dieses Gen im Wildtyp hoch reguliert vorliegt bzw. in der Mutante reduziert ist. Grüne Kästchen würden zeigen, dass das Gen im Wildtyp fehlt bzw. reduziert vorliegt oder in der Mutante vermehrt zu finden ist. Der Farbcode in der unteren Reihe gibt den Unterschied zwischen der Mutante und dem Wildtyp an (Scholz und Klebes, unveröffentlichte Daten).

Das *dunce* Gen kodiert für eine Phosphodiesterase (PDE). In *Drosophila* gibt es sechs PDE Klassen, die entweder nur cAMP oder cGMP oder beides hydrolysieren (Day *et al.*, 2005). *Dunce* gehört zu der Gruppe von PDEs, die ausschließlich cAMP hydrolysieren (Davis und Kiger, 1981). Die genomische Region, die für *Dunce* kodiert, ist sehr komplex und erstreckt sich über 163 kb. *dunce* besitzt 27 Exons und kodiert für 14 RNAs mit unterschiedlichen Transkriptionsstartpunkten (<http://flybase.org/>).

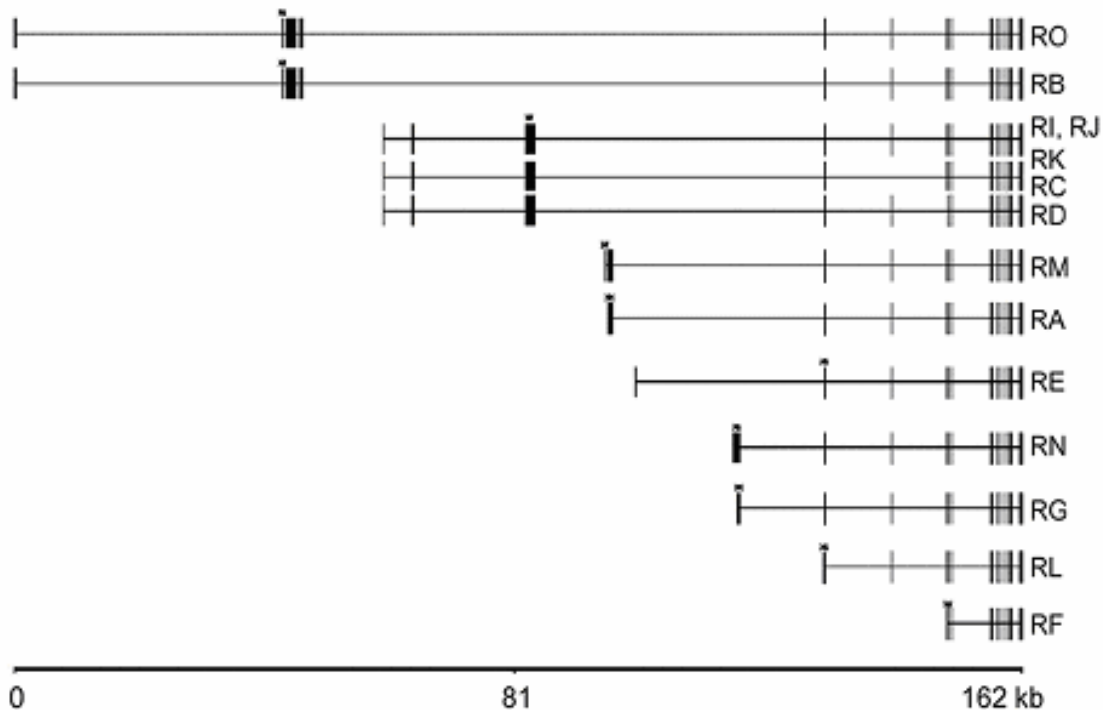


Abb. 1.6: **Genomische Organisation von *dunce***

Der *dunce* Locus befindet sich auf dem X-Chromosom in Position 3C9-3D1 und umspannt 162 kb. *dunce* kodiert für 14 Transkripte mit unterschiedlichen Transkriptionsstartpunkten (Sternchen). Alle 14 Transkripte haben einen gemeinsamen konservierten C-terminalen Bereich. Die Abbildung wurde in leicht modifizierter Form aus <http://flybase.org/> entnommen.

Innerhalb von zwei großen Introns des *dunce* Locus findet man sieben andere Gene (Chen *et al.*, 1987; Furia *et al.*, 1990). Sechs dieser intronischen Gene sind charakterisiert, scheinen aber unwichtig für die Dunce Funktion in adulten Tieren zu sein, da sie nur in den Speicheldrüsen exprimiert werden (Qiu und Davis, 1993).

Im Menschen gibt es 11 verschiedene PDE Familien. Dunce wird der Klasse der PDE4 Familie zugeordnet. Das humane Homolog PDE4 kodiert für verschiedene Isoformklassen, die sich durch spezifische N-terminale Bereiche unterscheiden (Houslay und Adams, 2003). Vier verschiedene Gene kodieren für die PDE4 Enzyme (PDE4A, PDE4B, PDE4C und PDE4D). Durch alternatives Spleißen oder durch die Verwendung von unterschiedlichen Promotoren kann jedes Enzym wiederum verschiedene Isoformen produzieren (Conti und Jin, 1999; Houslay *et al.*, 1998). In *Drosophila* kodiert das Gen *dunce* für die verschiedenen Dunce Isoformen, die auch hier durch alternatives Spleißen und durch Nutzung unterschiedlicher Transkriptionsstartpunkte entstehen (Qiu und Davis, 1993). Die humanen PDE4 Proteine unterteilen sich in lange, kurze und super-kurze Isoformen (Houslay, 2001).

Die verschiedenen langen PDE4 Proteine unterscheiden sich anhand zweier konservierter Regionen, den *upstream conserved regions* (UCR1 und UCR2).

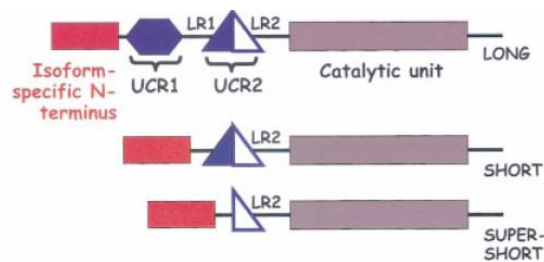


Abb. 1.7: **Lange, kurze und super-kurze PDE4 Isoformen**

Die humanen PDE4 Isoformen werden je nach Größe in verschiedene Gruppen eingeteilt. Alle Gruppen enthalten einen Isoform-spezifischen N-terminalen Bereich, dem in der langen Form die Regionen UCR1 und UCR2 (*upstream conserved regions*) folgen. UCR1 ist über den Linker LR1 mit UCR2 verbunden und UCR2 ist über den Linker LR2 mit der katalytischen Einheit verbunden. Die kurze Isoform enthält nur den spezifischen N-terminalen Bereich, UCR2 und die katalytische Einheit (PDE4D1 und PDE4D2). Die super-kurze Isoform hat nur noch einen bestimmten Teil des UCR2 plus N-terminalen Bereich und der katalytischen Einheit (PDE4A1). Die UCRs haben eine regulatorische Wirkung auf die katalytische Einheit des Proteins (Beard *et al.*, 2000; MacKenzie *et al.*, 2000; Sette und Conti, 1996). Die Abbildung ist aus der Veröffentlichung von Houslay und Adams, 2003 entnommen.

In der langen Isoform findet man beide Regionen, in der kurzen Variante nur UCR2 und in der super-kurzen Isoform nur noch einen Teil der UCR2 Region. Die meisten der PDE4 Isoformen gehören zur langen Proteinklasse, PDE4D1 und PDE4D2 fehlt der UCR1 Bereich, deshalb werden sie der kurze Proteinklasse zugeordnet. PDE4A1 ist die einzige super-kurze Isoform der PDE4 Familie (Houslay und Adams, 2003). Die UCR1 und UCR2 Bereiche findet man auch in Duncce. Die meisten Duncce Isoformen besitzen beide Bereiche, abgesehen von PF und PE, denen ein Teil der UCR1 Region fehlt. In PL findet man keine UCR1 Region und nur ungefähr die Hälfte des UCR2 Bereiches (Abb. 1.8). Dies entspricht der super-kurzen Isoform bei den humanen PDE4 Proteinen (Abb. 1.7). In Bereichen der beiden UCR Regionen beträgt die Homologie zwischen Duncce und PDE4 fast 100% (Bolger *et al.*, 1993). In den humanen PDEs haben die UCRs einen regulatorischen Einfluss auf die katalytische Funktion (Beard *et al.*, 2000; MacKenzie *et al.*, 2000; Sette und Conti, 1996). So kann UCR2 möglicherweise die PDE4 Aktivität inhibieren (Jin *et al.*, 1992) während UCR1 über Phosphorylierung durch die PKA zur Aktivierung der PDE Aktivität führt (Sette und Conti, 1996; Sette *et al.*, 1994; Hoffmann *et al.*, 1998). Die katalytische Domäne in Duncce befindet sich im konservierten C-terminalen Bereich des Proteins (<http://flybase.org/>). Sie ist zu 97%

identisch mit dem Bereich im humanen PDE4D Protein, das die höchste Identität der PDE4 Klasse zu Duncce aufweist. Die Identität liegt je nach Isoform bei 59% - 61% (Abb.1.8).

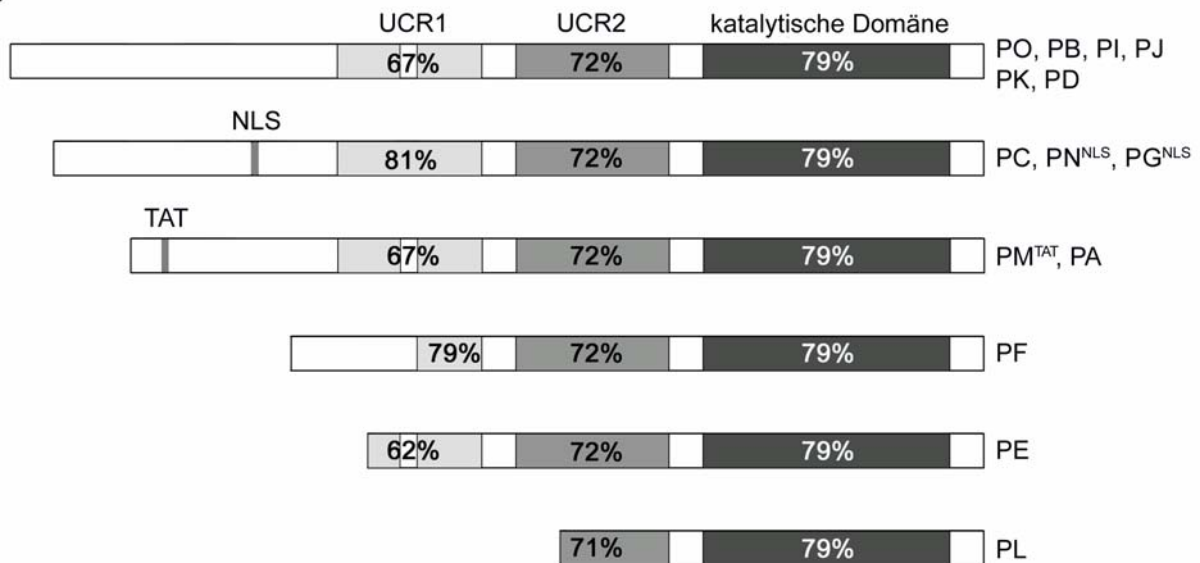


Abb. 1.8: **Homologien der verschiedenen Duncce Isoformen mit dem humanen PDE4D Protein**

Die 14 Isoformen können anhand ihrer gemeinsamen UCR1- (hellgraue Box), UCR2- (graue Box) Bereiche und der katalytischen Domäne (dunkelgraue Box) in sechs Gruppen eingeteilt werden. Je nach Gruppe besitzen die Isoformen sowohl alle drei Bereiche (PO, PB, PI, PJ, PK, PD, PC, PN, PG, PM und PA) oder nur die katalytische Domäne mit Teilbereichen von UCR1 (PF und PE) oder UCR2 (PL). Einige Isoformen besitzen noch zusätzliche Domänen, wie eine TAT-Box (TAT) oder eine nukleäre Lokalisierungssequenz (NLS). Die Identität der einzelnen Duncce Domänen mit dem humanen PDE4D Protein ist in Prozent innerhalb der jeweiligen Domäne angegeben. Weiße Flächen markieren nicht homologe Bereiche. Die Daten wurden mithilfe von BlastP Search (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) erstellt.

Es existieren verschiedene *duncce* Mutanten in *Drosophila*, die alle eine reduzierte PDE Aktivität aufweisen. Dabei handelt es sich bei *dnc*¹, *dnc*² und *dnc*^{CK} um hypomorphe Mutationen in Bezug auf die PDE Aktivität und bei *dnc*^{ML}, *dnc*^{M14} und *dnc*^{M11} um amorphe Mutanten (Davis und Kiger, 1981). Die meisten *duncce* Mutanten sind steril (Lannutti, 2001). Sie wurden in verschiedenen Verhaltensparadigmen getestet. Die Mutanten *dnc*¹ und *dnc*^{M11} weisen Defekte im olfaktorischen assoziativen Lernen und Gedächtnis auf, wobei vor allem das Kurzzeitgedächtnis betroffen ist (Tully und Quinn, 1985). In *dnc*¹ und *dnc*² Mutanten ist das Balzverhalten beeinträchtigt (Gailey, 1984); außerdem besitzen sie eine reduzierte Habituation des Proboscis-Extensions Reflexes gegenüber Zucker (Duerr, 1982). Die Mutanten *dnc*¹ und *dnc*^{M11} wurden auf Ethanol sensitivität getestet, es konnte aber kein Unterschied zu den Kontrollfliegen festgestellt werden (Moore *et al.*, 1998). Die *duncce*

Mutanten zeigen außerdem normale motorische Koordination, normale Aktivität und normale Sinneswahrnehmung (Dudai *et al.*, 1976). Für alle bisher beschriebenen *dunce* Mutanten ist der genaue Ort der Mutation nicht bekannt. Bei *dnc^l* wird angenommen, dass eine Punktmutation im Strukturgen vorliegt, da dieses Allel per EMS-Mutagenese hergestellt wurde (Salz und Kiger, 1984).

Für eine genaue Interpretation der Verhaltensdaten ist es jedoch wichtig, die genauen Mutationsorte zu kennen, um Rückschlüsse auf die Funktion der einzelnen *dunce* Transkripte ziehen zu können. Für die *dnc^{A143}* Mutante ist die Größe und der Ort der Deletion genau bekannt (Abb. 1.9). Die Deletion umfasst ca. 2,2 kb und betrifft das erste Exon, einschließlich ATG, des *dnc^{RM}* Transkriptes (Saratsis, 2006). In dieser Arbeit wurde unter anderem das Ethanol-induzierte Verhalten dieser Mutante untersucht.

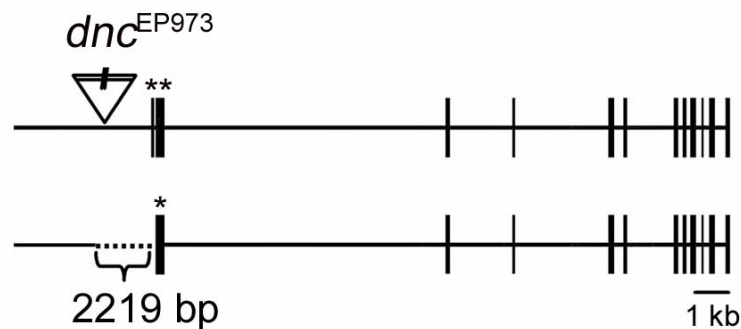


Abb. 1.9: **Herstellung der *w¹¹¹⁸*, *dunce^{A143}* Mutante**

Die *dnc^{EP973}* Linie wurde für eine P-Element Mutagenese benutzt. Das mobilisierte P-Element verursachte eine Deletion von -2148 bp bis +71 bp. Diese beinhaltet den ca. 2,1 kb stromaufwärts gelegenen intronischen Bereich und das erste Exon, inklusive ATG, von *dnc^{RM}*. Das ATG von *dnc^{RA}* ist nicht betroffen (Saratsis, 2006).

1.5. Ziele der Doktorarbeit

Ziel dieser Arbeit war es, mehr über den zellulären Mechanismus herauszufinden, in dem Hangover wirkt. Dazu sollte zunächst untersucht werden, wo Hangover in der Zelle lokalisiert ist und welche zelluläre Funktion es hat. Es sollte unter anderem geklärt werden, ob Hangover DNA bzw. RNA binden kann. Die DNA-Bindung sollte mithilfe von Antikörperfärbungen an polytären Chromosomen untersucht werden und eine mögliche RNA-Bindung über einen *in vitro* RNA-Bindungsversuch mit Histidin-markierten Hangover Proteinen geklärt werden. Kolokalisationsstudien mit Hangover und verschiedenen Markern, die in bestimmten nukleären Domänen lokalisiert sind, sollten weitere Hinweise für die Funktion bzw. die Lokalisation von Hangover in der Zelle geben. Da es sich bei Hangover möglicherweise um

ein RNA modifizierendes Protein handelt, kann es direkt oder indirekt auf mögliche Zielgene einwirken. Ein weiterer Ansatz, um mehr über den zellulären Mechanismus von Hangover zu erfahren, war die Identifizierung solcher Zielgene und deren phänotypische Charakterisierung. Im Vorfeld wurde mithilfe eines cDNA Microarray das Gen *dunce* als Zielgen von Hangover identifiziert. *Dunce* ist eine Phosphodiesterase, die im PKA-Signalweg für die Regulierung von cAMP zuständig ist (Chen *et al.*, 1986; Qiu *et al.*, 1991). In dieser Arbeit sollten zunächst das Ergebnis der Microarray Experimente mithilfe von semiquantitativen RT-PCRs überprüft werden. Parallel dazu wurde die *dnc^{Δ143}* Mutante hergestellt (Saratsis, 2006). Die Verhaltensanalysen der neuen *dnc* Mutante im Bezug auf Ethanoltoleranz und Hitze-Ethanol-Crosstoleranz sollten weitere Beweise für eine Regulation von *dunce* durch Hangover bringen. Ob die beiden Proteine im gleichen neuronalen Netzwerk aktiv sind, sollte die Rettung des Toleranzphänotyps der beiden Mutanten mithilfe einer *dnc^{RMRA}* Promotor GAL4-Linie zeigen. Die cAMP Regulation über *Dunce* scheint ein wichtiger Bestandteil der Toleranzentwicklung von Hangover zu sein. Für einen genaueren Einblick in diesen cAMP-Regulationsmechanismus wurden verschiedene Gene, die am cAMP-Signalweg beteiligt sind, mit *dnc^{RMRA}*-GAL4 überexprimiert. Dabei wurden die Auswirkungen der unterschiedlichen cAMP-Konzentrationen in den Fliegen im Hinblick auf Ethanolsensitivität und Ethanoltoleranz untersucht. Für die *dnc^l* Mutante ist bekannt, dass sie Defekte im olfaktorischen assoziativen Kurzzeitgedächtnis hat (Tully und Quinn, 1985). Zur Beantwortung der Frage, ob auch die *dnc^{Δ143}* und *hang^{ΔE10}* Mutanten im Lernen und in der Gedächtnisbildung eine Rolle spielen, wurden die Fliegen in der Tully/ Quinn Maschine auf olfaktorisches assoziatives Kurzzeitgedächtnis getestet. Diese Versuche sollten dabei helfen, die molekularen Mechanismen von Hangover, die zur Entwicklung von Ethanoltoleranz führen, zu identifizieren.

2. Material und Methoden

2.1. Fliegenstämme

w^{1118}	(Lindsley & Zimm)
<i>Canton S</i>	(Lindsley & Zimm)
<i>PZ</i> [<i>rosy</i> ⁵⁰⁶ , <i>lacZ</i>]	(Moor <i>et al.</i> , 2000)
<i>dnc</i> ¹	(Dudai <i>et al.</i> , 1976)
w^{1118} , <i>dnc</i> ^{A143} ; +; +	(Saratsis, 2006)
<i>hang</i> ^{AE10} , <i>dnc</i> ¹ ; +; +	(Henrike Scholz)
<i>hang</i> ^{AE10} <i>rosy</i> ⁵⁰⁶ ; +; +	(Scholz <i>et al.</i> , 2005)
<i>hang</i> ^{AE10} ; +; <i>rosy</i> ⁵⁰⁶	(Henrike Scholz)
w^{1118} ; <i>UAS-hang-GFP/Cyo</i> ; <i>D42/TM6</i>	(Henrike Scholz)
w^{1118} <i>UAS-dnc</i> ; +; +	(Cheung <i>et al.</i> , 1999)
<i>UAS-dnc</i> , <i>dnc</i> ^{A143} / <i>FM7</i> ; +; + (13)	(Mirjam Franz)
w^{1118} <i>hang</i> ^{AE10} , <i>UAS-dnc</i> ; +; +	(Henrike Scholz)
w^{1118} <i>hang</i> ^{AE10} , <i>UAS-hang</i> ; +; +	(Isabell Schwenkert)
w^{1118} ; <i>UAS-hang-GFP</i> ; +	(Henrike Scholz)
w^{1118} ; <i>mUAS-CD8-GFP/Cyo</i> ; +	(Lee und Luo, 1999)
w^{1118} ; +; <i>UAS-rutabaga</i>	(Troy Zars)
w^{1118} <i>1032.hx-GAL4</i> ; +; <i>Pc-GFP/TM3</i>	(Paro <i>et al.</i> , 1999)
w^{1118} ; +; <i>D42-GAL4</i>	(Parkes <i>et al.</i> , 1998)
w^{1118} ; +; <i>dnc</i> ^{RMRA} - <i>GAL4</i>	(Saratsis, 2006)
w^+ ; +; <i>Elav-GAL4/TM3</i>	
w^{1118} ; <i>Appl</i> ; +	(Torroja <i>et al.</i> , 1999)
w^{1118} ; <i>Cyo/sp</i> ; <i>TM2/TM6</i>	(Klämbt)
w^{1118} ; +; <i>dnc</i> ^{RMRA} - <i>GAL4</i> , <i>tub-GAL80^{ts}</i> (7)	(Mirjam Franz)
<i>mUAS-CD8-GFP</i> ; <i>mUAS-CD8-GFP</i> ; <i>mUAS-CD8-GFP</i>	(Sebastian Busch)

Die Fliegenlinien w^{1118} , *dnc*^{A143}; +; + und w^{1118} , *UAS-dnc*; +; + wurden mithilfe von Standardkreuzungen rekombiniert. Es wurden drei unabhängige rekombinante Fliegenlinien anhand der Augenfarbe und mithilfe von PCR (Primer: 10085sens und RMRA antineu2) isoliert. Für alle Versuche wurde die Linie Nummer 13 verwendet.

Auch die Fliegenstämme $w^{1118}; +; dnc^{RMRA}$ -GAL4 und $+; +; tubGAL80^{ts}$ wurden mithilfe von Standardkreuzungen rekombiniert und drei unabhängige rekombinante Fliegenlinien isoliert. Dabei wurde über die Augenfarbe und die GFP-Expression der $w^{1118}; UAS-CD8-GFP; dnc^{RMRA}$ -GAL4, $tubGAL80^{ts}$ Fliegen, nach Gabe eines Hitzeschocks, gesucht. Für alle weiteren Versuche wurde die Linie 7 verwendet.

2.2. *Drosophila* Aufzucht und Haltung

2.2.1. Standard Medium *Drosophila*

212 g Maismehl in

750 ml Wasser aufkochen ü. N. quellen lassen

40 ml Zuckersirup

40 ml Malz zugegeben

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) 100 g auf 40 l

Brei ca. 2 cm hoch in Plexiglasgefäße füllen

Lagerung bei 4°C

2.2.2. Haltungsbedingungen

Die *Drosophila* Stämme werden in Plexiglasgefäßen auf Standardmedium und definiertem Licht-Dunkel-Zyklus von 17 h Licht und 9 h Dunkelheit bei 18°C, bzw. bei 25°C gehalten.

2.3. DNA- und Proteinmarker

DNA-Marker: GeneRuler[™] 1kb DNA ladder

Fermentas

Proteingrößenmarker

Prestained, Fermentas

2.4. Enzyme

Enzyme wurden von Fermentas, Roche, MBI und Invitrogen bezogen und nach Angaben des Herstellers verwendet.

2.5. Antikörper

nc82 (monoclonal) α -mouse	1:10	A. Hofbauer, Würzburg
fas II (monoclonal) α -mouse	1:10	A. Hofbauer, Würzburg
Penta-His (polyclonal) α -mouse	1:1000	Qiagen
Biotin conjugate (polyclonal) α -mouse	1:2000	Sigma
Anti-Digoxigenin-Fab fragments	1:5000	Roche
TH (polyclonal) α -rabbit	1:200	Neckameyer
Alexa488 Fluor-Goat α -mouse	1:200	Invitrogen
Alexa488 Fluor-Goat α -rabbit	1:200	Invitrogen
Cy TM 3-Goat α -rabbit	1:200	Dianova
Cy TM 3-Goat α -mouse	1:200	Dianova
HRP-Conjugate α -rabbit	1:10000	Sigma
HRP-Conjugate α -mouse	1:7500	Sigma
Green fluorescent protein serum α -rabbit	1:1000	Invitrogen
Green fluorescent protein serum α -mouse	1:50	Invitrogen

2.6. DNA-Material

2.6.1. Nukleotide

Primer von MWG oder Metabion wurden in einer Konzentration von 10 pmol verwendet

Oligo dT-Primer

Fermentas

CG5119 (*poly A binding protein*)

Linker-Primer mit Not I und Xho I Schnittstellen für *poly A binding protein*

Nukleotidsequenz (20 in Exon 2 – 242 in Exon 4)

NotpAbsense – Primer 5' - AAA GCG GCC GCA ATG GCT TCT CTA TAC – 3'

XhopAbpanti – Primer 5' - TTT CTC GAG TTA GTT GGC GGG CTC G – 3'

CG32575 (*hangover*)

Linker-Primer mit Hind III und Xho I Schnittstellen für *hangover* Nukleotidsequenz (1614 in Exon 4 – 823 in Exon 5)

hangAK1Hind5'-Primer 5' - AAA AAG CTT AAG TGC GTG CGC TGC GGA CT - 3'

hangAK1Xho3'-Primer 5' - TTT CTC GAG GCA CTG GTA CCA GTA CAG TG - 3'

Linker-Primer mit Hind III und Xho I Schnittstellen für *hangover* Nukleotidsequenz (543 in Exon 7 – 209 in Exon 8)

hangAK2Hind5'-Primer 5' - AAA AAG CTT AAG GCG GCC ATA GAG AGA ACA – 3'

hangAK2Xho3'-Primer 5' - TTT CTC GAG CTC AAT TTG TCG CAC CTG T – 3'

Linker-Primer mit Hind III und Xho I Schnittstellen für *hangover* Nukleotidsequenz (334 in Exon 6 – 549 in Exon 7)

HindAK3sense-Primer 5' - AAA AAG CTT AAG ATC CGC ATT CCG - 3'

XhoAK3anti-Primer 5' - TTT CTC GAG CGC CTT AGT GGC – 3'

CG32498 (*dunce*)

Gruppe1:

RORBneu-5'-Primer 5' - TCC GGA GGA TTG TAA TCT GG - 3'

RORBneu-3'-Primer 5' - GAC GTC GTT GAT CAG GGT CT - 3'

amplifiziert eine cDNA Sequenz von 217 bp im 3. Exon von RO und RB (Nukleotidposition 684-901)

Gruppe2:

RJRCneu-5'-Primer 5' - CAG CAA ATC CAA CAG CTT CA - 3'

RJRCneu-3'-Primer 5' - CTG CTC GCT GCT TGT GAT AA - 3'

amplifiziert eine cDNA Sequenz von 249 bp im 3. Exon von RI, RC, RJ, RK und RD (Nukleotidposition 743-960)

Gruppe3:

RMRAsense-Primer 5' - GTG GAA GCA AAT CTC CTT CG - 3'

RMRAanti-Primer 5' - GCG AAA GTT GTA GCA ACA GC - 3'

amplifiziert eine cDNA Sequenz von 444 bp im 2. Exon von RM und 1. Exon von RA (Nukleotidposition 186 - 630)

Gruppe4:

RGRNsense-Primer 5' - ACG AGG ACG ATG AGG ATC AG - 3'

RGRNanti-Primer 5' - GCG ATC GCT GGT CAT TAG AT - 3'

amplifiziert eine cDNA Sequenz von 242 bp im 1. Exon von RN und RG (Nukleotidposition 553-795)

Gruppe5:

RLsense-Primer 5' - AAT TGC CTA CCA TGC TCC C - 3'

RLanti-Primer 5' - GCC TGG ATC TTG ATG GAT T - 3'

amplifiziert eine cDNA Sequenz von 220 bp im 16. Exon von *dunce* (Nukleotidposition 57-277)

dncF1-Primer 5' - TTC AGC ATC GGC GAG TTC AGT G - 3'

dncB1-Primer 5' - ACC ACC ATT GTC TTT AGG TCG G - 3'

amplifiziert eine cDNA Sequenz von 556 bp vom 18. bis 21. Exon von *dunce* (Nukleotidposition 278 (Exon 18) – 82 (Exon 21))

RMRA 1.Exon5'-Primer 5' - CGC GAC GTC GAC GCA -3'

liegt im 1. Exon von RM (Nukleotidposition 11)

dunce 1.gemein Exon-Primer 3' 5' - TCT GTA GTA CCA AAC CGG C - 3'

liegt im 12. Exon von *dunce* und ist ein anti-Primer (Nukleotidposition 59)

Real RMRA sense-Primer 5' - ACA ACA ACA ACA GCC ACC AG - 3'

Real RMRA anti-Primer 5' - CGA AGG AGA TT GCT TCC AC - 3'

amplifiziert eine cDNA Sequenz von 150 bp im 1. Exon von RA und 2. Exon von RM (Nukleotidposition 50- 200)

RMRA antineu2-Primer 5' - CGT TGC AGC GCT GTT AGT T - 3'

liegt im 1. Exon von RA und im 2. Exon von RM (Nukleotidposition 334)

10085sense-Primer 5' - CTT GAG TTC GCC GTC GAA - 3'

liegt im Intron vor dem 8. Exon von *dunce* (Nukleotidposition 2810 bp vor Exon 8)

dnchinten-Primer 5' - TCT CGC CAC CAC TCT CGT – 3'

liegt im 23. Exon von *dunce* (Nukleotidposition 52)

CG10793 (Gen in *dunce*)

Genindunce sense 5' - ACG GTA TGG AGC ACT CTC TG - 3'

Genindunce anti 5' - CGA TGC ATG CTA ATC TCC TT - 3'

amplifiziert eine cDNA Sequenz von 245 bp und liegt im Exon von CG10793 (Nukleotidposition 1132-1377)

CG12529 (*zwischenferment*)

G6PDF-Primer 5' - ATG'ACG GAC GCA CTG GCT TCG AGC TGC - 3'

G6PDB-Primer 5' - AGC TTC TGC ACC ATC TCC TTG CCC AGG - 3'

amplifiziert eine cDNA Sequenz von 294 bp vom 4. und 5. Exon (Nukleotidposition 716-925)

G6PD2.antigroß 5' - GCC CAG CAC CAT GTC ATC CA – 3'

amplifiziert zusammen mit G6PDF-Primer eine cDNA Sequenz von 584 bp vom 4. und 5. Exon (Nukleotidposition 716-1300)

CG3665 (*fasciclinII*)

Fas2sense2-Primer 5' - TCG GAA GCT GTA CTC CGT CT – 3'

Fas2anti2-Primer 5' - AGT GTA TTG CCC GGA ACA AG – 3'

amplifiziert eine cDNA Sequenz von 581 bp im 6. Exon (Nukleotidposition 735-1316)

2.6.2. Vektoren

pET28a (+) Novagen

pCR II TOPO Invitrogen

2.7. Bakterienstämme

E. coli XL1-blue Stratagene

E. coli BL21 Novagen

2.7.1. Medien und Agarplatten

LB-Medium 1% Trypton
 0,5% Hefeextrakt
 1% NaCl
 einen Liter mit ddH₂O auffüllen
 pH 7,5

Agarplatten LB-Medium
 1,5% Agar
 autoklavieren
 auf ca. 50°C abkühlen
 Platten gießen

Apfelsaftplatten 3% Agar in einem Liter H₂O autoklavieren
 3 M Saccharose in Apfelsaft lösen
 Apfelsaft mit Saccharose in ca. 50°C warmen Agar
 Platten gießen

2.8. Puffer und Lösungen

2.8.1. Plasmid-Minipräparation

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-Puffer
 100 mM Tris/HCl
 10 mM EDTA
 auf 1 l ddH₂O auffüllen, pH 8,0

2.8.2. Puffer und Lösungen für SDS-PAGE und Western-Blot Analysen

Lösungen für SDS-Polyacrylamidgele:

Trenngellösung (für 2 Gele der kleinen Biorad Apparatur):

Acrylamid Konzentration	8%	10%	11%	12,5%
Acrylamid/Bisacrylamid	4 ml	5 ml	5,55 ml	6,25 ml
1,88 M Tris pH 8,8	3 ml	3 ml	3 ml	3 ml
0,5% SDS	3 ml	3 ml	3 ml	3 ml
H ₂ O	5 ml	4 ml	3,45 ml	2,75 ml
10% APS	75 µl	75 µl	75 µl	75 µl
TEMED	12,5 µl	12,5 µl	12,5 µl	12,5 µl

Sammelgellösung (für 2 Gele der kleinen Biorad Apparatur):

Acrylamid/Bisacrylamid	2 ml
0,625 M Tris pH 8,8	2,4 ml
0,5% SDS	2,4 ml
H ₂ O	5,2 ml
10% APS	70 µl
TEMED	12 µl

SDS-Laufpuffer (5x)
 30 g Tris
 144 g Glycin
 5 g SDS
 auf 1l mit dH₂O auffüllen, pH 8,9 einstellen

Lämmli-Probenpuffer (2x)
 125 mM Tris pH 6,8
 6% Glycerin
 2% SDS
 0,025% Bromphenolblau
 5% β-Mercaptoethanol
 auf 1l mit ddH₂O auffüllen

WB-Transferpuffer
 25 mM Tris
 150 mM Glycin
 10% Methanol
 auf 1l mit dH₂O auffüllen, pH 8,3 einstellen

Blocklösung 5% Milchpulver (fettfrei) in 1 x TBST lösen
Erwärmen und durch Faltenfilter filtrieren

2.8.3. Puffer und Lösungen für Immunhistochemie und *in-situ* Hybridisierung

PBS (10x) 8,0 mM Na₂HPO₄
1,5 mM KH₂PO₄
137,0 mM NaCl
2,7 mM KCl
auf 1l mit dH₂O auffüllen, mit 1N HCl pH 7,4 einstellen

PBT (Antikörperfärbung) 1x PBS
0,3% bzw. 0,5% Triton X-100

PBT (*in-situ* Hybridisierung) 1 x PBS
0,1% Tween

SSC (20x) 3 M NaCl
0,3 M NaCitrat
auf 1l mit H₂O auffüllen und pH 7,0 einstellen

Waschpuffer (*in-situ*) 100 mM Maleinsäure
150 mM NaCl
0,3% Tween
DEPC Wasser

Blocklösung (*in-situ*) 1% Blocking Reagent (Roche) in Waschpuffer

Detektionspuffer (*in-situ*) 100 mM Tris-HCl
100 mM NaCl
pH 9,5

Hybridisierungspuffer	50% Formamid 5x SSC 100µg/ml denaturierte Lachssperma-DNA 100µg/ml t-RNA 50µg/ml Heparin 0,1% Tween 20
-----------------------	---

2.8.4. Sonstige Puffer und Lösungen

TBST (10x)	100 mM Tris 1,5 M NaCl 0,5% Tween 20 auf 1l mit dH ₂ O auffüllen und auf pH 7,6 einstellen
TE	100 mM Tris/HCl 10 mM EDTA auf 1l mit dH ₂ O auffüllen und pH 8,0 einstellen
TBE (10x)	500 mM Tris/HCl 500 mM Borsäure 25 mM EDTA auf 1l mit dH ₂ O auffüllen und pH 8,0 einstellen
6 x Beladungspuffer	0,25% Bromphenolblau 40% Saccharose in 10 ml dH ₂ O lösen und steril filtrieren
Puffer B (RNA Bindung)	100 mM NaH ₂ PO ₄ 10 mM Tris-Cl 8 M Urea pH 8,0
Puffer C (RNA Bindung)	100 mM NaH ₂ PO ₄ 10 mM Tris-Cl 8 M Urea, pH 6,3

2.9. Sequenzierungen

bei MWG nach Angaben der Firma

2.10. Antibiotika

Ampicilin	50 mg/ ml in H ₂ O
Kanamycin	10 mg/ ml in H ₂ O
IPTG	100 mM in H ₂ O

2.11. Chemikalien

Die verwendeten Chemikalien sind von den Firmen Roth, Sigma oder Applichem bezogen. Falls einige Reagenzien anderer Firmen verwendet wurden, ist dies im Text vermerkt.

2.12. Methoden auf RNA-Ebene

2.12.1. Isolierung von RNA und cDNA Synthese

2.12.1.1. Isolierung von RNA mit Hilfe des TRIZOL Reagenz (Invitrogen)

Zu 500 µl homogenisierten Fliegen oder zu 500 µl Protein-RNA Gemisch werden 500 µl Trizol zugegeben und für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nun werden 200 µl Chloroform zugefügt, für 15 sec stark geschüttelt und dann für 3 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach 15 min zentrifugieren bei 12000 x g und 4°C wird der Überstand in ein neues Eppendorfgesäß überführt, 500 µl Isopropanol zugegeben und bei Raumtemperatur für 10 min inkubiert. Anschließend wird für 10 min bei 12000 x g bei 4°C zentrifugiert und das Pellet mit 75% Ethanol gewaschen. Nach erneuter Zentrifugation von 5 min bei 7500 x g bei 4°C wird das Pellet für 10 min Luft getrocknet und dann in RNase freiem Wasser gelöst und für eine halbe Stunde mit 1 µl DNase verdaut.

2.12.1.2. Isolierung von RNA mit Hilfe des RNeasy Mini-Kit (Qiagen)

Die Isolierung von total-RNA wird nach Angaben des Herstellers mit Hilfe des RNeasy Mini-Kit von Qiagen durchgeführt. Zusätzlich wird die isolierte RNA eine Stunde mit DNase I (Roche) bei 37°C inkubiert. Die Reaktion wird anschließend durch 10 minütiges Erhitzen bei

95°C abgestoppt. Für die Isolierung von mRNA wird das GenElute™ mRNA Miniprep Kit von Sigma verwendet. Auch hier folgt ein DNase 1 Verdau (siehe oben). Für die Isolierung von RNA werden entweder 40 adulte Fliegen verwendet oder 800-900 Fliegenköpfe.

2.12.1.3. Reverse Transkription

Zum Nachweis von Transkripten durch PCR-Analyse wird die aufgereinigte RNA in cDNA umgeschrieben. Dies geschieht mit Hilfe der reversen Transkriptase (SuperScript II von Invitrogen). Die einzelnen Reaktionsschritte sehen folgendermaßen aus:

- Template-RNA 0,8 µg (total RNA)
- Oligo(dT)-Primer 2 µl
- dNTPs (10mM) 2 µl

5 Minuten bei 65°C inkubieren lassen, kurz abzentrifugieren, auf Eis stellen und dann dazu pipetieren:

- 5 x First-Strand Puffer 8 µl
- DTT (0,1 M) 4 µl

2 Minuten bei 42°C inkubieren lassen, danach kurz zentrifugieren, auf Eis stellen und dann dazu pipetieren:

- SuperScript II (200 units) 1,5 µl

1,5 Stunden bei 42°C inkubieren lassen, danach die Reaktion durch Erhitzen auf 70°C für 15 Minuten abstoppen

- DNase freie RNase (Roche) 1 µl

20 Minuten bei 37°C inkubieren lassen, danach bei -20°C aufbewahren

2.12.1.4. Isolierung von RNA mit Hilfe des NucleoSpin RNA XS-Kit (Macherey-Nagel)

Die Isolierung von total-RNA aus jeweils 10 Fliegenköpfen wird mit Hilfe des NucleoSpin RNA XS-Kit durchgeführt. Das Umschreiben der RNA in cDNA und die anschließende RT-PCR erfolgt über das OneStep RT-PCR-Kit von Qiagen.

2.12.2. Semiquantitative RT-PCR

Mit Hilfe einer semiquantitativen RT-PCR lassen sich Transkriptionsunterschiede verschiedener Gene auf RNA-Ebene nachweisen. Der Unterschied lässt sich am besten während des linearen Anstiegs der Amplifikation nachweisen, da die Bestimmung im Sättigungsbereich der PCR keine Aussage über Mengenunterschiede mehr zulässt. Der Beste Zeitpunkt für die Messung wird erreicht, indem man die Menge der PCR-Produkte von verschiedenen Zyklenanzahlen analysiert. Des Weiteren benötigt man eine Beladungskontrolle, die von Beginn an im selben Reaktionsansatz mitbehandelt wird. Es wurde der Thermo-Start Master Mix von ABgene verwendet. Der Master Mix enthält folgende Komponenten:

- 1,25 units Thermo-Start DNA Polymerase
- 1 x Thermo-Start reaction buffer
- 3,0 mM MgCl₂
- 0,2 mM dNTPs

Hinzu kommt die jeweilige Menge an cDNA und die gewünschten Primer mit einer Konzentration von 10 pmol.

In der vorliegenden Arbeit werden die jeweiligen Primer auf die Reaktionsgefäße verteilt und anschließend der Master Mix mit der cDNA dazu gegeben. Nach kurzer Zentrifugation werden die Reaktionsgefäße noch mit je 50 µl Mineralöl überschichtet, in den Robocycler überführt und das gewünschte Programm gestartet.

Verwendetes PCR-Programm:

Bezeichnung	Temperatur [°C]	Zeit [min]
1. Initiale Denaturierung	95	15
2. Denaturierung	95	1
3. Primer-Hybridisierung	55	1
4. Polymerisation	72	1
Wiederholung der Schritte 2-4: 25, 28, 31 und 34-mal		
Abschließende Polymerisation	72	10

Nach Beendigung des Programms werden die Produkte entweder direkt gelelektrophoretisch analysiert oder bei -20°C aufbewahrt.

2.12.3. Semiquantitative RT-PCR mit Hilfe des OneStep RT-PCR Kit

Der Master-Mix für eine PCR enthält folgende Komponenten:

H ₂ O RNase-frei	variabel
5 x Qiagen OneStep RT-PCR Puffer	10 µl
dNTP Mix (10 mM)	2 µl
Primer A (0,6 µM)	variabel
Primer B (0,6 µM)	variabel
Qiagen OneStep RT-PCR Enzym Mix	2 µl
Template RNA (1 pg – 2 µg/Reaktion)	variable
Gesamtvolumen	50 µl

Verwendetes PCR-Programm:

Bezeichnung	Temperatur [°C]	Zeit [min]
1. Reverse Transkription	50	30
2. Initiale PCR Aktivierung	95	15
3. Denaturierung	94	1
4. Primer-Hybridisierung	55	1
5. Polymerisation	72	1
Wiederholung der Schritte 3-5: 25, 28, 31, 34-mal		
Abschließende Polymerisation	72	10

Nach Beendigung der PCR-Reaktion werden die Proben gelelektrophoretisch analysiert.

2.12.4. RNA-Gelelektrophorese

Nachdem die RNA aufgereinigt wurde, werden jeweils 15 µg RNA mit 6fach konzentriertem Ladepuffer (Formaldehyd, Formamid, 10 x MOPS, 0,01 µg/ml Ethidiumbromid) versetzt und für 10 Minuten bei 70°C erhitzt. Die Auftrennung der RNA erfolgt im 1,5%-igem Formaldehyd-Agarosegel unter denaturierenden Bedingungen. Als Referenz dient ein Standard mit RNA-Fragmenten definierter Größe (High Range RNA ladder, Peqlab).

2.13. Methoden auf DNA-Ebene

2.13.1. DNA-Gelelektrophorese

Mit der DNA-Gelelektrophorese kann man DNA-Fragmente der Größe nach auftrennen. Die Konzentration der Agarose kann hier, je nach DNA Fragmentlänge, bei 0,4 bis 2% liegen. Für ein 0,8%iges Gel mit einem Fassungsvermögen von 100 ml werden 0,8 g Agarose in 100 ml TBE Puffer aufgekocht, bis sich die Agarose aufgelöst hat. Dies lässt man nun auf ca. 60°C abkühlen und gibt dann 9 µl einer 1%-igen Ethidiumbromidlösung dazu. Ethidiumbromid ist ein Fluoreszenzfarbstoff, der sich in Nukleinsäuren einlagert und somit die DNA oder RNA im UV-Licht sichtbar macht. Die noch flüssige Agarose wird nun in einen Gelschlitten mit Probenkamm gegossen. Nachdem das Gel fest geworden ist, wird der Kamm entfernt und das Gel in der mit TBE gefüllten Gelkammer beladen und einer Spannung von 100 Volt ausgesetzt. Die DNA kann anschließend unter UV-Licht fotografiert werden.

2.13.2. Linker-PCR

Sind in der zu klonierenden Sequenz nicht die richtigen oder keine Restriktionsschnittstellen, so kann man diese in die Sequenz einbringen. Dazu werden die gewünschten Schnittstellensequenzen an Primer angehängt und so über eine Standard PCR in die amplifizierte Sequenz eingebaut.

2.13.3. Plasmid-DNA Minipräparation

Eine über Nacht gewachsene 3 ml Bakterienkultur wird 30 sec bei 13000 x g zentrifugiert und das Bakterienpellet in 100 µl GTE-Puffer durch vortexen resuspendiert. Es werden 200 µl alkalischer Lyse Puffer zugegeben, durch vortexen gemischt und 5 min auf Eis inkubiert. Anschließend werden 150 µl Kaliumacetatlösung hinzugefügt, gevortext und für 2 min bei 13000 x g zentrifugiert. Der Überstand wird in ein neues Eppendorfgefäß überführt, 100% Ethanol zugegeben, invertiert und für 10 min bei 13000 x g bei 4°C zentrifugiert. Das Pellet wird mit 500 µl 70% Ethanol gewaschen, für 5 min Luft getrocknet und anschließend in 50 µl TE-Puffer gelöst.

2.13.4. Plasmid-DNA Midipräparation

Die DNA einer 200 ml Bakterienkultur wird mit dem QIAGEN[®] Plasmid Midi Kit nach Angaben des Herstellers durchgeführt.

2.13.5. Restriktionsverdau

Ein präparativer DNA Verdau wird für 2 Stunden bei 37°C durchgeführt, dabei wird folgender Ansatz verwendet:

- 2 µg DNA
- 2 µl 10x Puffer
- 5 U Restriktionsenzym
- X µl dd H₂O

Gesamtvolumen: 20 µl

Die Reaktion wird entweder durch Hitze inaktiviert oder die DNA wird gefällt.

2.13.6. Fällung von DNA

Das Volumen der zu fällenden DNA wird mit dd H₂O auf 90 µl aufgefüllt, es werden 10 µl 3M NaOAc und 300 µl 100% Ethanol zugegeben, gemischt und über Nacht bei -80°C inkubiert. Nun wird für 20 min bei 13000 x g zentrifugiert und das Pellet mit 600 µl 70% Ethanol gewaschen. Anschließend wird das Pellet für 5 min Luft getrocknet und in 25 µl dd H₂O gelöst.

2.13.7. DNA Ligation

Die Konzentration der verwendeten Vektor- bzw. Insert-DNA richtet sich nach deren Größe. Bei einem ca. drei bis sechsmal kleineren Insert empfiehlt es sich ein Konzentrationsverhältnis von 1:3 (Vektor: Insert) zu verwenden. Bei gleichgroßen Fragmenten kann im Verhältnis von 1:1 ligiert werden. Die Ligationsreaktion erfolgt nach folgendem Ansatz:

- 150 ng Vektor DNA
- X ng Insert DNA
- 2 µl 10x Puffer
- 1 µl T4 Ligase
- X µl dd H₂O

Gesamtvolumen: 20 µl

Die Ligation erfolgt für 2 Stunden bei 22°C.

2.13.8. DNA Transformation in hitzekompetente *E. coli* Zellen

Die hitzekompetenten Zellen werden auf Eis aufgetaut und 50-100 ng des Liagationsansatzes dazu pipettiert. Die Zellen bleiben für weitere 30 min auf Eis und bekommen anschließend einen Hitzeschock von 90 sec bei 42°C. Unmittelbar danach werden die Zellen für 3 min erneut auf Eis gestellt. Danach werden 400 µl LB-Medium (Handwarm) zugegeben und bei 37°C für eine Stunde geschüttelt. Danach werden die Bakterien auf Antibiotika-haltigen Agarplatten ausplattiert und über Nacht bei 37°C bebrütet.

2.13.9. Verwendete Kits

Folgende Kits wurden nach Herstellerangaben verwendet:

QIAGEN [®] Plasmid Midi Kit	Qiagen
QIAEX [®] II Gel Extraction Kit	Qiagen
QIAGEN Plasmid Mini Kit	Qiagen
QIAquick PCR Purification Kit	Qiagen

TOPO TA Cloning [®]	Invitrogen
QIAGEN [®] RNeasy Mini Kit	Qiagen
NucleoSpin RNA XS	Macherey-Nagel
QIAGEN [®] OneStep RT-PCR Kit	Qiagen

2.14. Immunhistochemische Methoden

2.14.1. Antikörperfärbung von *whole-mount Drosophila* Köpfen

Die Gehirne werden in Ringer präpariert und in 1 x PBS auf Eis aufbewahrt, bis sie in 5% Formaldehyd in PBS für 30 Minuten (Larven) bzw. 40 Minuten (Adulte) fixiert werden. Danach wird 3 x 5 min mit PBT 0,5% Triton gewaschen und für eine Stunde in 10% NHS in PBT geblockt. Der erste Antikörper wird in PBT mit 10% NHS über Nacht bei 4°C inkubiert. Anschließend wird erst 3 mal 5 Minuten in PBT gewaschen und dann 3-mal 10 Minuten gewaschen. Der zweite Antikörper wird für zwei Stunden bei Raumtemperatur in PBT mit 10% NHS inkubiert. Nun wird wieder 3 mal 10 Minuten in PBT gewaschen und anschließend werden die Gehirne für 30 Minuten in ein Gemisch aus 50% Glycerol und 50% PBT überführt. Danach werden sie auf einen Objektträger in Vectashield eingebettet.

2.14.2. Gefrierschnitte

Die Gefrierschnitte von adulten *Drosophila* Köpfen wurden wie bei Buchner *et al.*, 1986 beschrieben angefertigt.

2.14.3. Präparation, Fixierung und Fluoreszenzfärbung von polytären Chromosomen

Zunächst werden den Larven (drittes Larvenstadium) die Speicheldrüsen in gekühltem 1 x PBS heraus präpariert. Die Speicheldrüsen werden auf einem mit Poly-Lysine überzogenen Objektträger in 45%iger Essigsäure für 5 min fixiert. Anschließend wird ein Deckgläschen auf das Präparat gelegt und die Speicheldrüse mithilfe eines Hämmerchens zerquetscht. Zur Überprüfung des Vorganges kann man sich die Chromosomen unter dem Mikroskop im Phasen-Kontrast-Licht ansehen. Wenn das Quetschen erfolgreich war, werden die Objektträger in flüssigen Stickstoff getaucht und danach das Deckgläschen abgesprengt. Nun werden die Präparate 3-mal 10 min in 1x PBS gewaschen und anschließend wird in 2%iger Milchlösung über Nacht bei 4°C geblockt. Nach erneutem dreimaligem Waschen mit PBS für je 10 min, wird mit dem ersten Antikörper für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend wieder 3-mal 10 min mit PBS gewaschen. Der Fluoreszenz-markierte

Zweitantikörper wird im Dunkeln für zwei Stunden bei Raumtemperatur hinzu gegeben. Danach wird das Präparat 3-mal für jeweils 5 min gewaschen und mit einem Tropfen Propidiumiodid haltigem Einbettmedium (Vectashield, Burlingame, CA) eingedeckelt. Das Propidiumiodid interkaliert mit der DNA und führt zu einer roten Fluoreszenz.

2.14.4. RNA *in-situ* Hybridisierung an Embryonen, Larven und Adulten *Drosophila*

Herstellung der *in-situ* Probe

Synthese der Digoxigenin-markierten (Dig) RNA Probe

Für die Synthese einer RNA Probe wird die gewünschte DNA Sequenz mit Hilfe einer PCR vervielfältigt und in den pCRII-TOPO Vektor (Invitrogen) kloniert.

Ansatz:

PCR-Produkt:	4 µl
Salzlösung:	1 µl
Vektor:	1 µl
Endvolumen:	6 µl

Der Ansatz wird für 20 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Nachdem die chemisch kompetenten TOPOF[®]OneShot Zellen auf Eis aufgetaut wurden, werden 2 µl des Ansatzes hinzu pipettiert und das Ganze für 10 Minuten auf Eis inkubiert. Nun bekommen die Zellen einen Hitzeschock für 30 Sekunden bei 42°C, danach werden sie sofort wieder auf Eis überführt. Zu den Zellen werden 250 µl 37°C warmes S.O.C. Medium gegeben und die Zellen für eine Stunde bei 37°C horizontal geschüttelt. Danach werden je 200 µl der Zellen auf Ampicillin-Agarplatten (mit 40 µl 100 mM IPTG und 40 µl x-GAL(40 mg/ml)) ausplattiert und über Nacht bei 37°C bebrütet. Am nächsten Tag können die weißen Kolonien gepickt werden.

Mit Hilfe der Kolonien werden 1,5 ml LB-Übernachtskulturen angesetzt und anschließend eine alkalische Plasmid-Minipräparation durchgeführt. Die DNA wird dann einem Test-Restriktionsverdau mit dem Restriktionsenzym EcoR I unterworfen. Das Restriktionsenzym EcoR I hat auf beiden Seiten des eingebauten Inserts eine Restriktionschnittstelle. Somit kann man leicht feststellen, ob die gewünschte DNA-Sequenz tatsächlich eingebaut wurde. Hat man den richtigen Klon identifiziert, wird von der 1,5 ml Übernachtskultur eine 200 ml Übernachtskultur angeimpft und eine Plasmid-Midipräparation durchgeführt. Die so gewonnene DNA wird jeweils mit den Enzymen Hind III und Xho I verdaut. Danach wird

eine Ethanol-Fällung durchgeführt, dabei wird das gewonnene Pellet in 20 μ l RNase-freiem Wasser gelöst.

Die DNA wird nun in RNA umgeschrieben und dabei mit Digoxigenin markiert.

Ansatz:

DNA:	15 μ l
Dig RNA labeling mix:	2 μ l
10 x Transkriptionspuffer:	2 μ l
Polymerase Sp6 (für Xho I Verdau)	2 μ l
T7 (für Hind III Verdau):	

Der Ansatz wird für zwei Stunden bei 37°C inkubiert und anschließend einem DNase Verdau von 15 Minuten bei 37°C unterzogen.

Die so gewonnene RNA wird nun mit Hilfe des RNeasy-Clean up Protokolls (RNeasy Mini-kit von Qiagen) aufgereinigt.

Orientierung der Probe feststellen

Um heraus zu finden, welche Orientierung das PCR-Produkt im Vektor hat, wird eine PCR auf der unverdauten DNA durchgeführt. Dabei verwendet man einen Primer der Ausgangs-PCR und einen Vektor-spezifischen Primer in vorwärts bzw. rückwärts Richtung. Eine Reaktion sollte dabei ein PCR-Produkt ergeben, die andere Reaktion nicht, abhängig davon, welcher Primer in der Ausgangs-PCR verwendet wurde. Aus der Kombination von erhaltenem oder nicht erhaltenem PCR-Produkt und der verwendeten Primer kann man schließen, welche Orientierung das Insert hat.

Bestimmung der Probenkonzentration (Dot Blot)

Mit Hilfe eines Dot Blots kann die Konzentration der *in-situ* Probe ermittelt werden. Dabei stellt man von der neu synthetisierten Probe und von einer markierten Kontroll-RNA jeweils eine Verdünnungsreihe her.

Verdünnungsreihe:

Markierte Kontroll-RNA:

RNA		Waschpuffer	
2 μ l	+	38 μ l	1 ng
5 μ l	+	45 μ l	100 pg
5 μ l	+	45 μ l	10 pg
5 μ l	+	45 μ l	1 pg

Markierte Probe:

RNA		Waschpuffer	Verdünnung
5 μ l	+	45 μ l	1:10
5 μ l	+	45 μ l	1:100
5 μ l	+	45 μ l	1:1000
5 μ l	+	45 μ l	1:10000

Von diesen Verdünnungsreihen wird je 1 μ l auf eine Nylonmembran pipettiert. Nachdem die Proben ca. zwei Minuten trocknen konnten, wird die RNA mit Hilfe von UV-Strahlung auf der Membran verlinkt. Anschließend wird die Membran kurz mit Waschpuffer gewaschen und dann für 15 Minuten in Blocklösung inkubiert. Der Antikörper gegen Digoxigenin wird für 30 Minuten in Blocklösung dazu gegeben und anschließend wird zweimal für 15 Minuten gewaschen. Für die Färbung wird die Membran kurz mit Detektionspuffer benetzt und dann wird das Gemisch aus NBT und BICP (45 μ l NBT, 35 μ l BICP in 10 ml Detektionspuffer) für 30 Minuten im Dunkeln zugegeben. Die Proben werden nun, je nach Konzentration, blau bis dunkelblau.

***In-situ* Hybridisierung**

Gewebe Fixierung bei Larven und Adulten

Die Gehirne werden in *Drosophila* Ringer präpariert und in ein mit 1x PBS befülltes Eppendorfgefäß überführt. Die Proben werden in 10% Formaldehyd fixiert (Larvale Gehirne für 20 Minuten, adulte Gehirne für 30 Minuten). Danach wird dreimal für 15 Minuten mit PBT (0,1% Tween) gewaschen und die Gehirne anschließend in 1:1 PBT/ Ethanol, dann in

75% Ethanol und schließlich in 95% Ethanol überführt. In 95% Ethanol können sie bei -20°C aufbewahrt werden.

Gewebe-Fixierung bei Embryonen

Die Embryonen werden mit PBT von den Apfelsaftplatten gewaschen und über einen Gazefilter gesammelt. Dann werden sie mit 5% NaOCl für 4 Minuten dechorinisiert und erneut mit PBT gewaschen. Nachdem Heptan zu den Embryonen gegeben wurde, werden sie in 5 ml Glasröhrchen überführt und mit einem 1:1 Gemisch aus Heptan und 10% Formaldehyd für 20-30 Minuten fixiert. Danach werden die wässrige Phase und das meiste Heptan entnommen, die verbliebenen Embryonen mit Methanol überschichtet und ca. 15-mal kräftig geschüttelt. Anschließend sinken die devitellinisierten Embryonen zu Boden und die restliche Flüssigkeit wird verworfen. Nach erneutem Waschen mit Methanol können die Embryonen in 100% Ethanol bei -20°C aufbewahrt werden.

Der Ethanol wird entfernt und das Gewebe mit einer 1:1 Mischung aus 100% Ethanol und Xylen für 30 Minuten bei leichtem Schütteln inkubiert, gefolgt von dreimaligem Waschen mit 100% Ethanol. Anschließend wird dreimal 15 Minuten mit PBT gewaschen und für 20 Minuten mit 5% Formaldehyd fixiert. Nach der Fixierung wird 3-mal 15 Minuten mit PBT gewaschen und anschließend das Gewebe mit 50 µl Proteinase K (1 µl pro 1 ml PBT) für drei Minuten verdaut. Parallel wird der anti-DIG Antikörper (Roche) in 1:100 PBT verdünnt, über Nacht bei 4°C präabsorbiert. Der Proteinase K Verdau wird durch zweimaliges Waschen mit Glycin (20 µl pro 1 ml PBT) und dreimaliges kurzes Waschen mit PBT gestoppt. Es erfolgt eine zweite Fixierung mit 5% Formaldehyd für 15 Minuten, gefolgt von drei Waschschritten mit PBT a 5 Minuten. Anschließend wird das Gewebe in PBT/ Hybridisierungspuffer (1:1) überführt und dann für eine Stunde oder länger bei 55°C in Hybridisierungspuffer inkubiert. Die Sonde wird über Nacht in einem geringen Volumen Hybridisierungspuffer (vorgewärmt) zugegeben. Am nächsten Tag wird einmal mit vorgewärmten Hybridisierungspuffer gewaschen, anschließend erfolgt ein Durchgang mit PBT/ Hybridisierungspuffer (1:1) für 30 Minuten bei 55°C. Gefolgt von 5 Waschschritten a 15 min mit PBT bei 55°C und einmal waschen in PBT für 10 min bei Raumtemperatur. Dann werden die Präparate über Nacht bei 4°C mit dem präabsorbierten anti-DIG Antikörper (1:20 in PBT) inkubiert. Nach 4-maligem Waschen mit PBT für je 20 min in PBT, werden die Proben zweimal in NBT Puffer gewaschen. Für die anschließende Färbereaktion werden 4,5 µl NBT und 3,5 µl BCIP (Roche) in 1 ml NBT Puffer angesetzt. Die Präparate werden für 10 min - 2 Stunden im Dunkeln inkubiert. Die Reaktion wird mit 3-4-maligem Waschen mit PBT gestoppt, wenn das

Gewebe sich violett gefärbt hat. Die Präparate könne in 50% Glycerol bei 4°C aufbewahrt werden.

2.15. Proteinbiochemische Methoden

2.15.1. SDS-PAGE (Polyacrylamidgelelektrophorese)

Die SDS-PAGE Methode dient der denaturierenden, diskontinuierlichen Aufreinigung von Proteinen nach ihrem Molekulargewicht. Das Detergenz SDS (Natriumdodecylsulfat) denaturiert und Mercaptoethanol reduziert das Protein. Die SDS-PAGE besteht aus zwei Phasen, einem niedrig konzentriertem Sammelgel und einem höher konzentriertem Trenngel. Der Grad der Molekülauftrennung wird vom Vernetzungsgrad der Acrylamidmoleküle bestimmt. TEMED dient dabei als Katalysator und Ammoniumsulfat (APS) als Starter der Polymerisation. Die Apparatur wird nach Herstellerangaben (Mini Trans-Blot Cell, Biorad) zusammengesetzt. Als erstes wird das Trenngel gegossen und dünn mit wässrigem Butanol überschichtet um Luftblasen aus dem Gel zu entfernen. Nachdem das Trenngel fest geworden ist, wird das Butanol abgekippt, das Sammelgel aufgegossen und der Kamm eingefügt. Wenn das Gel fest ist wird es nach Herstellerangaben in die Elektrophoresekammer eingebaut und die Proben werden in die Taschen gefüllt. Anschließend lässt man es für ca. eine Stunde bei 35 mA in 1x SDS-Laufpuffer laufen.

2.15.2. Western-Blot Analyse

Beim *tank-electroblotting* Verfahren werden Proteine aus einem Gel auf eine Nitrocellulosemembran gebracht. Dabei sind Gel und Membran komplett in einem mit Transfer-Puffer gefüllten Tank eingetaucht. Der Aufbau erfolgt nach Herstellerangaben (Mini Trans-Blot Cell, Biorad). Nachdem Blotverfahren wird die Membran in 5% Milchpulver über Nacht bei 4°C geblockt. Nach dreimaligem Waschen mit 1x TBST kann über Nacht bei 4°C oder für eine Stunde bei Raumtemperatur mit dem ersten Antikörper inkubiert werden. Es wird mehrmals mit 1x TBST gewaschen. Der mit Meerrettich-Peroxidase gekoppelte Zweitantikörper wird für eine Stunde bei Raumtemperatur zugegeben. Nach erneutem waschen werden die zwei ECL Detektionsreagenzien (Amersham) im Verhältnis 1:1 gemischt und die Membran für eine min damit überschichtet. Es erfolgt eine Chemilumineszenz erzeugende Reaktion, die von der Peroxidase katalysiert wird. Dabei wird unter alkalischen Bedingungen energiereiches zyklisches Luminol oxidiert und die dabei entstehende Energie wird als Licht freigesetzt. Die Wellenlänge des emittierten Lichts liegt bei 428 nm und kann durch kurzes Exponieren auf einem Röntgenfilm nachgewiesen werden.

2.15.3. Herstellung von 6 x His Fusionsproteinen

Rekombinante Proteine können in *E.coli* Zellen exprimiert und mit Hilfe von angehängten Histidinresten anschließend aufgereinigt werden. Dazu wird die kodierende Sequenz für ein Protein in den 5,4 kb großen pET28abc (+)-Vektor kloniert.

Klonierung des His-markierten polyA-binding Proteins

Das 1902 bp große *polyA binding protein* Gen wurde mittels Linker-PCR, aus cDNA, amplifiziert und das PCR Produkt in den pET28b (+) Vektor eingebaut. Der NotpAbsense Primer besitzt einen Linker mit einer Sequenz für eine Not I Schnittstelle und ist komplementär zum ersten ATG und der weiteren *pAbp* Sequenz. Der XhoI-Primer enthält einen Linker mit einer Sequenz für eine Xho I Schnittstelle und ist komplementär zum 3'-Bereich der *pAbp* Sequenz. Die Linker-Primer wurden so gewählt, dass die Sequenz des Gens im richtigen Leseraster in den Vektor eingeführt wird und somit im 5' Bereich des Proteins ein Histidin Rest angehängt werden kann.

Klonierung der His-markierten Hangover Fragmente

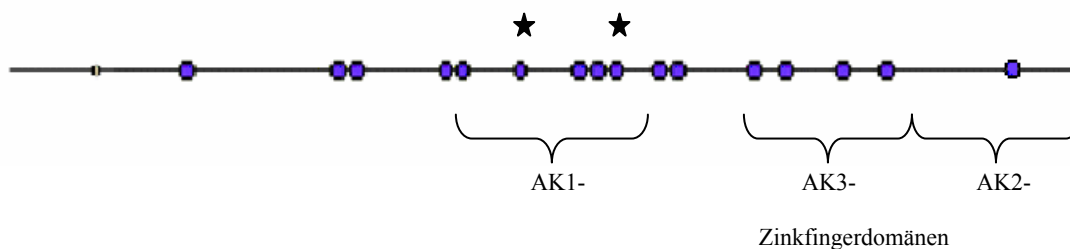


Abb.2.1: Lage der klonierten Fusionsproteine von Hangover

Das Hangover Protein besitzt 16 Zinkfingerdomänen. Das Fusionsprotein AK1 enthält fünf Zinkfingerdomänen, welche in der Mitte der Proteinsequenz zu finden sind. Zwei dieser Domänen findet man häufig in RNA modifizierenden Proteinen (Sternchen). Das AK2 Fragment besitzt eine Zinkfingerdomäne und erstreckt sich über ca. 1000 bp des C-terminalen Bereiches. Fusionsprotein AK3 enthält vier Zinkfingerdomänen und liegt zwischen dem AK1 und dem AK2 Fragment.

Für das Hangover Protein wurden drei verschiedene Protein Fragmente kloniert. Das 1053 bp große AK1 Fragment enthält fünf Zinkfingerdomänen, das 996 bp große AK2 Fragment beinhaltet eine Zinkfingerdomäne und das 828 bp große AK3 Fragment besitzt vier Zinkfingerdomänen (siehe Anhang 9.2). Alle drei Fragmente wurden mittels Linker-PCR auf cDNA Template amplifiziert. Die für das jeweilige Fragment komplementären Primerpaare enthalten eine Hind III bzw. Xho I Restriktionsschnittstelle über welche das PCR Fragment in

den pET28b(+) Vektor ligiert wurde. Auch hier wurde darauf geachtet, dass die Gensequenz im richtigen Leseraster in den Vektor eingebaut wird. Anschließend wurden die klonierten DNA Fragmente von *hangover* und die klonierte DNA von *polyA binding protein* in *E. coli* XL1-blue Zellen vermehrt und durch Restriktionsverdau und anschließender Sequenzierung auf ihre Richtigkeit hin untersucht.

2.15.4. Induktion und Expression von 6 x His markierten Proteinen

Fusionsproteine müssen induzierbar sein, um von den Bakterien exprimiert zu werden. Dazu werden die klonierten DNA Konstrukte in *E. coli* BL21 Zellen transformiert und anschließend je eine Kolonie in 10 ml Kanamycin-haltigem LB-Medium über Nacht bei 37°C vermehrt. Die über Nacht gewachsenen Bakterien werden dann in 200 ml, mit Kanamycin versetztem, LB-Medium überführt und für ca. zwei Stunden bis zu einer OD₆₀₀ von 0,4 bis 0,5 bei 37°C inkubiert. Nun wird jeweils 1 ml Bakterienkultur entnommen, zentrifugiert und das Pellet mit 2 x Lämmli-Probenpuffer gelöst und bei -80°C aufbewahrt. Die 200 ml Bakterienkultur wird mit IPTG (Endkonzentration 1 mM) induziert und für 4-5 Stunden bei 37°C geschüttelt. Anschließend wird erneut eine 1 ml Probe entnommen und wie oben beschrieben behandelt. Die 200 ml Kultur wird nun für eine halbe Stunde zentrifugiert und das Pellet kann dann bei -20°C aufbewahrt werden. Die Induktion des Proteins kann mithilfe einer Western-Blot Analyse überprüft werden. Dazu verwendet man die vor und nach der Induktion entnommenen Proben und prüft mit einem anti-Histidin Antikörper, ob die Fusionsproteine nach IPTG Zugabe exprimiert wurden.

2.15.5. RNA Bindung an 6 x His Fusionsproteine

Die induzierten Bakterienpellets werden pro Gramm mit 5 ml Puffer B resuspendiert und eine Stunde bei Raumtemperatur leicht geschüttelt. Danach wird für 30 Minuten bei 14 K zentrifugiert und pro 4 ml Überstand 1 ml Ni-NTA Agarose zugegeben. Das Ganze wird wiederum für eine Stunde bei Raumtemperatur geschüttelt und anschließend in eine Poly-Prep Chromatographie Säule (Bio-Rad) überführt. Nachdem die Flüssigkeit vollständig aus der Säule herausgelaufen ist, wird diese zweimal mit 4 ml Puffer C gewaschen und dann mit der gesamt RNA aus 40 Wildtyp Fliegen für eine Stunde bei 4°C inkubiert. Dafür wird die isolierte RNA Lösung in 1 ml Puffer C aufgenommen und jeweils 1 µl RNasin Plus (Promega) zugegeben. Nach der Inkubation kann die Flüssigkeit wieder vollständig aus der Säule heraus laufen und es wird erneut dreimal mit 4 ml Puffer C gewaschen. Die RNA wird

anschließend mithilfe des TRIZOL Reagenz aus dem Proteingemisch isoliert und kann dann auf einem RNA-Formamid-Agarosegel analysiert oder in cDNA umgeschrieben werden.

2.16. Verhaltensanalysen

2.16.1. Messung von Ethanolsensitivität und Toleranz

Für eine Messung von Ethanolsensitivität und Toleranz werden ungefähr 100 zwei bis fünf Tage alte männliche Fliegen gesammelt. Sie können sich für 48 Stunden bei 25°C von der CO₂ Behandlung erholen, bevor sie getestet werden. Alle x-chromosomalen Mutanten werden mit *attached x* Weibchen gekreuzt, um die Auswirkungen möglicher Modifier zu minimieren. Die Fliegen untersucht man im Inebriometer, indem eine konstante Mischung aus Ethanoldampf und Wasser gesättigter Luft herrscht. Alle Experimente werden mit einer Ethanol-/ Wasserdampf Konzentration von 50U (EtOH)/ 45U (Luft) oder 52/40 (bei GAL4-Linien) durchgeführt. Die Konzentration 50/45 entspricht ungefähr 15 mM Ethanol (Moore *et al.*, 1998). Eine Messung im Inebriometer dauert 57 min, dabei wird eine sog. *Mean elution time* (MET) ermittelt. Dies ist der Zeitpunkt, bei dem die meisten Fliegen aus dem Inebriometer eluieren. Sie errechnet sich wie folgt: $MET = [(Anzahl\ der\ eluierten\ Fliegen\ nach\ jeweils\ 3\ min\ (Dauer:\ 57\ min) * (Zeitpunkt\ der\ Elution)] / (Gesamtzahl\ der\ eluierten\ Fliegen)$ Die MET1 gibt Aufschluss über die Ethanolsensitivität der getesteten Fliegen. Nach einer Ausnüchterungsphase von 4 Stunden bei 25°C in mit Tüchern befeuchteten Gläschen werden die Fliegen für einen zweiten Durchgang in das Inebriometer inseriert. Mithilfe von MET1 und MET2 kann die Toleranzentwicklung der Fliegen bestimmt werden. Die Formel zum Errechnen der Toleranz sieht folgendermaßen aus:

$$Toleranz = (MET2 - MET1) / MET1 * 100$$

Für die Kinetik der Toleranzentwicklung von *dnc*^{A143} und *hang*^{AE10} Mutanten, wurde die Toleranz nach zwei, vier und 16 Stunden Erholungsphase gemessen.

2.16.2. Messung von Hitze-Ethanol Resistenz

Für das Hitze-Ethanol-Crosstoleranz Experiment werden die Fliegen für 30 min in einem 37°C Wasserbad inkubiert und nach einer Erholungsphase von 3½ Stunden bei 25°C im Inebriometer getestet (MET2 Crosstoleranz). Zusätzlich wird für eine weitere Gruppe von Fliegen die Toleranzentwicklung ohne Hitzeschock analysiert. Die Hitze-Ethanol-Crosstoleranz errechnet sich wie folgt:

$$\text{Crosstoleranz} = (\text{MET2}^{\text{Crosstoleranz}} - \text{MET1}^{\text{ohne Hitzeschock}}) / \text{MET1}^{\text{ohne Hitzeschock}} * 100$$

2.16.3. Messung von olfaktorischem Lernen und Gedächtnis

Olfaktorisches assoziatives Lernen bzw. Gedächtnis wird in der Tully und Quinn (1985) Maschine gemessen, welche, wie in Schwärzel *et al.*, 2002 beschrieben, modifiziert wurde. Ungefähr 100 drei bis vier Tage alte Fliegen werden darauf trainiert zwei Düfte zu unterscheiden. Dafür bringt man die Fliegen in Trainingsröhrchen und setzt sie einem Duft A, gepaart mit 12 Elektroschockpulsen (90V), aus. Es folgt eine Minute Pause mit frischer Luft, gefolgt von der Präsentation von Duft B ohne Elektroschocks. Es gibt wiederum eine Pause von 45 Sekunden mit frischer Luft. Für das zwei Minuten Lernen werden die Fliegen nun ungefähr 100 Sekunden nach dem Training in die Mitte von zwei Teströhrchen gebracht, wo sie sich für zwei Minuten zwischen dem bestrafte Duft A und dem unbestrafte Duft B entscheiden können. Wenn die Fliegen erst zu einem späteren Zeitpunkt getestet werden, überführt man die Fliegen vorsichtig in kleine Plastikröhrchen. Diese werden, zum Schutz vor äußeren Einflüssen, für die gewünschte Zeit in eine Plastikbox gesetzt. Anschließend bringt man die Fliegen in die Mitte der Teströhrchen und präsentiert die beiden Düfte für zwei Minuten. Das Experiment wird reziprok wiederholt. Dies bedeutet, einmal wird Duft A bestraft und Duft B bleibt unbestraft, für die zweite Gruppe wird Duft B bestraft und Duft A bleibt unbestraft. Für beide Gruppen wird die Präferenz zwischen Duft A und Duft B bestimmt. Dann wird der Performance Index berechnet, indem man den Mittelwert aus den beiden reziproken Gruppen bildet. Berechnung der Präferenz für eine Gruppe:

$$\text{PI} = (\text{Duft unbestraft} - \text{Duft bestraft}) / (\text{Duft unbestraft} + \text{Duft bestraft}) * 100$$

Als Düfte werden 3-Octanol (1:100) und 4-Methylcyclohexanol (1:80) in Mineralöl (Sigma) verwendet. Bei den Messungen der *hang^{AE10}* Mutante wird 4-Methylcyclohexanol 1:300 verdünnt. Die Düfte werden in Cups mit 14 mm Durchmesser präsentiert. Die Luftfeuchtigkeit während den Messungen beträgt zwischen 70-80 %.

2.16.4. Auswertung und Statistik

Die Verhaltensdaten sind immer mit Mittelwert und Standardfehler angegeben. Die Signifikanz der gesamten Verhaltensdaten wurde mithilfe des zweiseitigen Student's *t*-Tests und Bonferroni Korrektur ermittelt. Als signifikant unterschiedlich wurden die Daten bei einem *p*-Wert von $\leq 0,05$ (- Bonferroni Korrektur) angesehen.

Die Fluoreszenz-markierten Antikörperfärbungen an verschiedenen Geweben wurden mit dem konfokalen Laserscanmikroskop von Leica analysiert. Dabei wurde von einem Präparat ein Bilderstapel mit jeweils 1 μm breiten Bildern angefertigt. Die konfokalen Bilderstapel sind mithilfe der ImageJ Software in Z-Projektionen umgewandelt worden und die jeweilige Farbcodierung wurde gewählt. Dabei ist die Antikörperfärbung mit Alexa488 in grün und die Antikörperfärbung mit Cy3 in magenta dargestellt.

3. Ergebnisse

Ziel dieser Doktorarbeit ist es, den molekularen Mechanismus zu identifizieren mit dem Hangover zur Ethanoltoleranzentwicklung beiträgt. Dazu wurden verschiedene Ansätze gewählt. Es wurde untersucht, auf welche Weise das Hangover-Protein in der Zelle funktioniert. Anhand von Zielgenen sollte der zelluläre Prozess identifiziert werden, in dem Hangover eine Funktion hat. Hierfür wurde das putative Hangover Zielgen *dunce* charakterisiert und eine Interaktion der beiden auf Verhaltensebene untersucht.

3.1. Interagiert Hangover mit Nukleinsäuren?

Die Proteinstruktur von Hangover beinhaltet 16 Zinkfingerdomänen der C₂H₂ Klasse (Scholz *et al.*, 2005). Diese Zinkfingerklasse wurde zuerst in dem Transkriptionsfaktor TFIIIA identifiziert (Picard und Wegenez, 1979) und es wurde gezeigt, dass sie sowohl DNA als auch RNA binden können (Pelham und Brown, 1980). Die in Hangover gefundenen C₂H₂ Zinkfinger motive sprechen also dafür, dass Hangover Nukleinsäuren binden kann.

3.1.1. Lokalisation von Hangover an larvalen polytären Chromosomen

Eine mögliche Protein/ DNA Interaktion kann z.B. durch Antikörperfärbungen an polytären Chromosomen untersucht werden. Ein typisches Beispiel für ein Protein das eine DNA Interaktion aufweist, ist Polycomb. Das Protein ist ein Vertreter der *polycomb* Gengruppe, deren Proteine für eine segmentspezifische Repression der homöotischen Gene während der Entwicklung verantwortlich sind. Es wurde gezeigt, dass Polycomb über seine Chromo-Domäne an Chromatin bindet und dadurch die Transkription inhibiert (Paro und Hogness, 1991; Messmer *et al.*, 1992). Eine mögliche Assoziation von Hangover mit DNA oder Chromatin soll nun ebenfalls mittels Antikörperfärbungen an polytären Chromosomen nachgewiesen werden. Dabei wird das *UAS-GFP-hangover* Konstrukt mit Hilfe der Treiberlinie *D42-GAL4* ektopisch in den Speicheldrüsen des dritten Instar-Larvenstadiums exprimiert. Als Positivkontrolle dient das *UAS-polycomb-GFP* Konstrukt, welches mit der Treiberlinie *1032.hx* (Paro *et al.*, 1999) auch ektopisch in den Speicheldrüsen exprimiert. Das Expressionsmuster von GFP-Hangover wird dabei mit dem Proteinmuster von Polycomb-GFP verglichen. In Abbildung 3.1 sind die mit Propidiumiodid gefärbten Chromosomen (a,

b), die jeweilige GFP Färbung (a', b') und die Überlagerung der jeweiligen Färbungen (a'', b'') gezeigt.

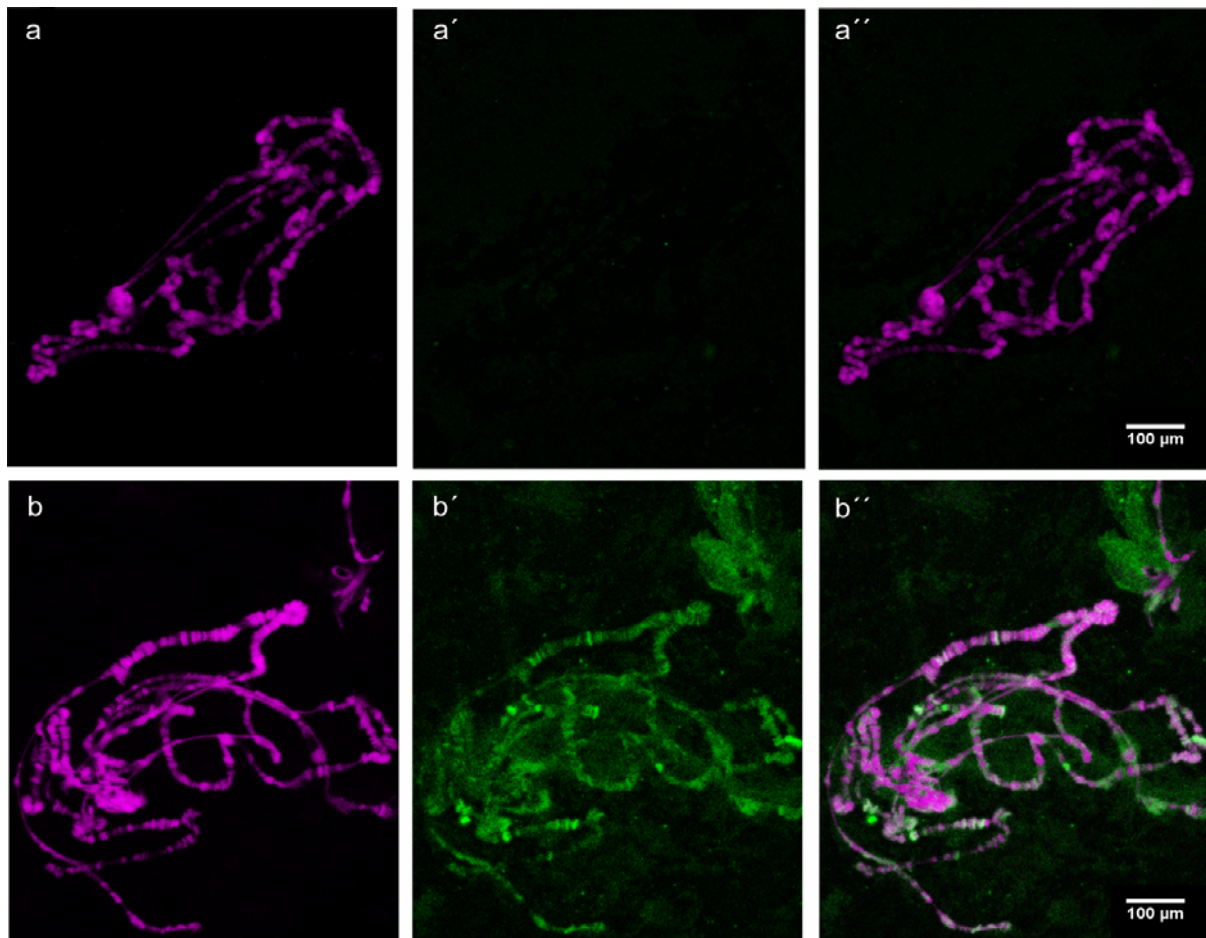


Abb. 3.1: **Hangover-GFP bindet nicht an polytäne Chromosomen**

GFP-Hangover (a, a', a'') und Polycomb-GFP (b, b', b'') exprimierende Speicheldüsen wurden gequetscht und die Chromosomen mit Propidiumiodid angefärbt. Dabei wird das typische Bandenmuster der DNA sichtbar (a, b). Hangover und Polycomb wurden mit dem anti-GFP Antikörper (Kaninchen) und dem Zweitantikörper Alexa 488 visualisiert (a', b'). Die Überlagerung der DNA-Färbung (a, b) und der jeweiligen GFP-Färbung (a', b') zeigt eine deutliche Bindung von Polycomb-GFP an die DNA (b''), wohingegen Hangover nicht auf den Chromosomen lokalisiert werden kann (a''). Die Bilder wurden mit Hilfe eines konfokalen Laserscanmikroskopes von Leica bei einer 40fachen Vergrößerung aufgenommen.

Bei der Fliegenlinie *1032.hx;+;UAS-polycomb-GFP* sieht man sowohl das typische Bandenmuster der DNA (b) als auch die Expression des *polycomb*-GFP Fusionsproteins an den Chromosomen (b'). Die Überlagerung (b'') der beiden Färbungen zeigt eine Interaktion des GFP Proteins mit der DNA. Bei dem Chromosom der Fliegenlinie *D42; UAS-GFP-hangover* lässt sich kein HANG-Fusionsprotein nachweisen (a', a''). Dies legt nahe, dass Hangover nicht direkt mit polytänen Chromosomen interagiert.

3.1.2. Die Überexpression von *hang* führt zu HANG Clustern im Zellkern

Die Speicheldrüsenzellen eignen sich auf Grund ihrer Größe, sehr gut um Zellkernkompartimente zu untersuchen. Da HANG natürlicherweise dort nicht vorkommt, wurde es über das GAL4/ UAS System „künstlich“ in diesen Zellen exprimiert. Die Überexpression von *UAS-GFP-hangover* mit der *D42-GAL4* Treiberlinie in den Speicheldrüsenzellen zeigt, dass Hangover in clusterartigen Strukturen im Nucleus vorliegt (Abb. 3.2). Die Proteincluster findet man ausschließlich in DNA freien Bereichen, wie die Überlagerung aus GFP-Färbung und Propidiumiodid gefärbter DNA zeigt (Abb. 3.2 a-a''). Viele RNA modifizierende Proteine werden in nukleären Domänen punktförmig exprimiert (Spector, 2001). Co-Lokalisationsstudien mit einigen RNA modifizierenden Markerproteinen könnten einen Hinweis auf eine mögliche Funktion des Hangover Proteins im Zellkern geben.

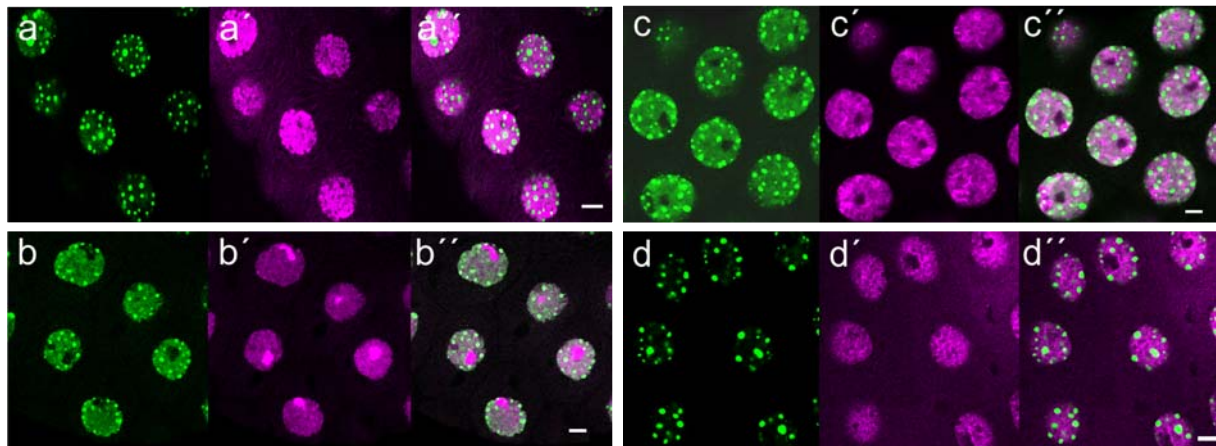


Abb. 3.2: **Hangover wird in spezifischen Domänen des Zellkerns exprimiert**

UAS-GFP-hangover wurde mit *D42-GAL4* ektopisch in den Speicheldrüsen exprimiert und mit Hilfe eines GFP-Antikörpers und dem Zweitantikörper Alexa 488 grün markiert (a', b', c', d'). Hangover wird clusterartig im Kern exprimiert, bindet dabei aber nicht an die mit Propidiumiodid (magenta) gefärbte DNA (a, a', a''). Eine Interaktion mit rRNA ist nicht zu erkennen, betrachtet man die Überlagerung (b'') aus Hangover-Färbung und den, mit dem Antikörper α -AJ6 markierten Nucleoli (b'). Auch die beiden Marker α -HrB87F und α -SC35 interagieren nicht mit Hangover (c'', d''). Der Antikörper α -HrB87F erkennt Stress-induzierte hnRNPs (c') (Haynes *et al.*, 1991) und der Antikörper α -SC35 markiert einen Faktor des Spleißosoms (d') (Fu and Maniatis, 1990). Die Bilder wurden mit einer 40fachen Vergrößerung am konfokalen Laserscanmikroskop von Leica aufgenommen.

Ein relativ großer Bereich im Zellkern wird von den Nucleoli eingenommen. In diesen Kernkörperchen werden die 28S, 18S und 5,8S ribosomalen RNAs (rRNA) für die Bildung von Ribosomen bereitgestellt (Alberts und Bray, 1989). Für die Co-Lokalisationsstudie mit Hangover-GFP werden die Nucleoli mit dem Antikörper AJ6 angefärbt. Eine Interaktion zwischen Hangover und den Nucleoli bzw. der rRNA kann jedoch nicht festgestellt werden,

wie Abbildung 3.2 b'' zeigt. Eine wichtige Aufgabe von RNA-bindenden Proteinen ist das Spleißen. *Heterogeneous nuclear ribonucleoproteins* (hnRNPs) sind nukleäre RNA bindende Proteine, die Komplexe mit Transkripten der RNA Polymerase II formen und diese dem Spleißosom präsentieren. Der Antikörper Hrb87F erkennt vier hnRNP Proteine, welche homolog zu den humanen Gruppe A und B hnRNPs sind (Haynes *et al.*, 1991). Die hnRNA Proteine sind in sog. Omega-speckles lokalisiert und können durch Stress, wie z.B. Hitze, induziert werden (Prasanth *et al.*, 2000). In Abbildung 3.2 c'' erkennt man, dass Hangover nicht mit den durch Stress induzierbaren hnRNPs co-lokalisiert. Ein weiterer wichtiger Faktor des Spleißmechanismus ist das SC35 Protein. Es gehört zu den SR (Serin/ Arginin-reichen) Proteinen, welche am alternativen Spleißen beteiligt sind (Graveley, 2000). Diese Proteine findet man in kleinen runden Kompartimenten im Zellkern, wo sie an der Interaktion zwischen U1 und U2 snRNP Proteinen und der 3' Spleißseite beteiligt sind (Fu und Maniatis, 1990; Spector *et al.*, 1991). Aber auch hier zeigt die Co-Lokalisationsstudie zwischen HANG-GFP und dem SC35 Protein keine Interaktion (Abb.: 3.2 d''). Mit keinem der hier getesteten Markerproteine konnte eine Interaktion mit HANG-GFP gezeigt werden. Es existiert jedoch noch eine Vielzahl weitere Proteine in nukleären Domänen, die an der RNA Modifikation beteiligt sind und möglicherweise mit HANG co-lokalisieren. Eine weitere Erklärung wäre, dass die ektopische Expression von HANG in den Speicheldrüsen zu einem veränderten Expressionsmuster führt. Deshalb wurde die Expression von HANG in wildtypischen Gehirnzellen untersucht.

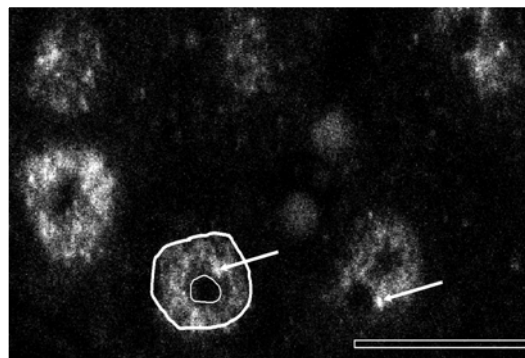


Abb. 3.3: Wildtypische Hangover Verteilung in adulten Gehirnzellen

Das adulte Gehirn einer wildtypischen Fliege wurde mit dem α -Hangover Antikörper gefärbt. Als Zweitantikörper wurde Alexa 488 verwendet. Die Pfeile markieren die punktförmige Hangover Expression in den Zellkernen. Deutlich erkennt man die nicht gefärbten Nukleoli. Die Abbildung wurde mit 63facher Vergrößerung am konfokalen Laserscanmikroskop aufgenommen.

Abbildung 3.3 zeigt die Hangover Expression in einer wildtypischen Zelle im Gehirn einer adulten Fliege. Auch hier zeigt sich die punktförmige Verteilung von HANG, dabei sind die

Nukleoli deutlich von der HANG Expression ausgespart. Das bedeutet, dass die punktförmige HANG Expression in den Speicheldrüsenzellen durchaus der wildtypischen Proteinverteilung im Zellkern entspricht. Deshalb zeigen wahrscheinlich auch die Co-Lokalisationsstudien das „normale“ Verhalten der Proteine untereinander und können als Hinweis für mögliche Interaktionen verwendet werden.

3.1.3. Hangover bindet *in vitro* an RNA

Der Versuch ektopisch exprimiertes Hangover an polytären Chromosomen zu lokalisieren, zeigt keine Interaktion von Hangover mit der DNA. Auffällig ist die punktförmige Verteilung des Proteins im Zellkern, was vermuten lässt, dass es sich um ein RNA-modifizierendes Protein handeln könnte. Außerdem findet man zwei der 16 Zinkfingerdomänen von Hangover häufig in RNA bindenden Proteinen (Scholz *et al.*, 2005). Die beiden Motive gehören der U1-Unterklasse an, die z.B. auch in dem U1-snRNP spezifischen C Protein des Spleißosoms, zu finden sind (Brown, 2005). Diese Daten legen nahe, dass HANG RNA modifiziert. Deshalb sollte *in vitro* gezeigt werden, ob HANG RNA binden kann. Dazu wurden verschiedene Hangover-Fragmente an je 6x Histidin-Reste kloniert (siehe 2.15.3). Das Fragment AK1 ist 1053 bp groß und beinhaltet die Zinkfinger-Domänen fünf bis neun, wobei es sich bei den Domänen sechs und neun um die Motive der U1-Unterklasse handelt. Fragment AK2 ist 996 bp groß und enthält die C-terminale Zinkfinger-Domäne 16. Das Fragment AK3 weist 4 Zinkfinger-Domänen (12-15) auf und hat eine Größe von 828 bp. Als Positivkontrolle wurde das vollständige *Poly A binding protein* (pAbp), mit einer Größe von 1902 bp, an 6x Histidin-Reste gekoppelt. Das *Poly A binding protein* stabilisiert mRNAs, indem es an die *Poly A* Überhänge im 3' Bereich der Transkripte bindet (Coller *et al.*, 1998). Die vier mit Histidin markierten Fragmente wurden in *E.coli* BL21 Zellen induziert und exprimiert. Abbildung 3.4 zeigt, dass alle vier Proteine induzierbar sind und in ungefähr ähnlicher Menge exprimiert werden. Anschließend wurden die Proteine mit Hilfe ihrer Histidin-Reste an Nickel-Agarose gebunden und aufgereinigt. Die isolierten Proteine wurden mit aus Fliegen isolierter Gesamt-RNA inkubiert.

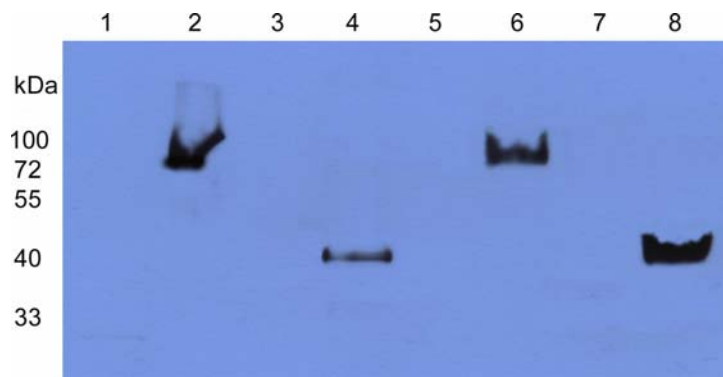


Abb. 3.4: **Induktion und Expression von Histidin Fusionsproteinen**

Der Western-Blot zeigt die Expressionsstärke von verschiedenen, mit Histidin-markierten, Proteinen vor und nach der Induktion mit IPTG in *E.coli* BL21 Zellen. Zum Nachweis der Proteine wurde ein α -Penta-His Antikörper verwendet und als Zweitantikörper ein HRP-Konjugat aus der Maus. In Spur 1 ist das *Poly A binding protein* vor der Induktion und in Spur 2 nach der Induktion aufgetragen. Spur 3 und 4 zeigen das Hangover Fragment AK1 vor und nach der Induktion, Spur 5 und 6 beinhalten AK2 vor und nach der Induktion. In Spur 7 und 8 ist Hangover AK3 vor und nach der Induktion zu sehen. Bei allen vier Proteinen ist eine deutliche Expression nach der Induktion zu erkennen.

Nach mehreren Waschschrritten wurde die RNA mithilfe des TRIZOL Reagents aus dem Protein-RNA Gemisch erneut isoliert und ein Teil auf ein Formamid-Gel aufgetragen (Abb. 3.5), der andere Teil wurde zur cDNA Synthese verwendet. In Abbildung 3.5 zeigen sich deutliche RNA Spuren in der aufgetragenen Probe des *Poly A binding proteins* (Spur 1), in der Probe des Hangover AK1 Fragmentes (Spur 2) und in der Probe von Hangover AK3 (Spur 4).

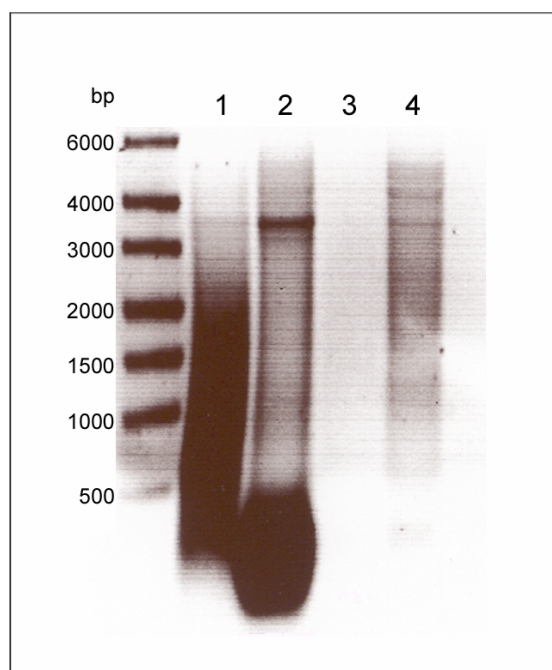


Abb. 3.5: **2%iges Formamid-Agarosegel mit isolierter RNA aus der Co-Immunopräzipitation der Histidin-markierten Proteinfragmente**

Die Spuren 1, 2 und 4 zeigen einen deutlichen RNA „Schmier“, in Spur 3 ist hingegen keine RNA zu sehen. Die RNA aus Spur 1 wurde aus der Probe des *Poly A binding proteins* isoliert. Es handelt sich dabei hauptsächlich um mRNA, die in einer Größenordnung von 0,5 kb bis 12 kb vorkommt. In Spur 2 sieht man die aufgereinigte RNA aus der AK1 Probe. Hierbei handelt es sich ebenfalls um einen mRNA-„Schmier“. Spur 3 weist keine RNA auf, das heißt, AK2 kann keine RNA binden. Die Spur 4 zeigt die isolierte mRNA aus der AK3 Proteinprobe.

In der Probe des Hangover AK2 Fragmentes (Spur 3) kann keine RNA nachgewiesen werden. Bei der isolierten RNA von AK3 und dem *Poly A binding protein* scheint es sich hauptsächlich um mRNA zu handeln, da man hier den für mRNAs typischen „Schmier“ zwischen 0,5 kb und 12 kb erkennen kann. In der Probe von AK1 befindet sich auch ein typischer mRNA „Schmier“. Die starke Färbung im niedermolekularen Bereich zeigt aber auch eine große Menge an degradierter RNA. In den Spuren 1, 2 und 4 erkennt man außerdem je eine Bande bei ungefähr 3,5 kb. Normalerweise erhält man bei der Auftrennung von Gesamt-RNA auf einem Agarosegel zwei Banden bei ca. 2 kb und 4,5 kb für die 18S und 28S RNA. Die in Abb. 3.5 erkennbaren Banden liegen in ihrer Größenordnung jedoch genau zwischen den beiden S-RNA-Klassen. In diesem Versuch wurde gezeigt, dass Hangover *in vitro* RNA binden kann. Dabei scheinen nicht nur die U1-Domänen der C₂H₂ Zinkfingerklasse die RNA Bindung zu ermöglichen, sondern auch das AK3 Fragment welches vier „normale“ C₂H₂ Zinkfinger enthält kann RNA binden, wie die Abb. 3.5 in Spur 4 zeigt. Es konnte jedoch nicht eindeutig geklärt werden, um welche Art von RNA es sich bei den gebundenen RNA-Pools der einzelnen Fusionsproteine handelt. Mithilfe von RT-PCR könnte aber z.B. mRNA nachgewiesen werden (siehe Abb. 3.9).

3.2. Mögliche Zielgene von Hangover

Die markante Proteinstruktur und das Ergebnis, dass Hangover RNA binden kann, sprechen dafür, dass Hangover eine regulatorische Funktion auf andere Transkripte ausübt. Um mögliche Zielgene von Hangover zu identifizieren wurde ein cDNA Microarray durchgeführt (Scholz, unveröffentlichte Daten). In 5 unabhängigen cDNA array Experimenten wurde gezeigt, dass *dunce* in der *hang*^{AE10} Mutante reduziert vorliegt. Das Gen *dunce* ist durch EST GH12916 auf dem Chip vertreten. Dieser EST-Klon entspricht dem *dunce*^{RL} Transkript. Das Gen *dunce* codiert für eine Phosphodiesterase, die cAMP zu AMP hydrolysiert (Davis und Kiger, 1981).

3.2.1. In *hang*^{AE10} Fliegen liegen spezifische *dunce* Transkripte reduziert vor

In Abbildung 3.6 ist die genomische Organisation von *dnc* dargestellt (modifiziert nach Qiu *et al.*, 1993 und www.flybase.bio.indiana.edu). Die 14 Transkripte erstrecken sich über 162 kb. Sie sind zu vier Gruppen zusammengefasst, ausgehend von ihrer Größe und Funktion. Das Ergebnis des cDNA Microarray Versuchs sollte mit Hilfe von semiquantitativer RT-PCR

bestätigt werden. Wenn RNA aus ganzen Fliegen isoliert wird und ein Primerpaar verwendet wird, das alle 14 Transkripte erkennt, dann ist kein Transkriptunterschied von *dnc* in *hang^{AE10}* Fliegen im Vergleich zum Wildtyp erkennbar (Franz, 2004). Zur besseren Auflösung wurden deshalb semiquantitative RT-PCRs von verschiedenen *dnc* Transkriptgruppen durchgeführt. Für jede Transkriptgruppe wurden spezifische Primer verwendet und mehrere semiquantitative RT-PCRs durchgeführt. In Abbildung 3.7 ist exemplarisch je eine PCR pro Gruppe dargestellt. Dabei wurde die Gesamt-RNA für die *hang^{AE10}* Mutante und die *PZ[+]* Kontrolle aus ca. 500 männlichen Fliegenköpfen mithilfe von TRIZOL isoliert.

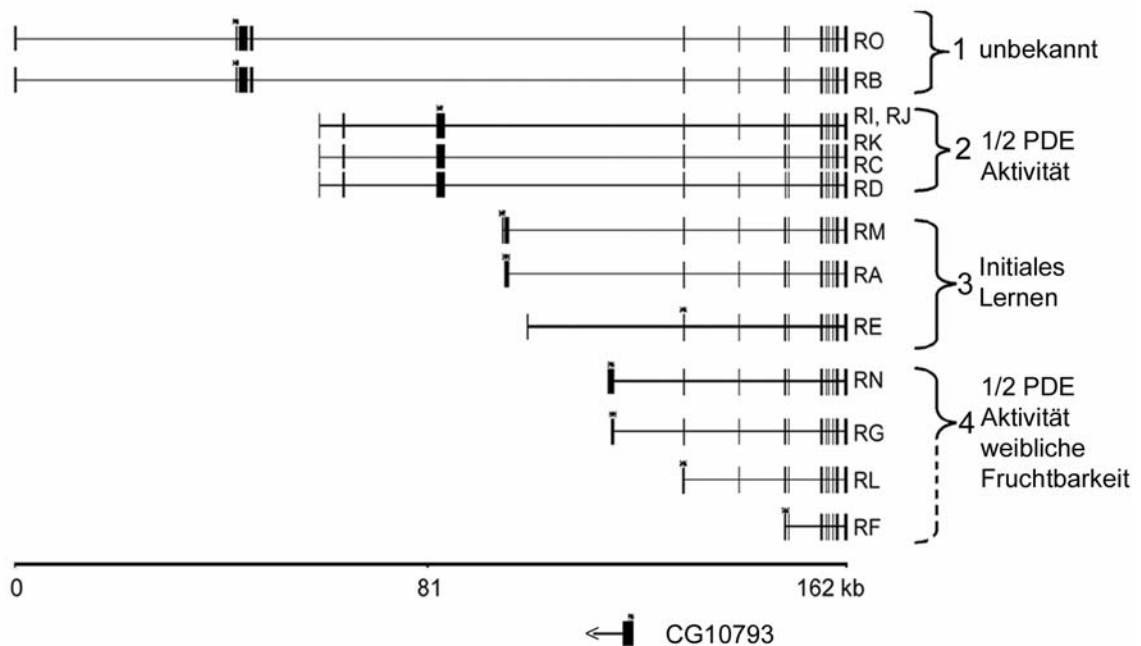


Abb. 3.6: **Genomische Organisation des *dunce* Locus**

Das Gen *dunce* besitzt 14 Allele mit unterschiedlichen Transkriptionsstartpunkten. Diese sind durch kleine Sterne über den Exons gekennzeichnet. Der gesamte *dunce* Locus umfasst 162 kb, wobei sich auch einige andere Gene in entgegengesetzter Richtung innerhalb des Locus befinden. Die verschiedenen *dunce* Transkriptgruppen können aufgrund ihrer Größe und Funktion in vier Gruppen eingeteilt werden (modifiziert nach Qiu *et al.*, 1993 und www.flybase.bio.indiana.edu). Dabei ist die Funktion für Gruppe 1 unbekannt, Gruppe 2 ist für die eine Hälfte der Phosphodiesterasefunktion zuständig, Gruppe 3 ist am initialen Lernen beteiligt und Gruppe 4 ist für die weibliche Fruchtbarkeit und die zweite Hälfte der Phosphodiesterasefunktion zuständig.

Die cDNA Synthese erfolgte mithilfe eines oligo dT-Primers, das heißt es gab keine Primerspezifische Transkriptselektion. Die verwendeten *dunce* Primer wurden so konstruiert, dass sie für die jeweilige Gruppe spezifisch sind. Als Kontrollprimer wurden Primer in zwei verschiedenen Größen für das Gen *zwischenferment* hergestellt. *zwischenferment* codiert für eine Glucose-6-Phosphat Dehydrogenase und ist ein sog. Haushaltsgen. Die Lokalisation der Primer wurde so gewählt, dass sie jeweils ein Intron einschließen, um anhand der

Produktgröße eine genomische Kontamination ausschließen zu können. In Gruppe 1, 2 und 4 ist in der *hang^{AE10}* Mutante im Vergleich zur Kontrolle keine Reduktion der *dnc* Transkripte zu erkennen. *dnc* Transkriptgruppe 3 zeigt jedoch eine deutliche Reduktion von *dnc* in *hang^{AE10}* Fliegen im Vergleich zu den Kontrollfliegen. Die RT-PCR für Transkriptgruppe 3 wurde insgesamt viermal unabhängig voneinander wiederholt. In Abbildung 3.8 ist die statistische Auswertung der vier Versuche zu sehen.

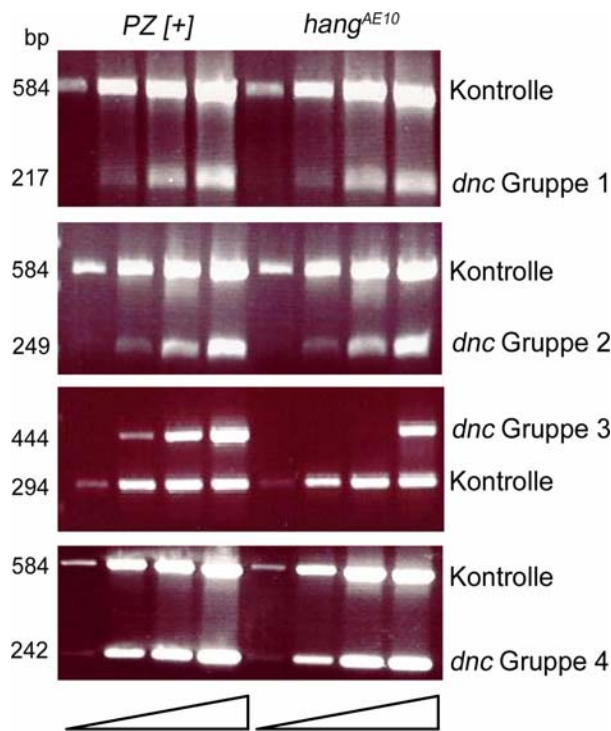


Abb. 3.7: **Semiquantitative RT-PCRs für alle vier *dnc* Transkriptgruppen**

Für jede *dnc* Transkriptgruppe ist exemplarisch eine semiquantitative RT-PCR dargestellt. Dabei wurden Primer für das Gen *zwischenferment* als Beladungskontrolle verwendet. Die *dnc* Primer sind für die jeweils zu testende Gruppe spezifisch. Sowohl für die *PZ[+]* Kontrolle als auch für die *hang^{AE10}* Fliegen wurde die Gesamt-RNA aus ca. 500 männlichen Fliegenköpfen mithilfe von TRIZOL isoliert und in cDNA mithilfe eines Oligo dT Primers umgeschrieben. Pro Genotyp wurde je eine Probe für 25 Zyklen, 28 Zyklen, 31 Zyklen und 34 Zyklen amplifiziert. Betrachtet man die Expressionsstärke von *dnc* in den vier Gruppen, so kann man in Gruppe 3 eine deutliche Reduktion der Transkriptionsstärke in *hang^{AE10}* Fliegen erkennen. Gruppe 1, 2 und 4 zeigen keine Transkriptunterschiede in den beiden Genotypen.

Dazu wurde für die jeweiligen PCR Banden die Pixelanzahl und –stärke mit ImageJ gemessen und der Quotient aus Kontrolle und *dnc* Probe gebildet. Anschließend wurde aus allen Daten des jeweiligen Genotyps der Mittelwert gebildet. Vergleicht man die Mittelwerte für *PZ[+]* und *hang^{AE10}*, erkennt man eine hoch signifikante Reduktion der *dnc* Transkriptgruppe 3 in *hang^{AE10}* Fliegen. Dieses Ergebnis wurde mit verschiedenen Methoden der RNA Isolation wiederholt. Dabei stellte sich heraus, dass ein Unterschied besteht, ob Gesamt-RNA oder mRNA verwendet wurde oder ob die RNA aus ganzen Fliegen oder Fliegenköpfen extrahiert wurde. Denn nur bei Gesamt-RNA aus Fliegenköpfen konnte eine signifikante Reduktion der *dnc* Gruppe 3 in der *hang^{AE10}* Mutante festgestellt werden (Tabelle 1, im Anhang). Dies bedeutet, dass die Regulation von *dunce* durch Hangover wahrscheinlich

hauptsächlich im Gehirn statt findet und eine Regulation im restlichen Fliegenkörper nicht nötig ist. Dabei werden anscheinend RNA-Fractionen modifiziert, die in der Gesamt-RNA zu finden sind. Es stellte sich nun die Frage, welche Art von RNA durch Hangover modifiziert wird. Dazu wurde der an die His-Fusionsproteine gebundene RNA-Pool aus Versuch 3.1.3 in cDNA umgeschrieben. War in den Fraktionen auch mRNA vorhanden, so sollten mithilfe von RT-PCR bestimmte Transkripte, wie z.B. die *dnc* Transkriptgruppe 3, nachweisbar sein.

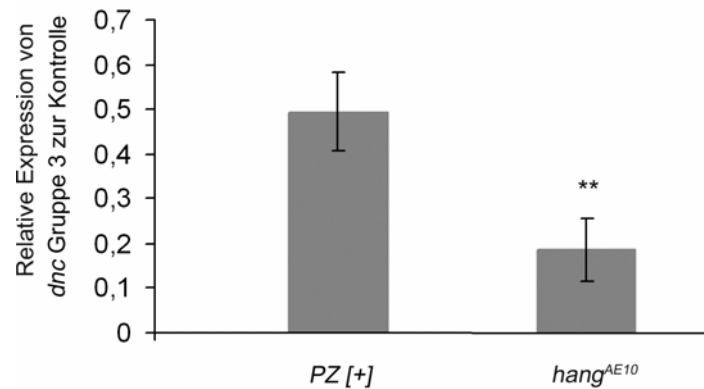


Abb. 3.8: **Die *dnc* Transkriptgruppe 3 ist in *hang*^{AE10} Fliegen signifikant weniger exprimiert als in PZ [+]**

Die Abbildung zeigt die statistische Auswertung aus mehreren semiquantitativen RT-PCRs für die *dnc* Gruppe 3. Dabei wurde mithilfe von ImageJ die Pixelanzahl und Intensität jeder Bande gemessen und der Quotient für jeden Messwert aus Kontrolle und *dnc* Transkriptgruppe 3 gebildet. Anschließend wurden die Mittelwerte für PZ[+] (0,49 ± 0,09) und *hang*^{AE10} (0,19 ± 0,07) berechnet. Im Diagramm erkennt man eine deutliche Reduktion der *dnc* Expression in *hang*^{AE10}. Die Anzahl der Versuchsdurchführungen beträgt N=4 und $p^{**} \leq 0,005$. Die Fehlerbalken repräsentieren den Standardfehler (SEM). Alle Werte sind in Tabelle 1, im Anhang, zu finden.

Abbildung 3.9 zeigt das RT-PCR Experiment mit der synthetisierten cDNA der Proben AK1, AK3 und des *Poly A binding* Protein. In allen drei Proben ist die mRNA für *zwischenferment* und für die zwei Transkripte RM und RA des Gens *dunce* zu finden. Dies ist ein zusätzlicher Hinweis, dass *dnc* Transkripte von Hangover reguliert werden können und, dass Hangover auch mRNA bindet.

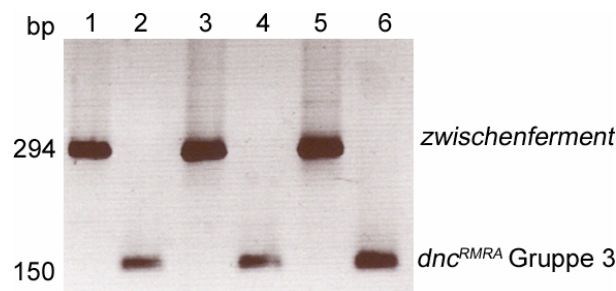


Abb. 3.9: **RT-PCR Experiment aus der an die Fusionsproteine gebundenen RNA**

Die in Versuch 3.1.3 gebundene RNA wurde zu cDNA umgeschrieben und eine RT-PCR mit Primern für das Gen *zwischenferment* und den Real RMRA sense/anti Primern, die die *dnc* Gruppe 3 erkennen, durchgeführt. Dabei konnte in allen isolierten RNA-Pools *dnc^{RMRA}* nachgewiesen werden. In Spur 1 ist das *zwischenferment* PCR-Produkt (294 bp), in Spur 2 das *dnc* Gruppe 3 PCR-Produkt (150 bp) aus der RNA des *Poly A binding* Proteins zu sehen. Spur 3 enthält das PCR-Produkt für *zwischenferment*, Spur 4 das Produkt für *dnc* Gruppe 3 jeweils aus der RNA von AK1. Spur 5 und 6 zeigt das PCR-Produkt für *zwischenferment* bzw. *dnc* Gruppe 3 aus der RNA von AK3.

3.2.2. Eine Reduktion der beiden *fasciclin II* Transkripte in adulten *hang^{AE10}* Mutanten kann nicht gezeigt werden

Fasciclin II (Fas II) ist ein Zelladhäsionsmolekül das an vielen verschiedenen zellulären Prozessen beteiligt ist. Das Protein spielt vor allem bei der Entwicklung und Stabilität von neuromuskulären Synapsen eine wichtige Rolle (Davis *et al.*, 1996). An der larvalen *neuromuscular junction* (NMJ) wurde gezeigt, dass in *hang^{AE10}* Larven Fas II in reduzierter Form vorliegt (Schwenkert *et al.*, 2008). Außerdem weisen Mutanten mit Defekten in der cAMP-Regulation eine Reduktion von *fas II* Transkripten auf (Davis *et al.*, 1996). Auch im Ethanol-induzierten Verhalten ist Fas II involviert. Die *fas II* Mutante zeigt eine erhöhte Ethanolsensitivität im Vergleich zu Kontrollfliegen (Moore *et al.*, 1998). Diese Ergebnisse sprechen für eine mögliche Interaktion zwischen Hangover und *fas II*. Deshalb sollte überprüft werden, ob *fas II* auch in adulten Tieren reduziert vorliegt. Abbildung 3.10 zeigt exemplarisch eine von drei unabhängigen semiquantitativen RT-PCRs der *fas II* Expression in *PZ [+]* Kontrollfliegen und der *hang^{AE10}* Mutante. Die RNA bzw. cDNA wurde wie unter 3.2.1 beschrieben isoliert bzw. synthetisiert und auch die PCR wurde analog durchgeführt. Für die PCR wurden *fas II* Primer benutzt, die beide *fas II* Transkripte erkennen.

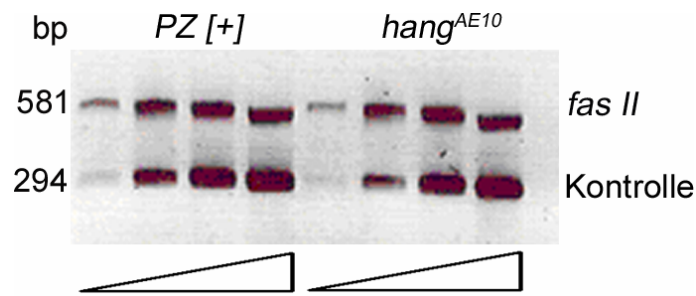


Abb. 3.10: **Semiquantitative RT-PCR für *fas II***

Die Abbildung zeigt ein analytisches Gel für die RT-PCR von *fas II* in *PZ [+]* und *hang^{AE10}* Fliegen. Für die Amplifikation von *fas II* wurden Primer verwendet, die beide *fas II* Transkripte erkennen. In beiden Genotypen findet man die gleiche Transkriptionsstärke von *fas II*. Als Kontrolle wurden Primer für das kleinere Fragment des Gens *zwischenferment* verwendet. Für die jeweils vier Proben eines Genotyps wurden 25, 30, 35 und 40 RT-PCR Zyklen verwendet.

Das Ergebnis der RT-PCR zeigt keine Veränderung der *fas II* Transkriptionsstärke in der *hang^{AE10}* Mutante im Vergleich zu den *PZ [+]* Fliegen. Das heißt, auf Transkriptebene in adulten Fliegen scheint Hangover keinen regulatorischen Einfluss auf beide *fasciclin II* Transkripte auszuüben. Als Nächstes müsste die Transkriptionsstärke der einzelnen *fas II* Transkripte in der *hang^{AE10}* Mutante untersucht werden. Denn ähnlich wie bei *dunce* könnte nur ein bestimmtes *fas II* Transkript betroffen sein.

3.3. Charakterisierung der Transkriptspezifität der *dnc^{A143}* Mutante und des *dnc^{RMRA}*-GAL4 Expressionsmusters

Verschiedene Versuche haben gezeigt, dass Hangover bestimmte *dnc* Transkripte reguliert (siehe 3.2.1). Deshalb sollte nun untersucht werden, ob *dnc* auch eine Rolle bei Ethanol-induziertem Verhalten spielt. Es existieren zwar bereits mehrere *dnc* Mutanten, diese sind jedoch molekulargenetisch nicht genau charakterisiert und es ist nicht bekannt welche Transkripte in diesen Mutanten betroffen sind. Für weitere Versuche wurde deshalb eine für die *dnc* Transkriptgruppe 3 spezifische Mutante und eine *dnc^{RMRA}* Promotor GAL4-Linie verwendet (Saratsis, 2006).

3.3.1. Die *dnc^{A143}* Mutation ist spezifisch für die *dnc^{RMRA}* Transkripte

Die *dnc^{A143}* Mutante wurde durch eine P-Element Mutagenese erzeugt. Dabei wurde eine Deletion von 2,2 kb eingeführt, die Teile des Introns vor dem ersten Exon von Transkript RA und das erste Exon von Transkript RM betreffen (Saratsis, 2006). Da sich stromaufwärts vor

dem ersten Exon eines Transkriptes normalerweise viele regulatorische Elemente befinden, wurde nun analysiert, ob auch andere *dnc* Transkripte, außer RM, von der Deletion betroffen sind. Dazu wurden für alle *dnc* Transkriptgruppen semiquantitative RT-PCRs durchgeführt. Abbildung 3.11 zeigt exemplarisch je eine PCR pro Transkriptgruppe. Die Ergebnisse zeigen, dass keine der anderen Transkriptgruppen betroffen ist, da keine Expressionsunterschiede von *dnc* in Mutante und Wildtyp zu finden sind. Die *dnc^{RMRA}* Gruppe 3 umfasst zwei Transkripte. Mithilfe von semiquantitativer RT-PCR konnte gezeigt werden, dass die Transkriptionsrate in dieser Gruppe reduziert ist. Für das Experiment wurden Primer verwendet, die beide Transkripte erkennen. Mithilfe dieser Primer kann jedoch nicht festgestellt werden, ob *dnc^{RA}* reduziert oder in normaler Menge vorliegt. Außerdem wurde getestet, ob die Deletion das Gen CG10793 betrifft, das sich in entgegengesetzter Richtung im ersten Intron der *dnc* Gruppe 3 befindet (siehe Abb. 3.6). Aber auch die Expression dieses Gen ist nicht beeinträchtigt, wie die semiquantitative RT-PCR in Abbildung 3.12 zeigt.

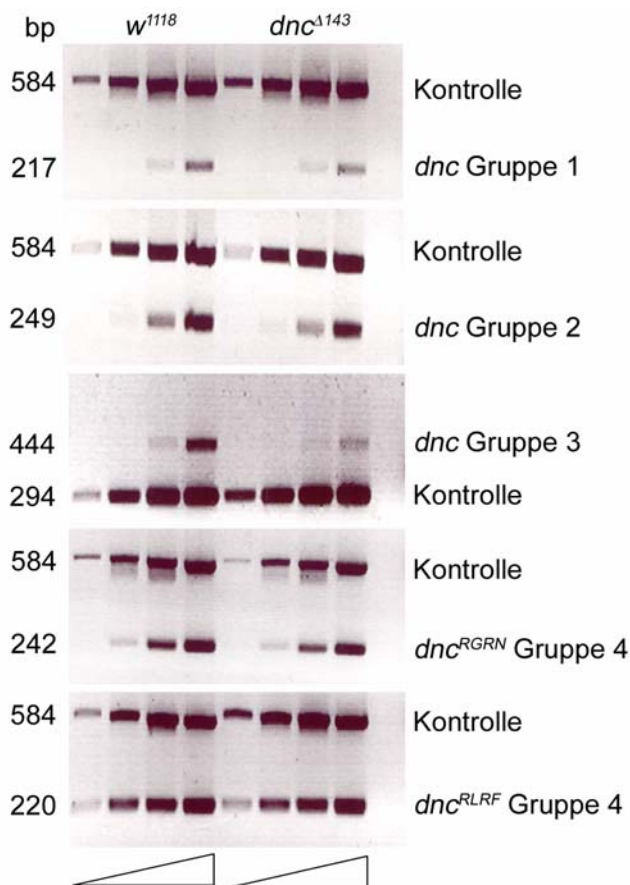


Abb. 3.11: Semiquantitative RT-PCRs zeigen keinen Effekt der *dnc^{A143}* Mutation auf andere *dnc* Transkriptgruppen, außer auf Gruppe 3

Für jede *dnc* Transkriptgruppe wurden mehrere semiquantitative RT-PCRs durchgeführt. Als Beladungskontrolle wurden die Primer für das Gen *zwischenferment* verwendet. Die *dnc* Primer sind für die jeweiligen Gruppen spezifisch. Die RNA wurde aus ganzen Fliegen isoliert und über PolyA Selektion in cDNA umgeschrieben. Außer in *dnc* Gruppe 3 kann man bei keiner der getesteten Gruppen eine Reduktion der *dnc* Expression in der *dnc^{A143}* Mutante erkennen. In Gruppe 3 ist das Transkriptlevel um ca. 50% reduziert. Dies spricht dafür, dass *dnc^{RA}* wildtypisch exprimiert wird und nur *dnc^{RM}* von der Deletion betroffen ist.

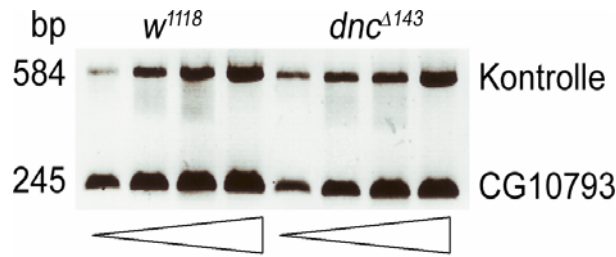


Abb. 3.12: **Semiquantitative RT-PCR für das Gen CG10793**

Als Beladungskontrolle wurden die Primer für das Gen *zwischenferment* benutzt. Die RNA bzw. cDNA wurde wie unter Abb. 3.11 beschrieben hergestellt. Betrachtet man die Transkriptionsstärke des Gens CG10793 in Wildtyp und Mutante, so kann man keinen Unterschied erkennen. Das bedeutet, die *dnc^{A143}* Mutante beeinflusst nicht die Transkription dieses Gens.

Dies zeigt, dass die *dnc^{A143}* Mutation tatsächlich nur zur Reduktion der *dnc^{RMRA}* Transkriptgruppe führt und demnach für diese Gruppe spezifisch ist.

3.3.2. Analyse des *dnc^{RMRA}*-GAL4 Expressionsmusters

Die *dnc^{RMRA}*-GAL4 Linie beinhaltet den Promotorbereich der *dnc* Transkripte *RM* und *RA* (Saratsis, 2006). Das heißt, die von der GAL4 Linie getriebenen Zellen sollten das Expressionsmuster dieser Transkripte wiedergeben. Dazu wurden die *dnc^{RMRA}*-GAL4 Expressionsdomänen mithilfe verschiedener Transgene in adulten Gehirnen sichtbar gemacht. Abbildung 3.13 a zeigt die GFP Expression des *UAS-CD8-GFP* Reporter Transgens von anterior (a) nach posterior (a'). In der Abb. 3.13 b wurde *UAS-tau-GFP* als Reporter gen benutzt und in Abb. 3.13 c *UAS-nls-LacZ*. Die GFP Expression findet man in den Pilzkörpern, den Antennalloben, in Teilen des Zentralkomplexes, in subösophagealen Zellen und in Gruppen von lateralen Neuronen. Dabei werden durch *UAS-tau-GFP* eher feinere Strukturen, wie Fasern, Axone oder Boutons angefärbt (Ho *et al.*, 1997b). Im Gegensatz dazu markiert die Färbung mit dem Reporter gen *UAS-CD8-GFP* auch größere Strukturen. Mithilfe von *UAS-nls-LacZ* werden nur die Zellkerne dargestellt. Im anterioren Teil des Gehirns (c) findet man die Zellkerne rund um das subösophageale Ganglion (SOG), lateral der Antennalloben (AL) und lateral des Protocerebrum (PR). Außerdem sieht man zwei paarige Zellen lateral zu den α -Loben des Pilzkörpers (MB). Im posterioren Teil des Gehirns (c') fallen vor allem die gefärbten Zellen im Pilzkörpercalyx (MB-c) und die ventralen unpaarigen Zellen des subösophagealen Ganglions auf.

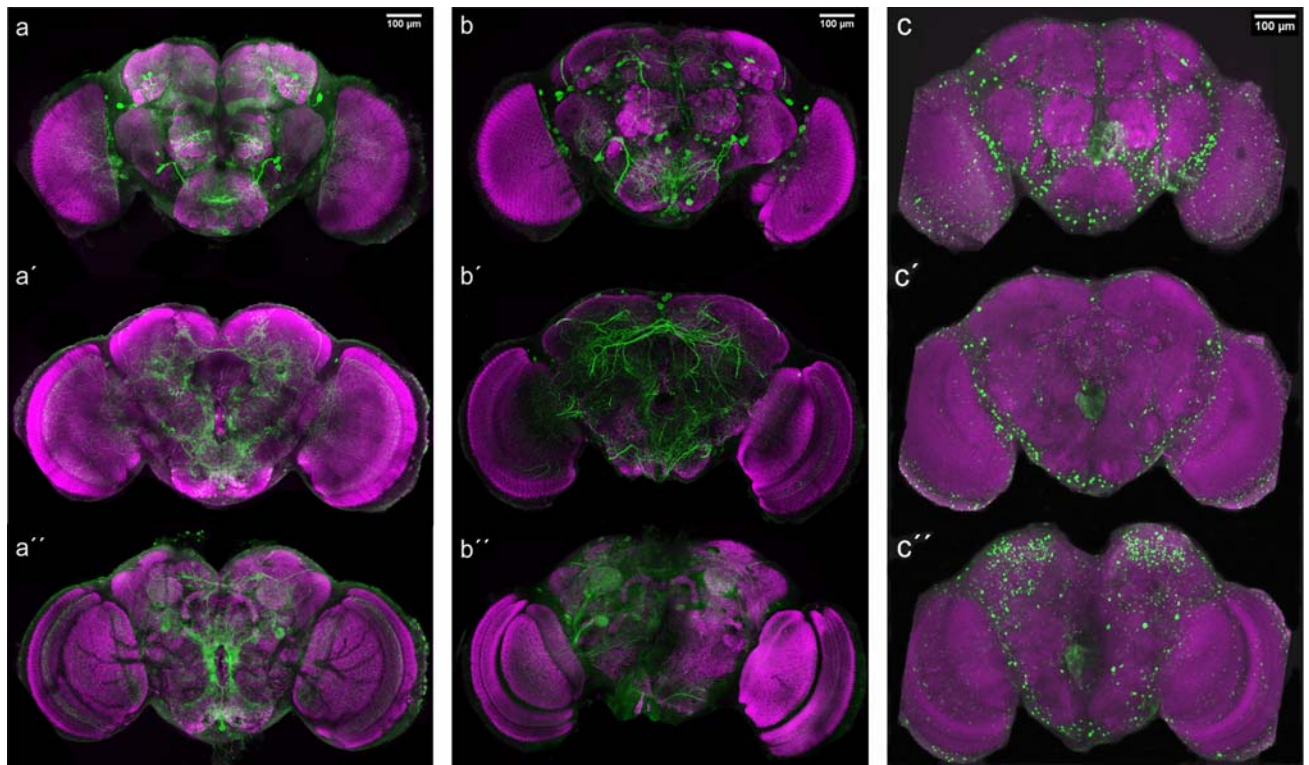


Abb. 3.13: Die dnc^{RMRA} -GAL4-Linie exprimiert Transgene in spezifischen Gehirnregionen

Das Expressionsmuster der dnc^{RMRA} -GAL4 Linie wurde mithilfe der Transgene *UAS-CD8-GFP* (a, a', a''), *UAS-tau-GFP* (b, b', b'') und *UAS-nls-LacZ* (c, c', c'') sichtbar gemacht. Für eine bessere Orientierung wurden die Gehirne mit dem Neuropilmarker nc82 gegen gefärbt (magenta). Die konfokalen Bilderstapel sind jeweils in drei Gruppen zusammengefasst, ausgehend vom anterioren Teil des Gehirns (a, b, c) bis zum posterioren Part des Gehirns (a'', b'', c''). Die GFP Expression (grün) zeigt Färbungen in den Pilzkörperloben, den Antennalloben, in Teilen des Zentralkomplexes, in subösophagealen Zellen und in bestimmten lateralen Neuronen. Die LacZ Färbung visualisiert dabei nur die durch die GAL4-Linie exprimierten Zellkerne. Die Bilder wurden mit einem konfokalen Laserscannmikroskop in 20-facher Vergrößerung aufgenommen.

Abbildung 3.14 a zeigt das Resultat einer *in-situ* Hybridisierung mit einer spezifischen Sonde für die *dnc* Transkripte *RM* und *RA* in einem adulten Wildtypgehirn. In 3.14 b ist das Ergebnis der sense-Probe dargestellt, welche als Negativkontrolle diente. Vergleicht man die LacZ Expression von Abbildung 3.13 c mit der Färbung in Abbildung 3.14 a, so zeigt sich ein annähernd ähnliches Expressionsmuster. Auch in Abbildung 3.14 a sind Zellen dorsal des SOG, dorso-lateral zu den Antennalloben und lateral zum Protocerebrum gefärbt. Dies legt nahe, dass die dnc^{RMRA} -GAL4 Linie die endogene Expression der beiden *dnc* Transkripte *RM* und *RA* widerspiegelt. Ein richtiger Beweis dafür wäre eine Co-Lokalisation aus dnc^{RMRA} *in-situ* Sonde und der Expression der dnc^{RMRA} -GAL4 Linie in einem Gehirn.

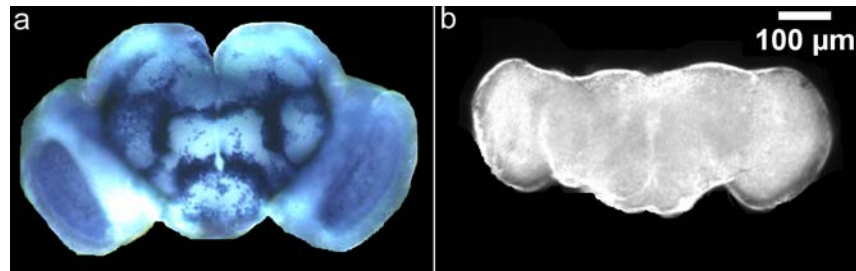


Abb. 3.14: **Endogene Expression der dnc^{RMRA} Transkripte**

In Teil (a) ist die endogene Expression der dnc^{RMRA} Transkripte mithilfe von *in-situ* Hybridisierung dargestellt. Dazu wurde eine spezifische Sonde für diese beiden Transkripte verwendet. Eine starke Expression der beiden Transkripte findet man dorso-lateral zu den Antennalloben, dorsal zum subösophagealen Ganglion und lateral zum Protocerebrum. Als Negativkontrolle wurde die sense-Probe verwendet, die wie erwartet keine Färbung zeigt (b). Die Gehirne wurden für eine bessere Visualisierung des Signals mit Depex behandelt und anschließend mit einem Durchlichtmikroskop bei 20-facher Vergrößerung aufgenommen.

Ein wichtiges Maß für die Expressionsbreite einer GAL4-Linie ist ihre Anzahl an innervierten Zellen. Dazu wurde von jeweils fünf adulten Gehirnen das dnc^{RMRA} -GAL4 Expressionsmuster, dargestellt durch die Transgene *UAS-CD8-GFP*, *UAS-tau-GFP* und *UAS-nls-LacZ*, untersucht. Die Anzahl der Zellen wurde dabei über die Pixelintensität in einem konfokalen Bilderstapel mithilfe von ImageJ ermittelt. In Abbildung 3.15 ist für jedes der drei verwendeten Transgene ein Gehirn als Beispiel dargestellt. Zunächst wurden die einzelnen konfokalen Bilder zu einer Z-Projektion zusammengefasst (a, b, c) und dann über die Pixelintensität die Zellen gezählt (a', b', c'). In der Überlagerung (a'', b'', c'') kann überprüft werden wie gut die gemessenen Pixel mit den Zellen im Originalbild übereinstimmen. Betrachtet man die durch ImageJ dargestellte Verteilung der Zellen im Gehirn, so fällt hier schon auf, dass die Transgene eine unterschiedliche Anzahl an Zellen darstellen. Pro Genotyp wurden jeweils fünf Gehirne untersucht und statistisch ausgewertet. Mithilfe des *UAS-nls-LacZ* bzw. *UAS-tau-GFP* Transgens lassen sich jeweils ungefähr 400 bis 500 Zellen pro Gehirn markieren. Das *UAS-CD8-GFP* Transgen markiert ungefähr 150 Zellen pro Gehirn (Abb. 3.16). Dies bedeutet, dass mit dem *UAS-CD8-GFP* Transgen pro Gehirn ca. 300 Zellen weniger gezählt wurden im Vergleich zu den beiden anderen Transgenen. Das ist wahrscheinlich auf die Strukturen zurückzuführen, welche durch die einzelnen Transgene angefärbt werden. So ist das *UAS-nls-LacZ* Transgen am besten dazu geeignet die exprimierte Zellenanzahl einer GAL4-Linie zu untersuchen, da nur die Zellkerne exprimiert werden. *UAS-tau-GFP* hingegen stellt vor allem Axone und Boutons dar. Allerdings wurde in einigen Studien gezeigt, dass *UAS-tau-GFP* zu axonaler Degradation führt (Williams *et al.*, 2000).

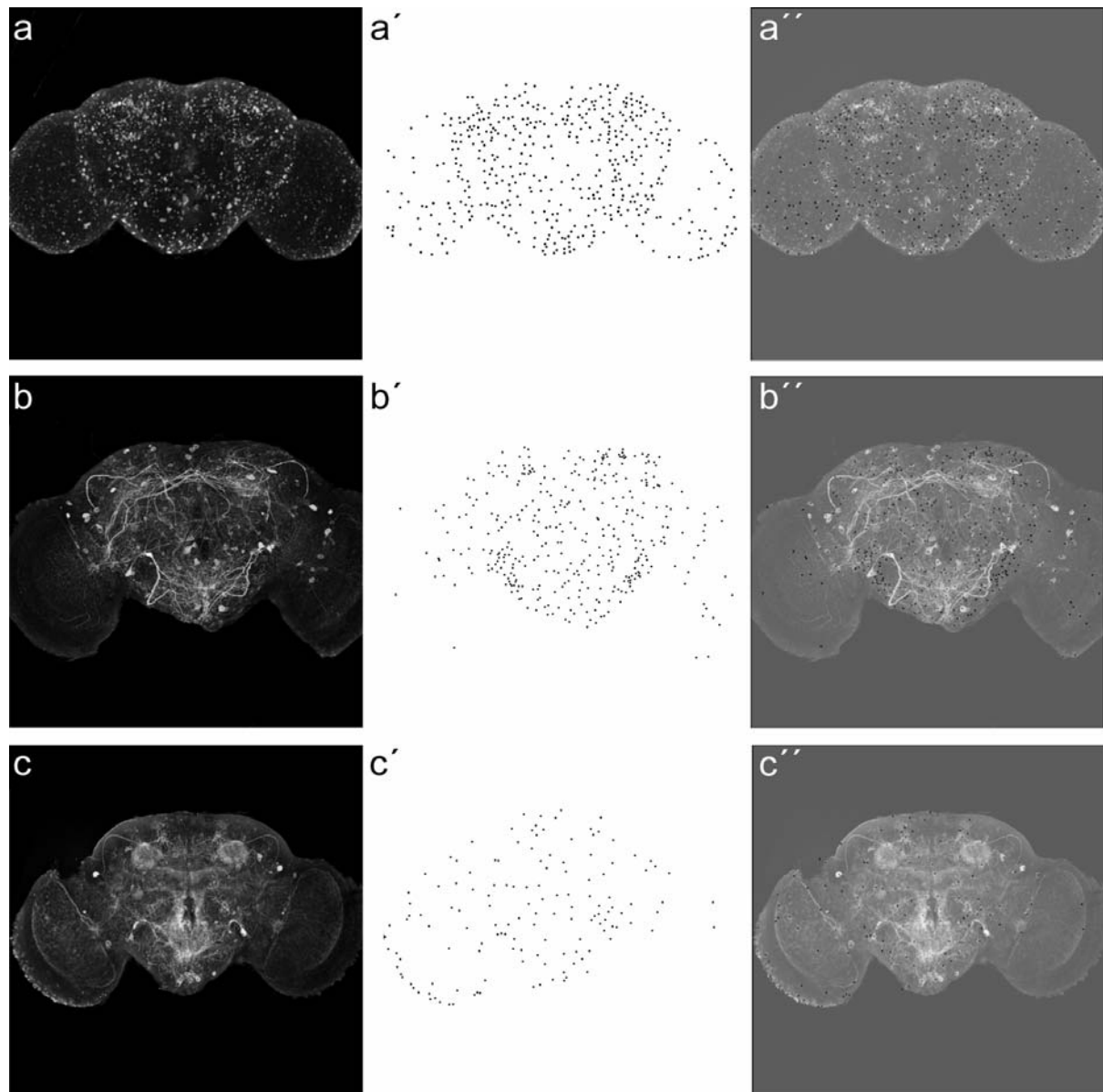


Abb. 3.15: **Schematische Darstellung der durch die dnc^{RMRA} -GAL4 Linie exprimierten Zellen mithilfe verschiedener Transgene**

Für die schematische Darstellung der Zellen in den einzelnen Fliegenlinien wurde zunächst der konfokale Bilderstapel eines gescannten Gehirns in eine Z-Projektion umgewandelt. Anschließend wurde über die Pixelintensität die schematische Zeichnung der Zellverteilung in dem jeweiligen Gehirn erstellt. Die Überlagerung aus Schemazeichnung und Originalbild dient dabei der Kontrolle, dass es sich bei den gemessenen Pixeln tatsächlich um gefärbte Zellen handelt. Für jedes Transgen ist eine schematische Darstellung von einem Beispielgehirn dargestellt. In a ist das Expressionsmuster von $w^{1118};UAS-nls-LacZ;dnc^{RMRA}$ -GAL4, in b von $w^{1118};UAS-tau-GFP;dnc^{RMRA}$ -GAL4 und in c von $UAS-CD8-GFP; dnc^{RMRA}$ -GAL4 zusehen. Betrachtet man die jeweiligen Schemazeichnungen fällt auf, dass je nach verwendetem Transgen eine unterschiedliche Zellzahl erkannt wird. Die Bilder wurden mit einem konfokalen Laserscannmikroskop mit 20-facher Vergrößerung aufgenommen. Die schematischen Darstellungen der Zellen wurden mit ImageJ erstellt.

Mit dem *UAS-CD8-GFP* Transgen lässt sich am besten die Innervierung bestimmter Gehirnregionen untersuchen. Größere Gehirnstrukturen, wie z.B. der Pilzkörper oder der fächerförmige Körper überlagern dabei vermutlich einige gefärbte Zellkerne, die deshalb bei der Kalkulation der Zellanzahl nicht erfasst werden und es kommt zu der oben beschriebenen Diskrepanz.

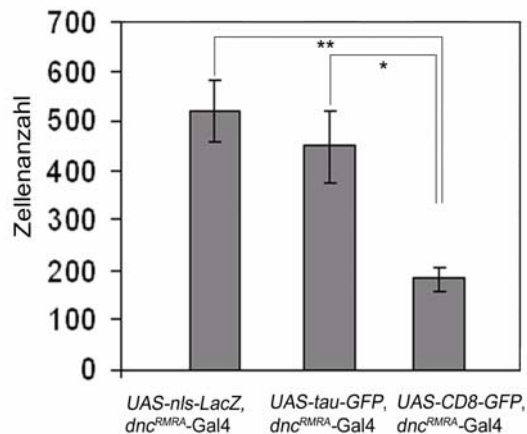


Abb. 3.16: **Verschiedene Transgene visualisieren eine unterschiedliche Anzahl an GAL4-positiven Zellen**

Wie in Abb.3.15 beschrieben, wurde für alle drei verwendeten Transgene die Zellanzahl in fünf verschiedenen Gehirnen gezählt. Dabei werden in der Linie $w^{1118}; UAS-nls-LacZ; dnc^{RMRA}-GAL4$ und $w^{1118}; UAS-tau-GFP; dnc^{RMRA}-GAL4$ ungefähr die selbe Anzahl an Zellen gefärbt. In der Linie $UAS-CD8-GFP; dnc^{RMRA}-GAL4$ werden jedoch signifikant weniger Zellen gezählt ($w^{1118}; UAS-nls-LacZ; dnc^{RMRA}-GAL4$: $521 \pm 63,48$; $w^{1118}; UAS-tau-GFP; dnc^{RMRA}-GAL4$: $447,8 \pm 70,90$; $UAS-CD8-GFP; dnc^{RMRA}-GAL4$: $182 \pm 26,04$). Die Fehlerbalken repräsentieren Standardfehler (SEM) und $p^* \leq 0,0166$ und $p^{**} \leq 0,0033$ (Bonferroni Korrektur =3).

Für eine genauere Analyse der Expressionsdomänen der Linie $UAS-CD8-GFP; dnc^{RMRA}-GAL4$ wurden zusätzlich Gefrierschnitte von adulten männlichen Gehirnen angefertigt. Dabei wurde zur besseren Orientierung das Neuropil mithilfe des Antikörpers nc82 sichtbar gemacht. Die GFP-Expression reflektiert die GAL4 Expression. In Abbildung 3.17 a und a' sieht man, dass die Antennalloben durch lateral gelegene Zellcluster über Interneurone (IN) innerviert werden. Im Ellipsoidkörper findet man keine GFP Expression (b, b'), dafür sind die posterior gelegenen Noduli (N) stark innerviert (c, c'). Eine starke GFP Färbung ist in den Pilzkörpern zu sehen. Hier werden vor allem Teile der γ - und β -Loben (d, d'), die α -Loben und der Sporn (e, e') innerviert. Dabei fällt auf, dass die GFP positiven Neurone α - und β -Loben scheinbar umschließen. Außerdem wird die GFP Expression im Fächerförmigen Körper (FB) (g, g'), in der protocerebralen Brücke (PCB) (h, h') und dem Pilzkörpercalyx (MB-c) (i, i') gefunden.

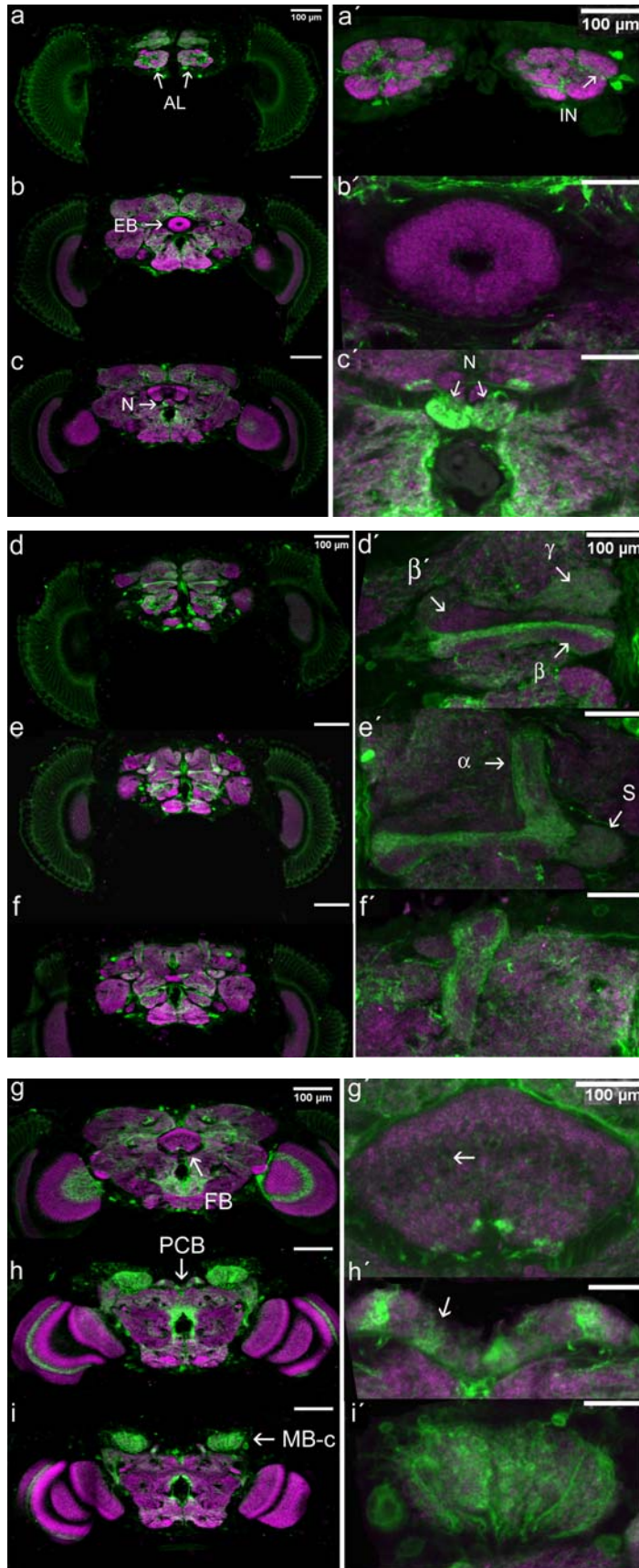


Abb. 3.17: Die *dnc^{RMRA}*-GAL4 Linie exprimiert *UAS-CD8-GFP* in bestimmten Gehirnregionen

Das GAL4 Expressionsmuster der *dnc^{RMRA}*-GAL4 Linie wird mithilfe von *UAS-CD8-GFP* in Gefrierschnitten von adulten Gehirnen dargestellt. Für eine bessere Orientierung wurden die Schnitte mit dem Neuropilmarker *nc82* (magenta) gefärbt. Die linke Spalte zeigt jeweils den vollständigen Gehirnschnitt, die rechte Spalte stellt einen bestimmten Ausschnitt des Schnittes vergrößert dar. Die GFP Expression findet man in Interneuronen (IN) welche die Antennalloben (AL) innervieren (a'), in den posterior gelegenen Noduli (N) (c') und in den Loben des Pilzkörpers (d, d', e, e', f, f'). Die GFP positiven Kenyon Zellen (i, i') innervieren die β -, γ - (d, d') und α -Loben (e, e', f, f'). Außerdem ist auch der Sporn (S) des γ -Lobus gefärbt. Im mittleren Bereich des fächerförmigen Körpers (FB) sind tangentielle Neurone zu erkennen (g, g'). Außerdem findet man in bestimmten Bereichen der protocerebralen Brücke (PCB) GFP Expression (h, h'). Die Bilder sind mit einem konfokalen Laserscanmikroskop mit 20-facher und 40-facher Vergrößerung aufgenommen worden.

Der fächerförmige Körper ist mit tangentialen Neuronen durchzogen (3.17 g'weißer Pfeil), die hauptsächlich im mittleren Teil des FB zu finden sind. Die protocerebrale Brücke wird in mehreren Bereichen innerviert (h' weißer Pfeil). Diese sind jedoch in ganzen Gehirnen in dieser Form nicht zu identifizieren (Abb. 3.13). Da nur eine Schnittserie untersucht wurde, müsste zur unabhängigen Bestätigung dieser Ergebnisse weitere Schnittserien untersucht werden. In den Pilzkörperkalyces findet man eine große Anzahl an gefärbten Kenyon Zellen (f, f'), die der Lage nach die α -, β - und γ -Loben des Pilzkörpers (d-f) innervieren.

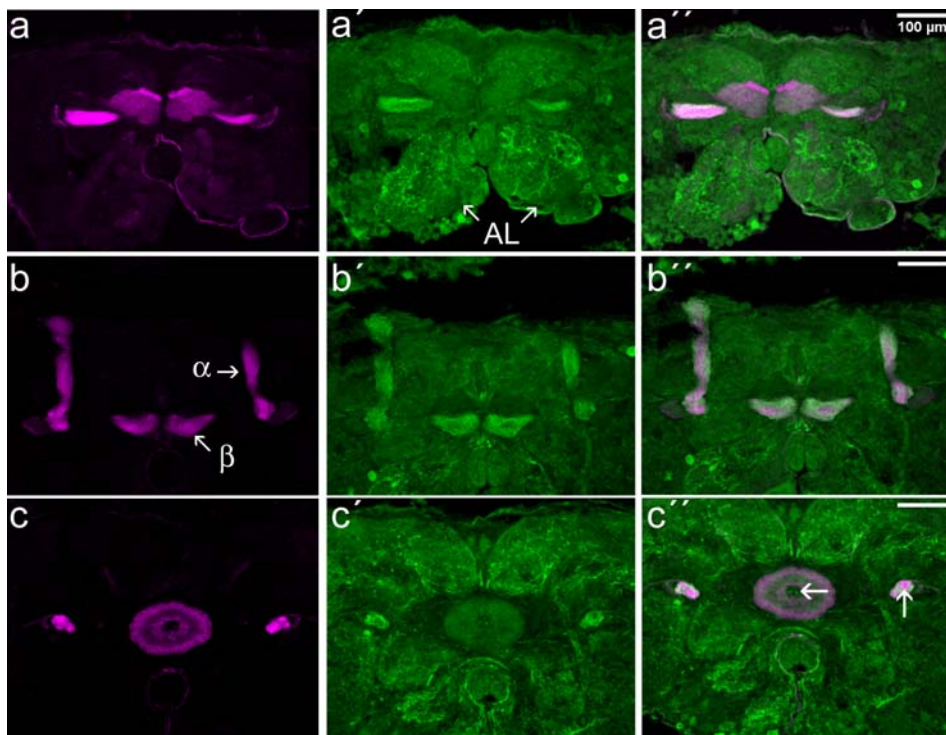


Abb. 3.18: Co-Lokalisation der *dnc^{RMRA}*-GAL4 Expression mit Fasciclin II

Die Abbildung zeigt Gefrierschnitte eines adulten Gehirns der Linie *UAS-CD8-GFP, dnc^{RMRA}-GAL4*. Dabei ist die GFP Expression in grün dargestellt und die Fas II Färbung in magenta, die Überlagerung der beiden Färbungen ist in a'', b'' und c'' zu sehen. GFP positive Bereiche findet man im dorsalen Bereich der β -Loben (a'', b'') und in Teilen der α -Loben (b''). Außerdem ist der innere Ring des Ellipsoidkörpers mit GFP gefärbt und co-lokalisiert nicht mit Fas II (c''). Der Pedunkel enthält sowohl Bereiche die nur GFP positiv sind, sowie Teile die nur FAS II gefärbt sind, als auch überlappende Gebiete (c''). Die Bilder wurden mit einem konfokalen Laserscannmikroskop in 40-facher Vergrößerung aufgenommen.

Für eine genauere Untersuchung der Pilzkörperloben wurde Fasciclin II (Fas II) als Marker für die α -, β - und γ -Loben eingesetzt. Fas II ist stark in den α - und β -Loben exprimiert, aber nur schwach im γ -Lobus (Crittenden *et al.*, 2007). In Abb. 3.18 a, b sieht man deutlich, dass die GAL4-Linie die α - und β -Loben innerviert. Auch hier hat es den Anschein, dass die GFP positiven Neurone die Loben umschließen. Die Co-Lokalisation mit Fas II und der GAL4

Expression in Abbildung 3.18 c, c', c'' zeigt, dass es im inneren Ellipsoidkörper eine leichte GFP-Färbung gibt, die in Abbildung 3.17 b, b' nicht zu sehen ist. Außerdem sind nur bestimmte Bereiche der Pedunkel GFP positiv (weißer Pfeil). Zusammenfassend kann gesagt werden, dass die *dnc^{RMRA}*-GAL4-Linie eine sehr weitreichende GAL4 Expressionsdomäne aufweist. Die Gesamtzahl aller Neurone beträgt ca. 100.000 (Rajashekhar und Singh, 1994), das heißt die GAL4-Linie exprimiert GFP ungefähr in jeder zweihundertsten Zelle. Das Expressionsmuster erstreckt sich über Bereiche der Antennalloben, des Pilzkörpers und mehrere Teile des Zentralkomplexes. Wenn man das Muster der *dnc^{RMRA}* spezifischen *in-situs* (Abb. 3.14) mit der durch die *dnc^{RMRA}*-GAL4-Linie exprimierten Region (Abb. 3.13 c) in adulten Gehirnen vergleicht, so erkennt man im Bereich der Zellkerne eine gewisse Übereinstimmung der Färbung. Dies könnte darauf hin deuten, dass das GAL4 Expressionsmuster ungefähr die endogene Expression der *dnc^{RMRA}* Transkripte wiedergibt. Für einen genauen Vergleich müssten allerdings Co-Lokalisationsstudien mit *dnc^{RMRA}* spezifischen *in-situs* und der *dnc^{RMRA}*-GAL4 getriebenen GFP Expression durchgeführt werden. Eine weitere Möglichkeit wäre die Co-Lokalisation zwischen dem GAL4 Muster und einer *dnc^{RMRA}* spezifischen Antikörperfärbung. Wobei der Antikörper erst noch hergestellt werden müsste.

3.4. Einfluss von *dunce* auf Ethanol-induziertes Verhalten

Es ist bekannt, dass Zellen bei Kontakt mit Ethanol ihre cAMP Konzentration verändern (Diamond und Gordon, 1997; Nestler und Aghajanian, 1997) und dass cAMP Signalwege in Alkohol-abhängigen Verhaltensweisen involviert sind (Asher *et al.*, 2002; Moore *et al.*, 1998). Der Abbau von cAMP in *Drosophila* wird unter anderem über die Phosphodiesterase (PDE) *Dunce* gesteuert. Im folgenden Abschnitt wird die Rolle von *dunce* im Ethanol-induzierten Verhalten näher untersucht. Dafür wird die Entwicklung von Ethanoltoleranz und Hitze-Ethanol-Crosstoleranz von den Mutanten *dnc¹* und *dnc^{A143}* untersucht. Die gesamten Werte der Verhaltensversuche sind in den jeweiligen Tabellen im Anhang zu finden. Bei den gezeigten Fehlerbalken handelt es sich um den Standardfehler (SEM).

3.4.1. *dnc¹* und *dnc^{A143}* Mutanten entwickeln reduzierte Ethanoltoleranz

Die *dnc* Transkriptgruppe 3 wird von Hangover reguliert. Da die Deletion der *dnc^{A143}* Mutanten zu einer Reduzierung der *dnc* Transkriptgruppe 3 führt, sollte diese Mutante denselben Phänotyp wie *hang^{AE10}* Mutanten aufweisen. Die *hang^{AE10}* Mutante entwickelt

reduzierte Ethanoltoleranz (Scholz *et al.*, 2005). Deshalb wurde die *dnc^{A143}* Mutante auf ihre Fähigkeit hin, Ethanoltoleranz zu entwickeln, untersucht. In Abbildung 3.19 A sind die MET1 und MET2 von den *dnc¹*, *dnc^{A143}* Mutanten und den jeweiligen Kontrollen zu sehen. Die MET1 für alle vier Genotypen ist nicht signifikant unterschiedlich zueinander, das heißt alle haben die gleiche Ethanol dosis erhalten. Die MET2 für *dnc¹* und *Canton S* ist signifikant unterschiedlich zueinander, jedoch nicht die für *w¹¹¹⁸* und *dnc^{A143}*. In Abbildung 3.19 B ist die Toleranzentwicklung für alle vier Genotypen gezeigt. Sowohl *dnc¹*, als auch *dnc^{A143}* Fliegen entwickeln signifikant weniger Toleranz im Vergleich zu ihren Kontrollen. Das legt nahe, dass die von den Mutationen betroffenen *dnc* Transkripte wichtig für die Entwicklung von Ethanoltoleranz sind.

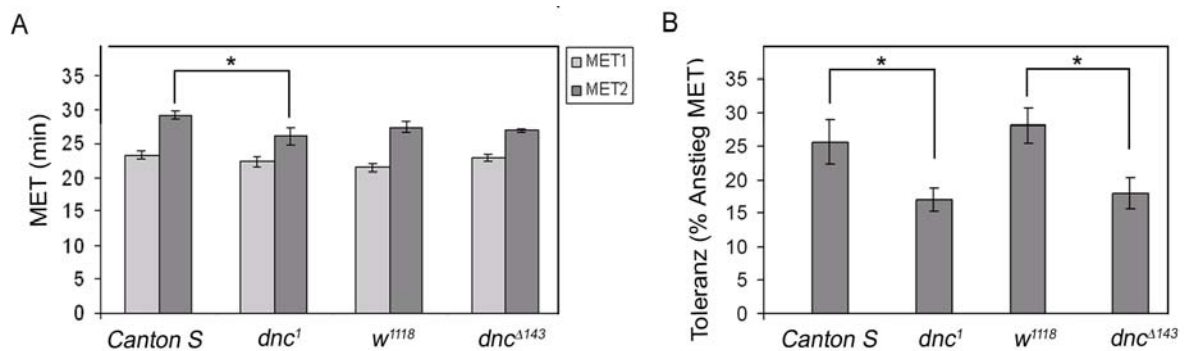


Abb. 3.19: Die *dnc¹* und *dnc^{A143}* Mutanten entwickeln normale Ethanol sensitivität, aber reduzierte Ethanol toleranz im Vergleich zu den Kontrollen.

A) Die Werte für die MET1 (hellgrau) von *dnc¹* und *dnc^{A143}* sind nicht signifikant unterschiedlich zu ihren Kontrollen *Canton S* und *w¹¹¹⁸* (*Canton S*: 23,3 ± 0,7 min; *dnc¹*: 22,3 ± 0,8 min; *w¹¹¹⁸*: 21,5 ± 0,7; *dnc^{A143}*: 23,0 ± 0,6 min). Die MET2 Werte (dunkelgrau) unterscheiden sich zwischen *dnc¹* und *Canton S*, aber nicht zwischen *w¹¹¹⁸* und *dnc^{A143}* (*Canton S*: 29,1 ± 0,6 min; *dnc¹*: 26,2 ± 1,3 min; *w¹¹¹⁸*: 27,4 ± 0,7 min; *dnc^{A143}*: 27,0 ± 0,3 min). **B)** Sowohl *dnc¹* als auch *dnc^{A143}* entwickeln signifikant weniger Ethanol toleranz im Vergleich zu *Canton S* bzw. *w¹¹¹⁸* Fliegen (*Canton S*: 25,7 ± 3,3 min; *dnc¹*: 17,0 ± 1,8 min; *w¹¹¹⁸*: 28,1 ± 2,7 min; *dnc^{A143}*: 17,9 ± 2,4 min). Die Anzahl der Versuche beträgt für *Canton S* und *dnc¹* n=8 und für *w¹¹¹⁸* und *dnc^{A143}* N=7 und $p^* \leq 0,05$. Die Fehlerbalken repräsentieren den Standardfehler (SEM). Die gesamten Werte sind im Anhang dargestellt.

3.4.2. *dnc¹* und *dnc^{A143}* Fliegen haben einen Defekt in der zellulären Stressantwort

Hitze und Ethanol sind zwei von mehreren Faktoren die zellulären Stress induzieren. Durch einen Hitzeschock werden ähnliche Stressproteine in der Zelle induziert wie durch einen Ethanolstimulus (Piper, 1995). Wildtypfliegen, die anstelle der ersten Ethanol Exposition einen Hitzeschock bei 37°C für 30 Minuten bekommen und anschließend im Inebriometer getestet werden, sind nach dem Hitzeschock resistenter gegenüber Ethanol im Vergleich zu

Fliegen ohne Hitzeschock. Das heißt, Hitze und Ethanol aktivieren ähnliche Signaltransduktionskaskaden. Diese zelluläre Stressantwort ist in *hang^{AE10}* Fliegen defekt, da sie keine normale Hitze-Ethanol-Crosstoleranz entwickeln können (Scholz *et al.*, 2005). Mithilfe dieses Paradigmas wurde nun untersucht, ob auch in den *dnc¹* und *dnc^{A143}* Mutanten die zur Toleranzentwicklung benötigte zelluläre Stresskomponente beeinträchtigt ist. Beide Mutanten zeigen signifikant weniger Crosstoleranzentwicklung im Vergleich zu den getesteten Kontrollfliegen *Canton S* und *w¹¹¹⁸*. Das heißt, auch in diesen Mutanten scheint ein Defekt in der zellulären Stressantwort vorzuliegen, der wichtig für eine normale Ethanol-toleranzentwicklung ist.

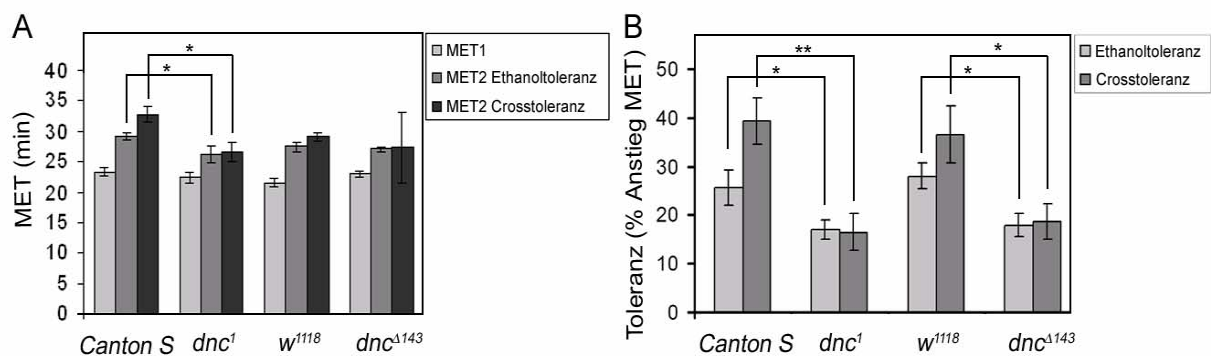


Abb. 3.20: *dnc¹* und *dnc^{A143}* Mutanten entwickeln eine reduzierte Hitze-Ethanol-Crosstoleranz

A) Die Werte für die MET1 (hellgrau) sind nicht signifikant unterschiedlich zwischen *dnc¹* bzw. *dnc^{A143}* und *Canton S* bzw. *w¹¹¹⁸* (*Canton S*: 23,3 ± 0,7 min; *dnc¹*: 22,3 ± 0,9 min; *w¹¹¹⁸*: 21,5 ± 0,7 min; *dnc^{A143}*: 22,9 ± 0,6 min). Die MET2 Werte für die Ethanoltoleranz (dunkelgrau) sind signifikant unterschiedlich zwischen *Canton S* und *dnc¹*, aber nicht zwischen *w¹¹¹⁸* und *dnc^{A143}* (*Canton S*: 29,1 ± 0,6 min; *dnc¹*: 26,2 ± 1,4 min; *w¹¹¹⁸*: 27,4 ± 0,7; *dnc^{A143}*: 27,0 ± 0,3 min). Die Resistenz nach dem Hitzeschock, gemessen als MET2 (schwarz) sind für *w¹¹¹⁸* und *dnc^{A143}* nicht unterschiedlich, aber für *Canton S* und *dnc¹* Fliegen (*Canton S*: 32,7 ± 1,3 min; *dnc¹*: 26,6 ± 1,6 min; *w¹¹¹⁸*: 29,1 ± 0,7 min; *dnc^{A143}*: 27,3 ± 5,9 min). **B)** Die *dnc¹* bzw. *dnc^{A143}* Mutanten entwickeln, wie unter Abb. 3.19 bereits gezeigt, reduzierte Ethanoltoleranz (hellgrau) als auch signifikant weniger Hitze-Ethanol-Crosstoleranz (dunkelgrau) im Vergleich zu ihren jeweiligen Kontrollen *Canton S* und *w¹¹¹⁸* (*Canton S*: 39,4 ± 4,8 min; *dnc¹*: 16,6 ± 3,7 min; *w¹¹¹⁸*: 36,6 ± 5,8 min; *dnc^{A143}*: 18,7 ± 3,5 min). Die Anzahl der Versuche beträgt N=7 und $p^{**} \leq 0,01$.

3.4.3. Die Expression von *dnc* mit der *dnc^{RMRA}* GAL4-Linie rettet die reduzierte Ethanoltoleranz der *dnc^{A143}* Mutante

Das GAL4/UAS-System kann dazu genutzt werden bestimmte Gene in gewünschten Zellen mittels GAL4-Treiberlinie zu exprimieren (Brand und Perrimon, 1993). Dies ist besonders bei einem sog. Rettungsversuch von Vorteil. Dabei kann das intakte Gen wieder in die Mutante

eingbracht werden und durch eine beliebige GAL4-Linie in bestimmten Regionen des Gehirns exprimiert werden. In dem folgenden Rettungsversuch sollte getestet werden, ob der reduzierte Ethanoltoleranz Phänotyp der dnc^{A143} Mutante tatsächlich durch die betroffenen dnc Transkripte hervorgerufen wurde, oder ob andere Faktoren, wie z.B. *second site* Mutationen, den Phänotyp auslösen. Dazu wurde ein *UAS-dnc* Konstrukt, das die UCR2 und die katalytische Domäne beinhaltet (siehe Anhang 9.3.), in die dnc^{A143} Mutante eingebracht und die Expression dieses Transgens in dnc^{RMRA} spezifischen Neuronen exprimiert. Sollte die Ethanoltoleranz der dnc^{A143} Fliegen verbessert werden, so wäre dies ein Beweis, dass die mutierten dnc Transkripte für den Phänotyp verantwortlich sind. Für diesen Versuch wurden $w^{1118}, UAS-dnc, dnc^{A143}; +; dnc^{RMRA}$ -GAL4 Fliegen und die dazugehörigen Kontrollen getestet. In Abbildung 3.21 ist das Ergebnis dieses Versuchs dargestellt. In Teil A sind MET1 und MET2 für die Testgruppe und alle Kontrollen aufgeführt. Die *UAS-dnc*, dnc^{A143} Kontrolle ist ca. fünf Minuten länger im Inebriometer verblieben als die dnc^{RMRA} -GAL4 Linie und ca. vier Minuten länger als $w^{1118}, dnc^{A143}; +; dnc^{RMRA}$ -GAL4. Das bedeutet die Werte der MET1 für *UAS-dnc*, dnc^{A143} , $w^{1118}, dnc^{A143}; +; dnc^{RMRA}$ -GAL4 und dnc^{RMRA} -GAL4 sind signifikant unterschiedlich. Die Entwicklung von Ethanoltoleranz ist dosisabhängig. Das heißt, je länger die Fliegen dem Alkohol während der ersten Exposition ausgesetzt sind, umso mehr Toleranz entwickeln sie, bis sie ein Maximum bei ca. 70% Toleranz bei einer ersten MET von ungefähr 40 Minuten erreicht haben (Scholz *et al.*, 2000). Dies bedeutet, wenn die getesteten Fliegenpopulationen verschiedene Werte der MET1 aufweisen, so kann die entwickelte Toleranz nicht mehr genau bestimmt werden. In diesem Versuch haben die unterschiedlichen MET1 Werte von *UAS-dnc*, dnc^{A143} , $w^{1118}, dnc^{A143}; +; dnc^{RMRA}$ -GAL4 und dnc^{RMRA} -GAL4 jedoch keinen Einfluss auf das Ergebnis des Rettungsversuches, da die mutanten Fliegen genotypen dem Alkohol länger ausgesetzt waren als die Wildtyp-Kontrolle dnc^{RMRA} -GAL4 (Abb. 3.21 a). Trotzdem entwickeln die Mutanten weniger Toleranz (Abb. 3.21 b). Alle anderen MET1 Werte unterscheiden sich nicht. Bis auf die MET2 Werte von $w^{1118}, dnc^{A143}; +; dnc^{RMRA}$ -GAL4 und *UAS-dnc*, $dnc^{A143}; +; dnc^{RMRA}$ -GAL4, die signifikant unterschiedlich zueinander sind, unterscheiden sich auch alle anderen Werte der MET2 nicht. Teil B zeigt, dass die dnc^{RMRA} -GAL4 Linie im w^{1118} Hintergrund und die Testgruppe *UAS-dnc*, $dnc^{A143}; +; dnc^{RMRA}$ -GAL4 wildtypische Toleranz entwickeln. Im Gegensatz dazu weisen die Kontrollen $w^{1118}, dnc^{A143}; +; dnc^{RMRA}$ -GAL4 und *UAS-dnc*, dnc^{A143} jeweils eine reduzierte Toleranz auf. Das heißt die Expression von *UAS-dnc*, dnc^{A143} mittels der dnc^{RMRA} -GAL4 Linie kann den Toleranzphänotyp der dnc^{A143} Mutante auf Wildtyp-Level retten. Der reduzierte

Ethanol Toleranzphänotyp ist auf die *dnc*^{A143} Mutation zurückzuführen und kann mithilfe der Expression von *dnc* in *dnc*^{RMRA} spezifischen Neuronen gerettet werden.

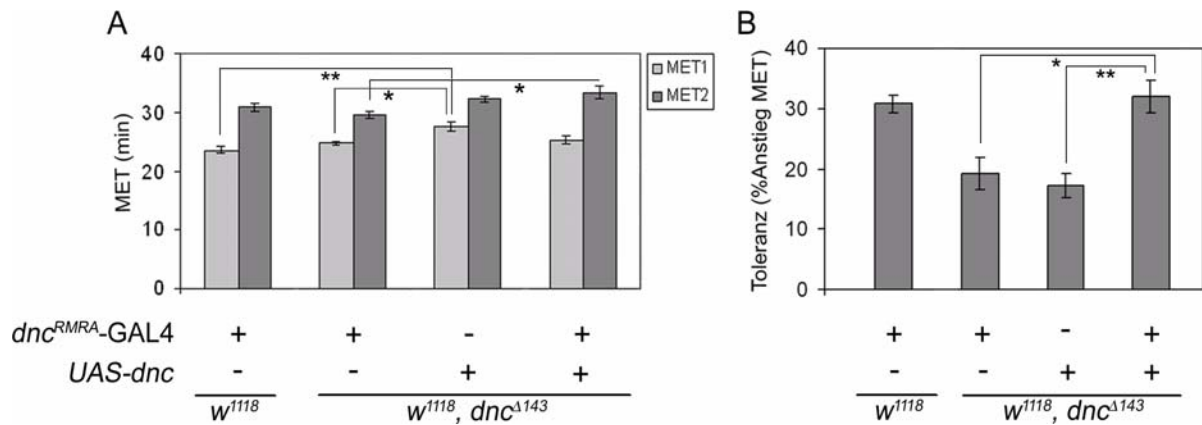


Abb. 3.21: Die Expression von *dnc* mit *dnc*^{RMRA}-GAL4 verändert signifikant die Toleranz der *dnc*^{A143} Mutante

A) Die Werte der MET1 (hellgrau) sind für alle Genotypen untereinander nicht unterschiedlich, bis auf die *dnc*^{RMRA}-GAL4 Linie, die signifikant kürzer im Inebriometer geblieben ist, als die *UAS-dnc, dnc*^{A143} Kontrolle (*w*¹¹¹⁸;+;*dnc*^{RMRA}-GAL4: 23,6 ± 0,5; *w*¹¹¹⁸,*dnc*^{A143};+;*dnc*^{RMRA}-GAL4: 24,7 ± 0,4; *w*¹¹¹⁸,*UAS-dnc, dnc*^{A143}; +; +: 27,6 ± 0,8; *w*¹¹¹⁸,*UAS-dnc, dnc*^{A143};+;*dnc*^{RMRA}-GAL4: 25,2 ± 0,6). Die Testgruppe *UAS-dnc, dnc*^{A143};+;*dnc*^{RMRA}-GAL4 hat eine signifikant höhere MET2 als *dnc*^{A143};+;*dnc*^{RMRA}-GAL4. Alle anderen Werte für die MET2 (dunkelgrau) sind jedoch nicht unterschiedlich zueinander (*w*¹¹¹⁸;+;*dnc*^{RMRA}-GAL4: 30,8 ± 0,7; *w*¹¹¹⁸,*dnc*^{A143};+;*dnc*^{RMRA}-GAL4: 29,4 ± 0,6; *w*¹¹¹⁸,*UAS-dnc, dnc*^{A143}; +; +: 32,2 ± 0,5; *w*¹¹¹⁸,*UAS-dnc, dnc*^{A143};+;*dnc*^{RMRA}-GAL4: 33,3 ± 1,1). **B)** Die Kontrollen *w*¹¹¹⁸,*dnc*^{A143};+;*dnc*^{RMRA}-GAL4 und *w*¹¹¹⁸,*UAS-dnc, dnc*^{A143};+;+ entwickeln signifikant weniger Toleranz im Vergleich zu der *dnc*^{RMRA}-GAL Linie und dem Rettungskonstrukt *w*¹¹¹⁸,*UAS-dnc, dnc*^{A143};+;*dnc*^{RMRA}-GAL4 (*w*¹¹¹⁸;+;*dnc*^{RMRA}-Gal4: 30,8 ± 1,5; *w*¹¹¹⁸,*dnc*^{A143};+;*dnc*^{RMRA}-GAL4: 19,2 ± 2,8; *w*¹¹¹⁸,*UAS-dnc, dnc*^{A143};+;+: 17,3 ± 2,0; *w*¹¹¹⁸,*UAS-dnc, dnc*^{A143};+;*dnc*^{RMRA}-GAL4: 31,9 ± 2,7). Der Toleranzphänotyp der *dnc*^{A143} Mutante wird durch Expression von *dnc* mit der *dnc*^{RMRA}-GAL4 Linie gerettet. Die Anzahl der Versuche beträgt N=8 und *p***≤0,003 (Bonferroni Korrektur = 3).

Die unterschiedlichen MET1-Werte der zwei Genotypen haben, wie oben erwähnt, keinen Einfluss auf die entwickelte Toleranz. Trotzdem sollte in einem separaten Versuch untersucht werden, wie die MET2 Werte der einzelnen Genotypen nach einer einheitlichen ersten MET aussehen. Dazu wurden die Fliegen in Falcon-Röhrchen für 20 Minuten einer einheitlichen Ethanolmenge ausgesetzt, nach 3,5 Stunden Erholung in das Inebriometer überführt und die zweite MET gemessen. In Abb. 3.22 sind die Werte für die MET2 der Testgruppe und den dazugehörigen Kontrollen dargestellt.

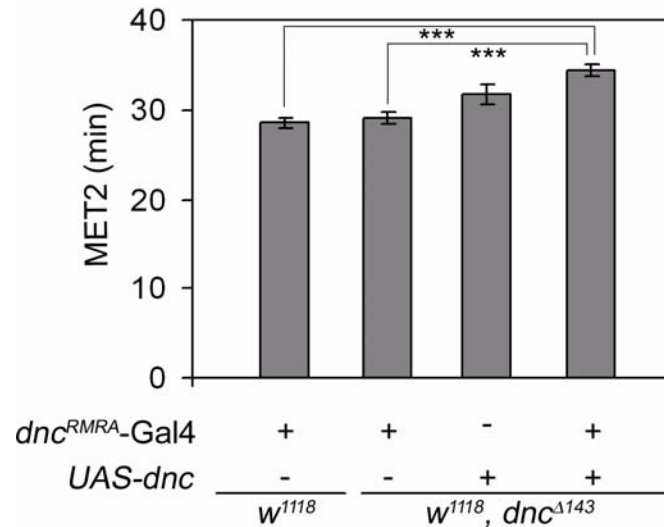


Abb. 3.22: MET2 der *dnc* Expression mit *dnc^{RMRA}*-GAL4 und den Kontrollen mit einheitlicher MET1

Die Fliegen bekamen die erste Ethanolexposition für 20 Minuten in Falcon-Röhrchen mit einem Ethanol-Luft-Verhältnis von 2,5:1,5. Nach einer Ausnüchterungsphase von 3,5 Stunden wurden sie in das Inebriometer überführt. Die Werte der MET2 für $w^{1118}, +; dnc^{RMRA}\text{-GAL4}$ und $w^{1118}, dnc^{A143}, +; dnc^{RMRA}\text{-GAL4}$ sind signifikant niedriger im Vergleich zur MET2 von $w^{1118}, UAS\text{-}dnc, dnc^{A143}, +; dnc^{RMRA}\text{-GAL4}$. Die Werte der mutanten Kontrollen sind jedoch nicht reduziert im Vergleich zur wildtypischen Kontrolle $w^{1118}, +; dnc^{RMRA}\text{-GAL4}$ ($w^{1118}, +; dnc^{RMRA}\text{-GAL4}$: 28,55 ± 0,59; $w^{1118}, dnc^{A143}, +; dnc^{RMRA}\text{-GAL4}$: 29,00 ± 0,66; $w^{1118}, UAS\text{-}dnc, dnc^{A143}, +; +$: 31,68 ± 1,13; $w^{1118}, UAS\text{-}dnc, dnc^{A143}, +; dnc^{RMRA}\text{-GAL4}$: 34,47 ± 0,71). Es zeigt sich eine tendenzielle Rettung des *dnc^{A143}* mutanten Phänotyps, diese ist jedoch nicht eindeutig signifikant. Die Anzahl der Versuche beträgt N=8 und $p^* \leq 0,016$, $p^{**} \leq 0,003$, $p^{***} \leq 0,0003$ (Bonferroni Korrektur von 3).

Dabei zeigt die Testgruppe eine signifikant erhöhte MET2 gegenüber $w^{1118}, dnc^{A143}, +; dnc^{RMRA}\text{-GAL4}$ und *dnc^{RMRA}*-GAL4. Die $w^{1118}, UAS\text{-}dnc, dnc^{A143}$ Kontrolle ist jedoch nicht signifikant unterschiedlich zu $w^{1118}, UAS\text{-}dnc, dnc^{A143}, +; dnc^{RMRA}\text{-GAL4}$. In diesem Versuch kann der Toleranzphänotyp der *dnc^{A143}* Mutante durch Expression von *dnc* mit der *dnc^{RMRA}*-GAL4 Linie nicht gerettet werden, da $w^{1118}, UAS\text{-}dnc, dnc^{A143}$ Fliegen keine reduzierte MET2 im Vergleich zu der Testgruppe zeigen und *dnc^{RMRA}*-Gal4 eine reduzierte MET2 gegenüber der Testgruppe. Es zeigt sich jedoch eine Tendenz, dass die $w^{1118}, UAS\text{-}dnc, dnc^{A143}, +; dnc^{RMRA}\text{-GAL4}$ Fliegen eine höhere MET2 aufweisen im Vergleich zu den mutanten Kontrollen.

3.4.4. Die Expression von *dnc* mit der *dnc^{RMRA}*-GAL4 Linie rettet nicht die Defekte in der zellulären Stressantwort von *dnc^{A143}* Fliegen

Da der Ethanoltoleranz Phänotyp von *dnc^{A143}* vollständig durch die Expression von *UAS-dnc* mit *dnc^{RMRA}*-GAL4 gerettet werden konnte, sollte untersucht werden, ob die Expression von *dnc* in der *dnc^{A143}* Mutante auch die defekte Stressantwort in dieser Mutante wieder herstellt. In Abb. 3.23 A sind die Werte für die MET1 und MET2 der Ethanoltoleranz gezeigt. Die erste MET von *w¹¹¹⁸,dnc^{A142};+;+;dnc^{RMRA}*-GAL4 ist signifikant unterschiedlich zu *w¹¹¹⁸,dnc^{A143},UAS-dnc;+;+*. Außerdem ist der MET2 Wert von *w¹¹¹⁸,dnc^{A142};+;+;dnc^{RMRA}*-GAL4 signifikant unterschiedlich zu der Testgruppe und zu *w¹¹¹⁸,dnc^{A143},UAS-dnc;+;+*. Da die Ethanoltoleranz dosisabhängig ist, wie oben bereits erwähnt, konnte aufgrund der unterschiedlichen ersten MET der einzelnen Genotypen keine Toleranz berechnet werden.

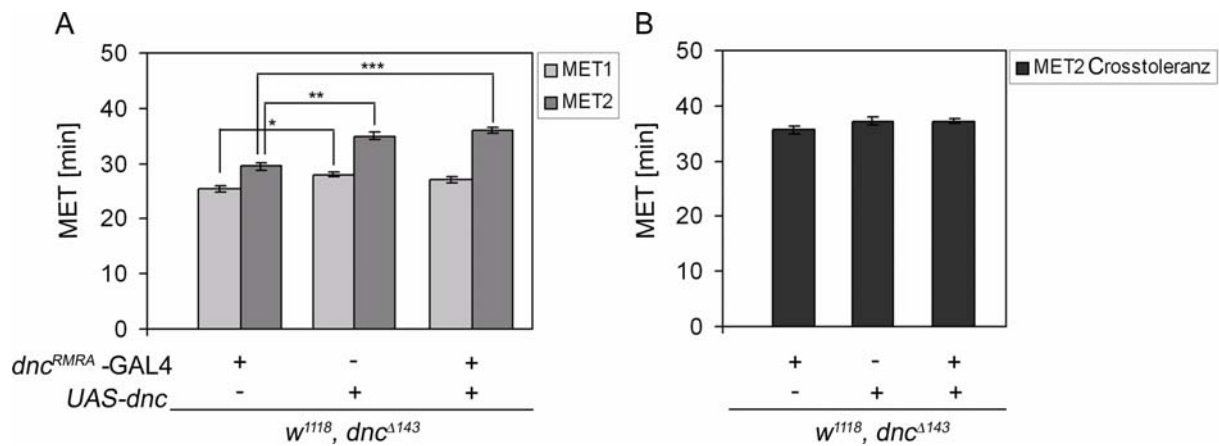


Abb. 3.23: Die Defekte in der zellulären Stressantwort von *dnc^{A143}* können nicht durch die Expression von *dnc* mit *dnc^{RMRA}*-GAL4 gerettet werden.

A) Der Wert für die MET1 (hellgrau) von *w¹¹¹⁸,dnc^{A143};+;+;dnc^{RMRA}*-GAL4 ist signifikant unterschiedlich zu *w¹¹¹⁸,dnc^{A143},UAS-dnc;+;+* (*w¹¹¹⁸,dnc^{A143};+;+;dnc^{RMRA}*-GAL4: 25,5 ± 0,6; *w¹¹¹⁸,dnc^{A143},UAS-dnc;+;+*: 28,0 ± 0,4; *w¹¹¹⁸,dnc^{A143},UAS-dnc;+;+;dnc^{RMRA}*-GAL4: 27,0 ± 0,5). Außerdem sind die Werte der MET2 für die Ethanoltoleranz (grau) für *w¹¹¹⁸,dnc^{A143};+;+;dnc^{RMRA}*-GAL4 signifikant unterschiedlich zu *w¹¹¹⁸,dnc^{A143},UAS-dnc;+;+* und *w¹¹¹⁸,dnc^{A143},UAS-dnc;+;+;dnc^{RMRA}*-GAL4 (*w¹¹¹⁸,dnc^{A143};+;+;dnc^{RMRA}*-GAL4: 29,5 ± 0,6; *w¹¹¹⁸,dnc^{A143},UAS-dnc;+;+*: 35,0 ± 0,8; *w¹¹¹⁸,dnc^{A143},UAS-dnc;+;+;dnc^{RMRA}*-GAL4: 36,1 ± 0,4). Aufgrund der unterschiedlichen ersten MET kann keine korrekte Crosstoleranz berechnen. **B)** Die Werte der MET2 für die Crosstoleranz (schwarz) sind nicht signifikant unterschiedlich zwischen den einzelnen Genotypen (*w¹¹¹⁸,dnc^{A143};+;+;dnc^{RMRA}*-GAL4: 35,7 ± 0,7; *w¹¹¹⁸,dnc^{A143},UAS-dnc;+;+*: 37,2 ± 0,7; *w¹¹¹⁸,dnc^{A143},UAS-dnc;+;+;dnc^{RMRA}*-GAL4: 37,3 ± 0,5). Die Expression von *dnc* in der *dnc^{A143}* Mutante in *dnc^{RMRA}*-GAL4 exprimierenden Neuronen, führt zu keiner unterschiedlichen Resistenz der Testgruppe gegenüber Hitze und Ethanol im Vergleich zu den Kontrollen. Die Anzahl der Versuche beträgt N=7 und $p^* \leq 0,025$, $p^{**} \leq 0,0005$, $p^{***} \leq 0,00005$ (Bonferroni Korrektur von 2).

In Teil B der Abbildung 3.23 sind deshalb die Werte für die MET2 der Genotypen nach dem Hitzeschock dargestellt. Die MET2 Werte für die Crosstoleranz sind nicht signifikant unterschiedlich zwischen der Testgruppe und den Kontrollen. Es sieht so aus, als würden die Transgene auf den Hitzeschock reagieren und die Fliegen deshalb resistenter gegenüber Ethanol werden. Für eine genauere Aussage müssten zusätzlich w^{1118}, dnc^{A143} und w^{1118} als Kontrollen mit getestet werden. Sollten die $w^{1118}, dnc^{A142}; +; dnc^{RMRA}$ -GAL4 und $w^{1118}, dnc^{A143}, UAS-dnc; +; +$ Fliegen dann eine signifikant höhere Resistenz im Vergleich zu w^{1118}, dnc^{A143} zeigen, wäre dies der Beweis für eine Induktion der Transgene durch Hitze. Ob die *dnc* Expression in *UAS-dnc* Fliegen tatsächlich ohne GAL4, nur durch einen Hitzeschock, aktiviert werden kann, sollte auch der folgende Versuch zeigen. Es wurden die *UAS-dnc* und *dnc^{RMRA}*-GAL4 Konstrukte im w^{1118} Hintergrund und die Testgruppe $w^{1118}; UAS-dnc; +; dnc^{RMRA}$ -GAL4 auf ihre Toleranz gegenüber Hitze und Ethanol getestet. Da die *dnc^{A143}* und *dnc^l* Mutanten eine reduzierte Crosstoleranz aufweisen (Abb. 3.20), würde man bei einer Überexpression von *dunce* eine wildtypische oder sogar erhöhte Crosstoleranz erwarten, wobei sich die Kontrollfliegen untereinander nicht unterschiedlich verhalten sollten. In Abbildung 3.24 A sind die Werte der MET1 für die Ethanoltoleranz dargestellt. Die erste MET der *dnc^{RMRA}*-GAL4 Linie ist signifikant niedriger im Vergleich zu den beiden anderen Genotypen. Auch die zweite MET von *dnc^{RMRA}*-GAL4 ist gegenüber der Testgruppe signifikant reduziert. Aufgrund der unterschiedlichen MET1-Werte im Inebriometer für die einzelnen Genotypen, werden nicht die Crosstoleranzwerte analysiert, sondern die Werte der MET2 nach dem Hitzeschock (Abb. 3.24 B). Auch hier zeigen die *dnc^{RMRA}*-GAL4 Fliegen signifikant niedrigere Werte im Vergleich zu den anderen Genotypen. Die Ergebnisse zeigen, dass die Fliegen, die das *UAS-dnc* Konstrukt enthalten, von vornherein schon eine leichte Resistenz gegenüber Ethanol haben, was sich in höheren MET1 Werten zeigt (Teil A).

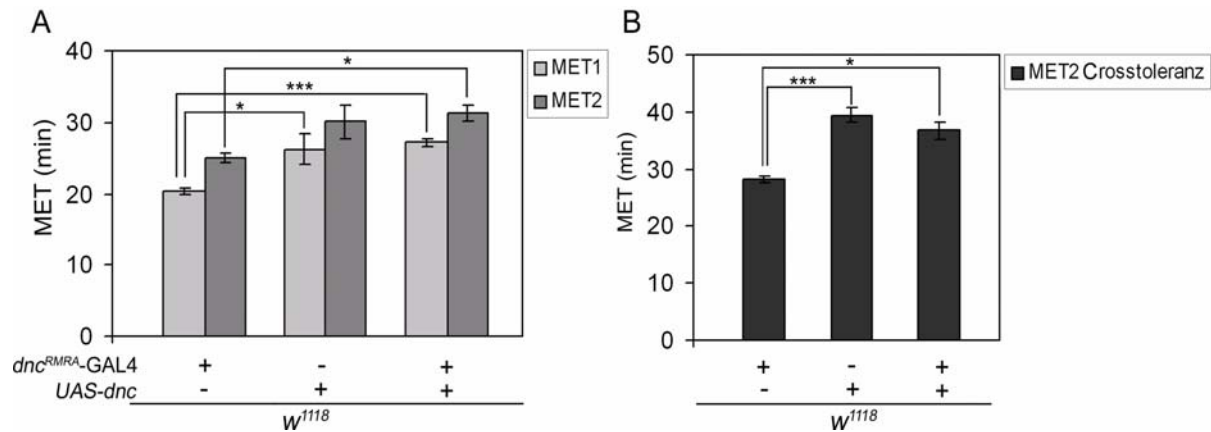


Abb. 3.24: **Der Hitzeschock aktiviert die $UAS-dnc$ Linie, auch ohne GAL4.**

A) Die Werte der MET1 der Ethanol toleranz (grau) sind signifikant unterschiedlich zwischen $w^{1118};+;dnc^{RMRA}-GAL4$, $UAS-dnc$ und $UAS-dnc;+;dnc^{RMRA}-GAL4$. Die Werte der MET2 (dunkelgrau) unterscheiden sich nur zwischen $w^{1118};+;dnc^{RMRA}-GAL4$ und $UAS-dnc;+;dnc^{RMRA}-GAL4$ (MET1: $w^{1118};+;dnc^{RMRA}-GAL4$: $20,2 \pm 0,5$; $w^{1118},UAS-dnc;+;+$: $26,2 \pm 2,1$; $w^{1118},UAS-dnc;+;dnc^{RMRA}-GAL4$: $27,2 \pm 0,6$; MET2: $w^{1118};+;dnc^{RMRA}-GAL4$: $28,1 \pm 0,6$; $w^{1118},UAS-dnc;+;+$: $39,5 \pm 1,3$; $w^{1118},UAS-dnc;+;dnc^{RMRA}-GAL4$: $36,8 \pm 1,6$). **B)** Die Werte für die MET2 der Crosstoleranz (schwarz) für $w^{1118};+;dnc^{RMRA}-GAL4$ sind signifikant niedriger im Vergleich zu den beiden anderen Genotypen ($w^{1118};+;dnc^{RMRA}-GAL4$: $28,1 \pm 0,6$; $w^{1118},UAS-dnc;+;+$: $39,5 \pm 1,3$; $w^{1118},UAS-dnc;+;dnc^{RMRA}-GAL4$: $36,8 \pm 1,6$). Das heißt, der Hitzeschock alleine scheint die dnc Expression in den $w^{1118},UAS-dnc$ Fliegen zu aktivieren. Die Anzahl der Versuche beträgt $N=5$ und $p^* \leq 0,025$, $p^{**} \leq 0,0005$, $p^{***} \leq 0,00005$ (Bonferroni Korrektur von 2).

Die $w^{1118},UAS-dnc$ Fliegen zeigen eine signifikant höhere MET2 für die Crosstoleranz im Vergleich zu dem $w^{1118};+;dnc^{RMRA}-GAL4$ Genotyp, aber einen vergleichbaren Wert zur Testgruppe. Das bedeutet, dass wahrscheinlich der Hitzeschock alleine ausreicht, um die dnc Expression in den $w^{1118},UAS-dnc$ Fliegen aktivieren zu können und sie deshalb länger wie die Wildtypkontrolle im Inebriometer verbleiben können. Andererseits kann aber auch die erhöhte Resistenz dieser Fliegen gegenüber Ethanol zu einem resistenteren Verhalten nach einem Hitzeschock führen. Dies kann anhand dieser Ergebnisse nicht genau analysiert werden. Aufgrund der diskutierten Gründe ist es jedoch nicht möglich, die reduzierte Crosstoleranz in der dnc^{A143} Mutante durch die Expression von dnc mithilfe von $dnc^{RMRA}-GAL4$ zu retten, da die Anwesenheit des $UAS-dnc$ Konstruktes die Ethanolantwort in den Fliegen nach dem Hitzeschock beeinflusst.

3.5. Hat eine Veränderung der zellulären cAMP Konzentration Auswirkungen auf die Ethanoltoleranzentwicklung?

Der Verlust von bestimmten *dnc* Transkripten führt dazu, dass nur eine reduzierte Ethanoltoleranz entwickelt wird (siehe 3.4.1). Das heißt, die Regulierung der cAMP Konzentration hat einen entscheidenden Einfluss auf die Toleranzentwicklung. Erhöhtes cAMP in der Zelle führt zu einer verminderten Toleranz. Die Frage ist nun, ob weniger cAMP auch zu einer Veränderung im Verhalten gegenüber Ethanol führt.

3.5.1. Die Überexpression von *dnc* mit der *dnc^{RMRA}*-GAL4 Linie hat keinen Einfluss auf die Ethanoltoleranz

Wenn *dnc* überexprimiert wird, müsste weniger cAMP in den von der *dnc^{RMRA}*-GAL4 Linie getriebenen Zellen vorliegen und diese mit einem veränderten Ethanol induziertem Verhalten reagieren. In Abbildung 3.25 ist das Ergebnis dieses Versuchs dargestellt. In Teil A sind die Werte für die MET1 und MET2 dargestellt. Es fällt auf, dass die Fliegenlinien, die das *UAS-dnc* Konstrukt beinhalten eine höhere Ethanolresistenz aufweisen im Vergleich zu den *dnc^{RMRA}*-GAL4 Fliegen. Die *w¹¹¹⁸* Fliegen dienen nur als Kontrolle für die Funktionalität des Inebriometers und werden deshalb nicht in die Statistik mit einbezogen. Teil B zeigt die Toleranzentwicklung. Dabei zeigt sich, dass die Überexpression von *dnc* zu keiner signifikant unterschiedlichen Toleranzentwicklung führt, im Vergleich zu den Kontrollen. Die unterschiedlichen MET1 Werte sollten aufgrund der Dosisabhängigkeit der Toleranzentwicklung keinen Einfluss haben. Trotzdem sollte die Toleranz dieser Fliegen mit einer einheitlichen ersten MET nochmals untersucht werden.

Ob die erhöhte Ethanolresistenz der *w¹¹¹⁸,UAS-dnc* und den *w¹¹¹⁸,UAS-dnc;+;dnc^{RMRA}*-GAL4 Fliegen in Abb. 3.25 A durch den Insertionsort der *UAS*-Linie vermittelt wird, sollte mit Hilfe einer auf dem dritten Chromosom liegenden *UAS-dnc* Linie untersucht werden. Der Versuch ist in Abbildung 3.26 dargestellt. Teil A zeigt wieder die Werte für MET1 und MET2.

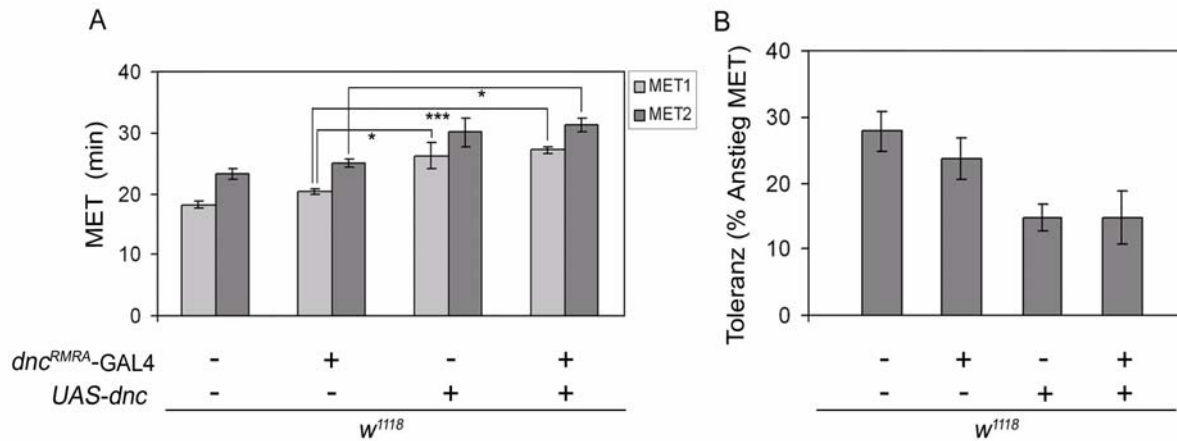


Abb. 3.25: Die Überexpression von *dnc* mit *dnc^{RMRA}-GAL4* führt zu keiner Veränderung im Ethanoltoleranzverhalten.

A) Die MET1 (hellgrau) und MET2 (dunkelgrau) Werte von *w¹¹¹⁸;+; dnc^{RMRA}-GAL4* sind signifikant unterschiedlich zu *w¹¹¹⁸, UAS-dnc; +; +* und *w¹¹¹⁸, UAS-dnc; +; +; dnc^{RMRA}-GAL4* (MET1: *w¹¹¹⁸*: 18,2 ± 0,6; *w¹¹¹⁸;+; dnc^{RMRA}-GAL4*: 20,2 ± 0,5; *w¹¹¹⁸, UAS-dnc; +; +*: 26,2 ± 2,1; *w¹¹¹⁸, UAS-dnc; +; +; dnc^{RMRA}-GAL4*: 27,2 ± 0,6. MET2: *w¹¹¹⁸*: 23,2 ± 0,9; *w¹¹¹⁸;+; dnc^{RMRA}-GAL4*: 25,0 ± 0,7; *w¹¹¹⁸, UAS-dnc; +; +*: 30,1 ± 2,4; *w¹¹¹⁸, UAS-dnc; +; +; dnc^{RMRA}-GAL4*: 31,2 ± 1,1). **B)** Die Werte für die Toleranzentwicklung (dunkelgrau) unterscheiden sich nicht voneinander (*w¹¹¹⁸*: 27,8 ± 3,1; *w¹¹¹⁸;+; dnc^{RMRA}-GAL4*: 23,6 ± 3,1; *w¹¹¹⁸, UAS-dnc; +; +*: 14,8 ± 2,0; *w¹¹¹⁸, UAS-dnc; +; +; dnc^{RMRA}-GAL4*: 14,8 ± 4,0). Die Überexpression von *dnc* in *dnc^{RMRA}* spezifischen Zellen hat demnach keinen Einfluss auf die Toleranzentwicklung. Die Anzahl der Versuche beträgt N=6 und $p^* \leq 0,025$, $p^{**} \leq 0,0005$, $p^{***} \leq 0,00005$ (Bonferroni Korrektur von 2).

Auch hier wurde *w¹¹¹⁸* als Kontrolle für das Inebriometer verwendet und wird deshalb nicht in die Auswertung mit einbezogen. Die Werte für die MET1 sind bei allen drei Genotypen nicht signifikant unterschiedlich. Das heißt die Resistenz der *w¹¹¹⁸, UAS-dnc; +; +* Fliegen aus Abb. 3.25 A ist auf den Insertionsort des *UAS-dnc* Transgens zurückzuführen. Abb. 3.26 B zeigt die Werte für die Toleranzentwicklung. Alle Genotypen sind nicht signifikant unterschiedlich zueinander. Das bedeutet, dass eine Überexpression von *dnc* in den *dnc^{RMRA}* spezifischen Zellen zu keiner Veränderung im Toleranzverhalten der Fliegen führt.

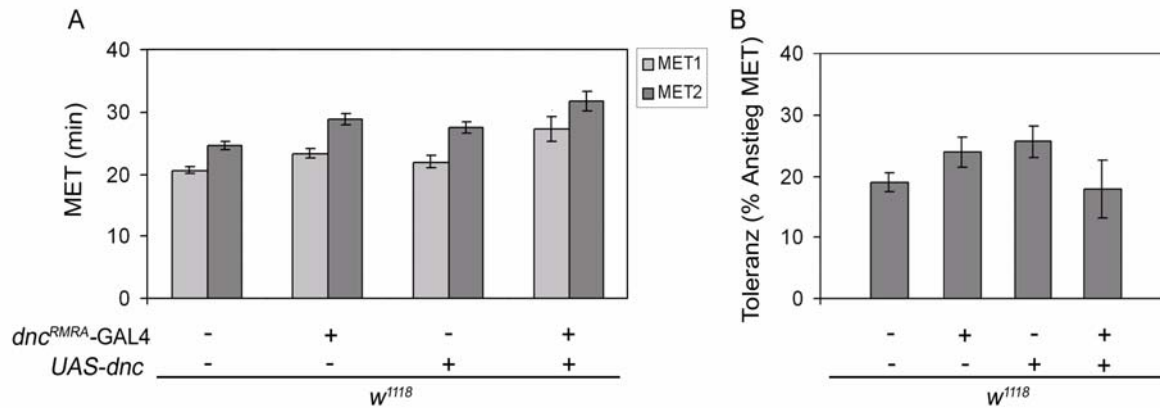


Abb. 3.26: **Der Insertionsort der *UAS-dnc* Linie hat eine Einfluss auf die Ethanolresistenz, aber nicht auf die Toleranz.**

A) Die Werte für die MET1 sind in hellgrau dargestellt, die Werte für die MET2 in dunkelgrau. Die MET1 Werte und MET2 Werte von $w^{1118}; +; dnc^{RMRA}-GAL4$, $w^{1118}; +; UAS-dnc$ und $w^{1118}; +; UAS-dnc, dnc^{RMRA}-GAL4$ sind nicht signifikant unterschiedlich (MET1: w^{1118} : 20,6 ± 0,6; $w^{1118}; +; dnc^{RMRA}-GAL4$: 23,3 ± 0,8; $w^{1118}; +; UAS-dnc$: 22,0 ± 1,0; $w^{1118}; +; UAS-dnc, dnc^{RMRA}-GAL4$: 27,2 ± 2,1. MET2: w^{1118} : 24,5 ± 0,7; $w^{1118}; +; dnc^{RMRA}-GAL4$: 28,8 ± 0,8; $w^{1118}; +; UAS-dnc$: 27,5 ± 0,9; $w^{1118}; +; UAS-dnc, dnc^{RMRA}-GAL4$: 31,7 ± 1,5). **B)** Die Werte der Toleranzentwicklung der einzelnen Genotypen sind zueinander nicht signifikant unterschiedlich (w^{1118} : 19,1 ± 1,6; $w^{1118}; +; dnc^{RMRA}-GAL4$: 23,9 ± 2,5; $w^{1118}; +; UAS-dnc$: 25,6 ± 2,6; $w^{1118}; +; UAS-dnc, dnc^{RMRA}-GAL4$: 17,9 ± 4,6). Das heißt, auch hier führt die Überexpression von *dnc* zu keiner Veränderung der Ethanoltoleranz. Die Anzahl der Versuche beträgt N=6 und $p^* \leq 0,025$, $p^{**} \leq 0,0005$, $p^{***} \leq 0,00005$ (Bonferroni Korrektur von 2).

3.5.2. Die Überexpression von *rutabaga* hat keinen Einfluss auf die Toleranzentwicklung

Das Gen *rutabaga* kodiert für eine Ca^{2+} -/ Calmodulin-abhängige Adenylatzyklase (Livingstone *et al.*, 1984). Dies ist ein weiteres Protein, welches bei der Regulierung von cAMP Konzentrationen eine wichtige Rolle spielt. Es wandelt ATP in cAMP um und reguliert so die cAMP Konzentration in der Zelle. Durch eine Überexpression des Gens kommt es zu einer Erhöhung der cAMP Moleküle in den GAL4-getriebenen Zellen. Dies würde der cAMP Situation in der dnc^{A143} Mutante entsprechen und könnte zu einem reduzierten Ethanoltoleranz Phänotyp führen. Dies wurde mit folgendem Versuch überprüft. Es wurde die Toleranzentwicklung von $w^{1118}; +; UAS-rutabaga, dnc^{RMRA}-GAL4$ und den dazugehörigen Kontrollen gemessen. In Abbildung 3.27 sind in Teil A die MET1 und MET2 der verschiedenen Genotypen gezeigt. Die Werte der MET1 sind nicht signifikant unterschiedlich zwischen den verschiedenen Versuchstieren, w^{1118} hat jedoch einen signifikant unterschiedlichen MET2 Wert im Vergleich mit $dnc^{RMRA}-GAL4$ und $w^{1118}; +; UAS-rutabaga, dnc^{RMRA}-GAL4$ (nicht gezeigt). Da die w^{1118} Fliegen nur als interne Kontrolle für das Inebriometer dienen, unterscheidet sich innerhalb des eigentlichen Versuchs nur der MET2

Wert von $w^{1118};+;UAS-rutabaga$ signifikant von dem Wert von $w^{1118};+;UAS-rutabaga,dnc^{RMRA}-GAL4$ und $w^{1118};+;dnc^{RMRA}-GAL4$. In Teil B ist die Toleranzentwicklung der einzelnen Fliegenlinien gezeigt, die sich untereinander nicht unterscheidet. Das bedeutet, dass die Überexpression von *rutabaga* mit *dnc^{RMRA}-GAL4* keine Auswirkungen auf die Ethanoltoleranzentwicklung hat. Für dieses Ergebnis gibt es mehrere Erklärungen, zum einen könnte die cAMP Regulation durch *Rutabaga* in den *dnc^{RMRA}-GAL4* exprimierenden Zellen keinen Einfluss auf die Toleranzentwicklung haben. Zum anderen kann die Überexpression von *Rutabaga* zu einer Aktivierung von *Dunce* in den Zellen führen und damit zu einer Normalisierung der cAMP Konzentration.

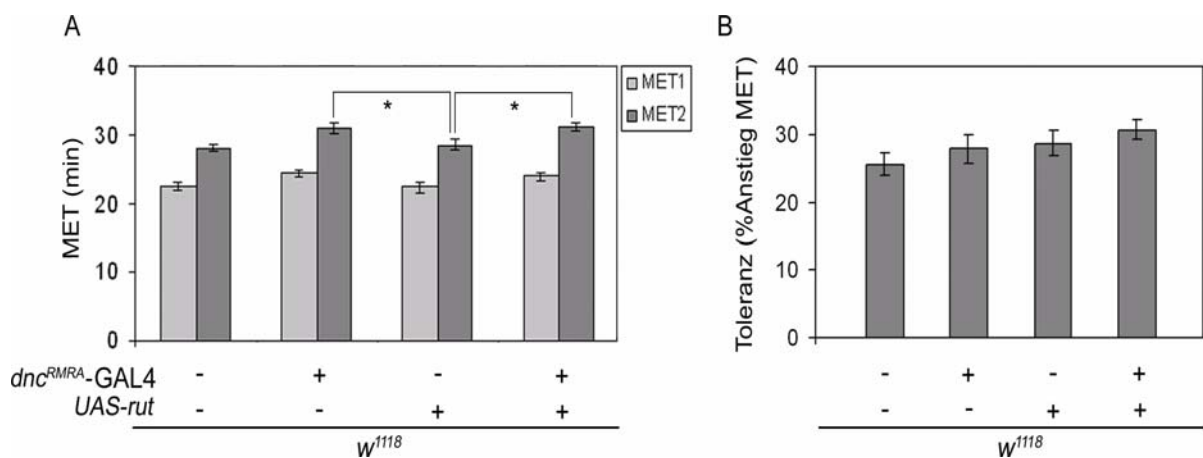


Abb. 3.27: Die Überexpression von *rutabaga* mit *dnc^{RMRA}-GAL4* führt zu keiner Veränderung im Ethanol-induzierten Verhalten.

A) Die Werte für die MET1 (hellgrau) sind bei allen vier Genotypen nicht signifikant unterschiedlich (w^{1118} : $22,4 \pm 0,6$; $w^{1118};+;dnc^{RMRA}-GAL4$: $24,3 \pm 0,6$; $w^{1118};+;UAS-rutabaga$: $22,3 \pm 0,8$; $w^{1118};+;UAS-rutabaga,dnc^{RMRA}-GAL4$: $23,9 \pm 0,6$). Die MET2 Werte (dunkelgrau) von $w^{1118};+;UAS-rutabaga$ sind signifikant unterschiedlich zu $w^{1118};+;dnc^{RMRA}-GAL4$ und $w^{1118};+;UAS-rutabaga,dnc^{RMRA}-GAL4$ (w^{1118} : $27,9 \pm 0,6$; $w^{1118};+;dnc^{RMRA}-GAL4$: $30,9 \pm 0,7$; $w^{1118};+;UAS-rutabaga$: $28,4 \pm 0,7$; $w^{1118};+;UAS-rutabaga,dnc^{RMRA}-GAL4$: $31,2 \pm 0,7$). **B)** Die Werte für die Toleranz sind nicht signifikant unterschiedlich für alle Fliegenlinien (w^{1118} : $25,5 \pm 1,7$; $w^{1118};+;dnc^{RMRA}-GAL4$: $27,8 \pm 2,2$; $w^{1118};+;UAS-rutabaga$: $28,7 \pm 1,9$; $w^{1118};+;UAS-rutabaga,dnc^{RMRA}-GAL4$: $30,7 \pm 1,6$). Die Überexpression von *rutabaga* in *dnc^{RMRA}* spezifischen Zellen hat keinen Einfluss auf die Ethanoltoleranz dieser Fliegen. Die Anzahl der Versuche beträgt $N=22$ und $p^* \leq 0,025$ (Bonferroni Korrektur von 2).

3.5.3. Die Überexpression von *pka-c* in *dnc^{RMRA}* spezifischen Zellen führt zu einer erhöhten Ethanolresistenz dieser Fliegen

Das Gen *pka-c* kodiert für die katalytische Untereinheit der cAMP abhängigen Proteinkinase A (PKA) (Lane und Kalderon, 1993). Diese Untereinheit wird durch die Bindung von cAMP Molekülen aktiviert und induziert das *cyclic AMP response element binding protein*, des Transkriptionsfaktors CREB. Es ist bekannt, dass eine PKA-C1 Mutation, die *DCO* Mutante, zu einer erhöhten Ethanolsensitivität führt (Moore *et al.*, 1998). Deshalb könnte auch die Überexpression der katalytischen Untereinheit von PKA zu einer Veränderung des Ethanol-induzierten Verhaltens führen, da sich die Signaltransduktion ändert. Dazu wurde *pka-c* mit der *dnc^{RMRA}*-GAL4-Linie überexprimiert. Diese Fliegen und die dazugehörigen Kontrollen wurden im Inebriometer auf Sensitivität, Resistenz und Toleranz untersucht. Abbildung 3.28 Teil A zeigt die Werte für die MET1 und MET2 der getesteten Genotypen.

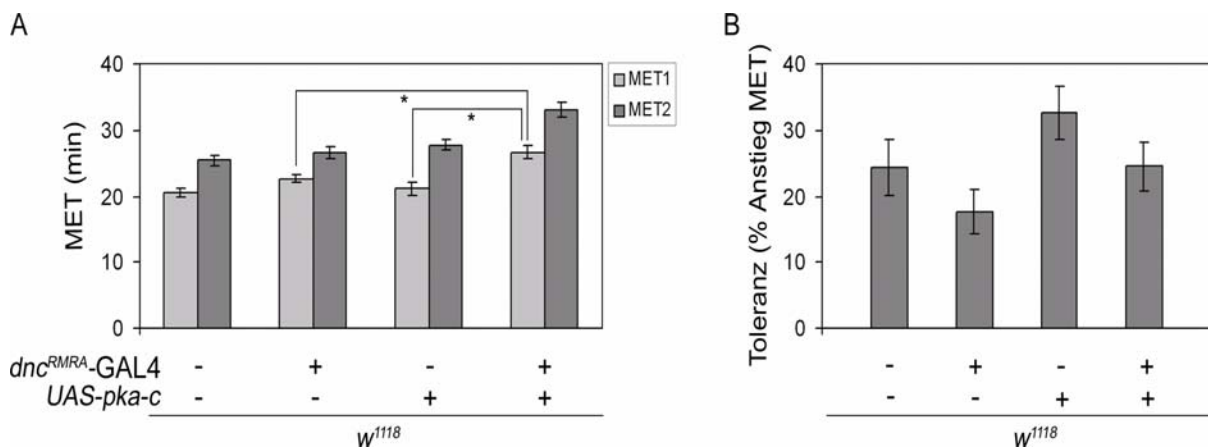


Abb. 3.28: Die Expression von *pka-c* in *dnc^{RMRA}* spezifischen Zellen führt zu einer verstärkten Ethanolresistenz dieser Fliegen.

A) Die Werte für die MET1 sind zwischen den Kontrollen und der Testlinie signifikant unterschiedlich, genauso wie die Werte der MET2 (MET1: *w¹¹¹⁸*: 20,5 ± 0,7; *w¹¹¹⁸;+;dnc^{RMRA}-GAL4*: 22,6 ± 0,6; *w¹¹¹⁸;+;UAS-pka-c*: 21,2 ± 1,0; *w¹¹¹⁸;+;UAS-pka-c;dnc^{RMRA}-GAL4*: 26,7 ± 0,9; MET2: *w¹¹¹⁸*: 25,4 ± 0,8; *w¹¹¹⁸;+;dnc^{RMRA}-GAL4*: 26,6 ± 0,9; *w¹¹¹⁸;+;UAS-pka-c*: 27,8 ± 0,8; *w¹¹¹⁸;+;UAS-pka-c;dnc^{RMRA}-Gal4*: 33,1 ± 1,0). B) Die Werte für die Toleranz sind zwischen allen Genotypen nicht signifikant unterschiedlich (*w¹¹¹⁸*: 24,4 ± 4,2; *w¹¹¹⁸;+;dnc^{RMRA}-GAL4*: 17,7 ± 3,4; *w¹¹¹⁸;+;UAS-pka-c*: 32,6 ± 4,1; *w¹¹¹⁸;+;UAS-pka-c;dnc^{RMRA}-GAL4*: 24,5 ± 3,7). Die Anzahl der Versuche beträgt N=10 und $p^* \leq 0,025$ (Bonferroni Korrektur von 2).

Die MET1 der Kontrollen und der Testlinie sind hoch signifikant unterschiedlich. Das heißt, die Überexpression *pka-c* in *dnc^{RMRA}* spezifischen Zellen führt zur Entwicklung von Ethanolresistenz. Auch die MET2 ist signifikant unterschiedlich zwischen den Kontrollen *w¹¹¹⁸*, *dnc^{RMRA}-GAL4*, *w¹¹¹⁸;+;UAS-pka-c* und den Testfliegen *w¹¹¹⁸;+;UAS-pka-c;dnc^{RMRA}-*

GAL4 (Signifikanz nicht gezeigt). In Teil B sind die Werte für die Toleranzentwicklung dargestellt. Alle Genotypen sind nicht signifikant unterschiedlich zueinander. Dieses Ergebnis müsste jedoch erneut mit einer einheitlichen ersten MET in Falcon-Röhrchen wiederholt werden, da die Toleranzentwicklung dosisabhängig ist (Scholz *et al.*, 2000) und eine unterschiedliche MET1 zu unterschiedlicher Toleranz führt. Die erhöhte Ethanolresistenz der Testgruppe ist vermutlich auf die Aktivierung PKA-abhängiger Proteine zurückzuführen.

3.6. Gibt es eine Interaktion von Hangover und *dunce* auf der Verhaltensebene?

Auf molekularer Ebene wurde bereits durch semi-quantitative RT-PCR eine Regulation von bestimmten *dnc* Transkripten durch Hangover gezeigt (siehe 3.2.1). Die ähnlichen Phänotypen der *dnc*^{A143} und *hang*^{AE10} Mutanten bei der Alkoholtoleranzentwicklung und der Crosstoleranz geben einen weiteren Hinweis auf einen Zusammenhang zwischen Hangover und *dnc*. Im folgenden Abschnitt wird diese Interaktion weiter untersucht.

3.6.1. Die Expression von *hang* in adulten Fliegen durch *dnc*^{RMRA}-GAL4 verbessert die reduzierte Toleranz der *hang*^{AE10} Fliegen

Ein Beweis, dass für die Toleranzentwicklung in *hang*^{AE10} Mutanten die gleichen Neurone benötigt werden wie für die Toleranzentwicklung in *dnc*^{A143} Mutanten, wäre die Rettung des *hang*^{AE10} Phänotyps durch die *dnc*^{RMRA}-GAL4 Linie. Die *w*¹¹¹⁸, *UAS-hang, hang*^{AE10};+;*dnc*^{RMRA}-GAL4 Fliegen sind jedoch embryonal letal. Deshalb wurde eine *dnc*^{RMRA}-GAL4,*tubGAL80* Linie hergestellt, die es ermöglicht, Transgene über Temperaturerhöhung erst im adulten Stadium zu aktivieren. Dabei wird das GAL4 bei einer Temperatur von 18°C von GAL80 blockiert, indem GAL80 an die transkriptionelle Aktivierungsdomäne von GAL4 bindet. Erst wenn die Temperatur über Nacht auf 33°C erhöht wird, löst sich das GAL80 von GAL4 und das jeweilige Transgen kann exprimiert werden (McGuire *et al.*, 2003). Für den folgenden Versuch wurde die Testgruppe *w*¹¹¹⁸, *UAS-hang, hang*^{AE10};+;*dnc*^{RMRA}-GAL4,*tubGAL80* mit und ohne Hitzeschock für die Entwicklung von Ethanoltoleranz getestet. Als Kontrolle wurden *w*¹¹¹⁸, *hang*^{AE10};+;*dnc*^{RMRA}-GAL4,*tubGAL80* Fliegen verwendet, bei denen der Hitzeschock keinen Einfluss auf die Toleranz haben sollte. In Abbildung 3.29 ist das Ergebnis dieses Versuches gezeigt. Teil A und C zeigen die Werte der MET1 und MET2 für die Testgruppe und die Kontrolle. Die Werte für die MET1 und die MET2 sind in A nicht signifikant unterschiedlich zwischen

$w^{1118}, UAS-hang, hang^{AE10}; +; dnc^{RMRA}-GAL4, tubGAL80$ ohne Hitzeschock und mit Hitzeschock. Für die Kontrolle $w^{1118}, hang^{AE10}; +; dnc^{RMRA}-GAL4, tubGAL80$ in Teil C kann keine Aussage über die Signifikanz gemacht werden, da die Anzahl der Versuch mit $N=3$ zu gering ist. Das Ergebnis deutet aber darauf hin, dass die Kontrollen mit Hitzeschock resistenter gegenüber Ethanol sind im Vergleich zu den Kontrollen ohne Hitzeschock. Dies könnte vielleicht daran liegen, dass in diesen Fliegen vermehrt GAL4 Protein hergestellt wird, aber aufgrund des fehlenden *UAS*-Transgens nicht verbraucht wird und somit die Ethanolsensitivität bzw. Resistenz reguliert. Teil B und D zeigen die Werte für die Toleranzentwicklung. Die $w^{1118}, UAS-hang, hang^{AE10}; +; dnc^{RMRA}-GAL4, tubGAL80$ Fliegen entwickeln mit Hitzeschock signifikant mehr Toleranz im Vergleich zu den gleichen Fliegen ohne Hitzeschock. Das heißt, die Expression von *hang* in *dnc^{RMRA}* spezifischen Zellen in adulten Fliegen führt zu einer erhöhten Toleranz im Vergleich zu den nicht induzierten Fliegen. Dies ist ein Hinweis darauf, dass die Gene *dunce* und *hangover* bei der Toleranzentwicklung in den gleichen Neuronen agieren. Als zusätzliche Kontrolle wurden auch die $w^{1118}, hang^{AE10}; +; dnc^{RMRA}-GAL4, tubGAL80$ Fliegen mit und ohne Hitzeschock auf ihre Ethanoltoleranz hin untersucht. Es sollte ausgeschlossen werden, dass der Hitzeschock alleine zu einer Erhöhung der Toleranz führt. Aber auch hier kann keine Aussage über die Signifikanz der Daten gemacht werden, da die Anzahl der Versuche zu gering ist. Die Tendenz des Ergebnisses deutet jedoch darauf hin, dass die Kontrollen ohne Hitzeschock keine höhere Toleranz entwickeln.

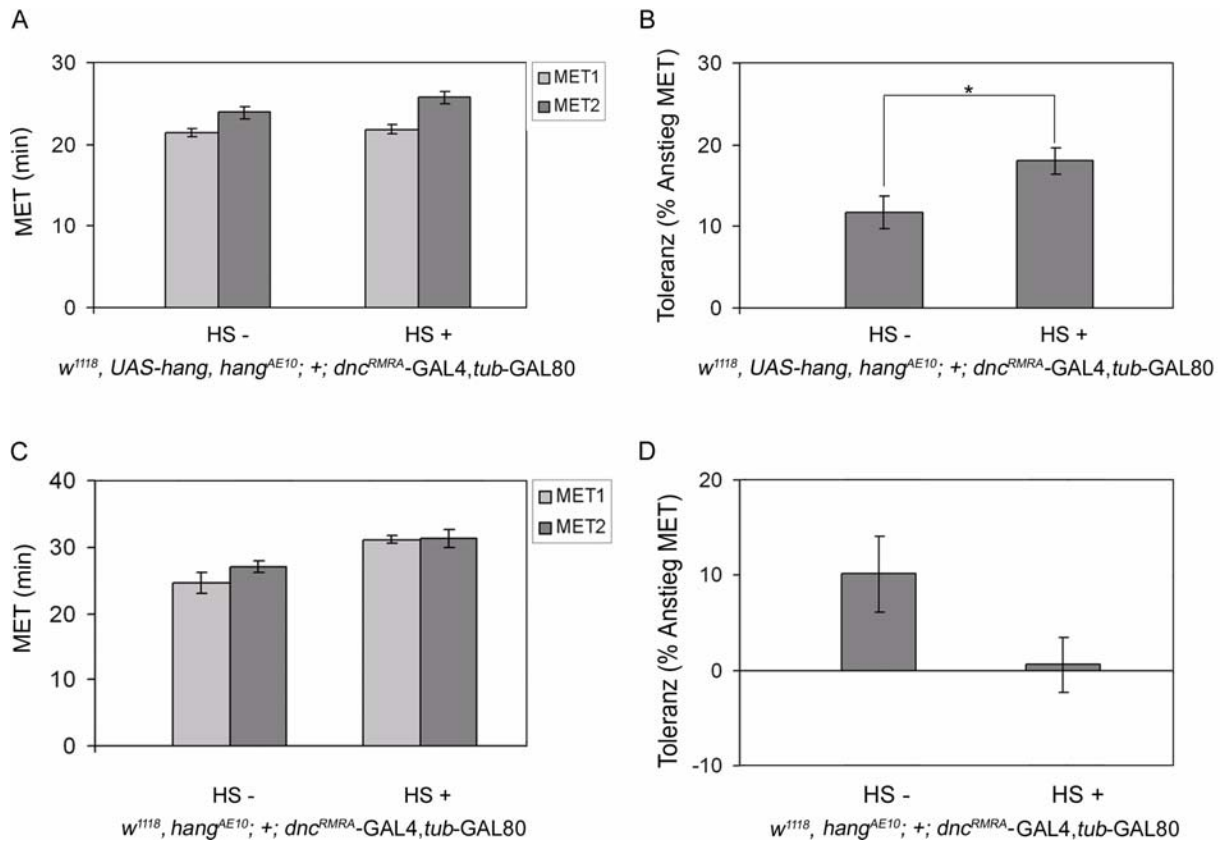


Abb. 3.29: Der $hang^{AE10}$ Toleranzphänotyp kann durch Expression von $hang$ mithilfe von $dnc^{RMRA}-GAL4$ in adulten Fliegen verbessert werden.

A) Die MET1 (hellgrau) und MET2 (dunkelgrau) der $w^{1118}, UAS-hang, hang^{AE10}; +; dnc^{RMRA}-GAL4, tub-GAL80$ Fliegen mit und ohne Hitzeschock sind nicht signifikant unterschiedlich zueinander (MET1: $w^{1118}, UAS-hang, hang^{AE10}; +; dnc^{RMRA}-GAL4, tub-GAL80$ HS-: $21,4 \pm 0,5$; HS+: $21,9 \pm 0,6$; MET2: HS-: $24,0 \pm 0,8$; HS+: $25,8 \pm 0,8$). **B)** Die Werte für die Toleranzentwicklung sind signifikant unterschiedlich zwischen $w^{1118}, UAS-hang, hang^{AE10}; +; dnc^{RMRA}-GAL4, tub-GAL80$ ohne Hitzeschock und mit Hitzeschock ($w^{1118}, UAS-hang, hang^{AE10}; +; dnc^{RMRA}-GAL4, tub-GAL80$ HS-: $11,7 \pm 2,1$; HS+: $18,1 \pm 1,6$). Das heißt, der Toleranzphänotyp von $hang^{AE10}$ konnte durch Expression von $hang$ in dnc^{RMRA} spezifischen Zellen verbessert werden. **C)** Der Wert für die MET1 von $w^{1118}, hang^{AE10}; +; dnc^{RMRA}-GAL4, tub-GAL80$ ohne Hitzeschock ist niedriger im Vergleich zu dem Wert mit Hitzeschock (MET1: $w^{1118}, hang^{AE10}; +; dnc^{RMRA}-GAL4, tub-GAL80$ HS-: $24,6 \pm 1,5$; HS+: $31,2 \pm 0,6$; MET2: HS-: $27,0 \pm 0,8$; HS+: $31,4 \pm 1,3$). **D)** Die Kontrollen ohne Hitzeschock zeigen keine höhere Toleranz im Vergleich zu den Kontrollen ohne Hitzeschock ($w^{1118}, hang^{AE10}; +; dnc^{RMRA}-GAL4, tub-GAL80$ HS-: $10,1 \pm 4,0$; HS+: $0,6 \pm 2,8$). Das heißt, der Hitzeschock scheint keinen Einfluss auf die Toleranz zu haben. Die Anzahl der Versuche für Teil A und B ist $N=7$ und für Teil C und D ist $N=3$ und $p^* \leq 0,05$.

3.6.2. Die Expression von dnc mit der $dnc^{RMRA}-GAL4$ Linie rettet nicht die reduzierte Toleranz von $hang^{AE10}$ Mutanten

Folgender Versuch sollte untersuchen, ob die Überexpression von dnc mit der $dnc^{RMRA}-GAL4$ -Linie den Toleranzphänotyp von $hang^{AE10}$ beeinflussen kann. Teil A von Abbildung 3.30 zeigt wieder die Werte für die MET1 und MET2. Die MET1 Werte der einzelnen

Genotypen sind nicht signifikant unterschiedlich zueinander. Aber der MET2 Wert für *dnc*^{RMRA}-GAL4 ist signifikant unterschiedlich zu allen anderen MET2 Werten. In Teil B sind die Werte für die Toleranz der vier Fliegenlinien gezeigt. Sowohl die mutanten Kontrollen als auch die Testgruppe weisen eine signifikant niedrigere Toleranz auf im Vergleich zu der wildtypischen Kontrolle. Das heißt, die Überexpression von *dnc* mithilfe der *dnc*^{RMRA}-GAL4 Linie führt zu keiner Verbesserung des *hang*^{AE10} Mutanten Phänotyps. Dies könnte folgendermaßen erklärt werden: Hangover scheint eine wichtige regulatorische Funktion auf RNA-Ebene auszuführen und hat dabei eine Vielzahl an möglichen Zielgenen, wie das cDNA Microarray Experiment zeigt (Scholz und Klebes, unveröffentlichte Daten). Dabei ist *dunce* nur eines von mehreren Zielgenen das von Hangover reguliert wird. Es ist deshalb nicht überraschend, dass die Expression von *dnc* in der *hang*^{AE10} Mutante nicht zu einer Verbesserung der Toleranz führt. Die *hang*^{AE10} Mutation betrifft wahrscheinlich auch die Regulation anderer Gene.

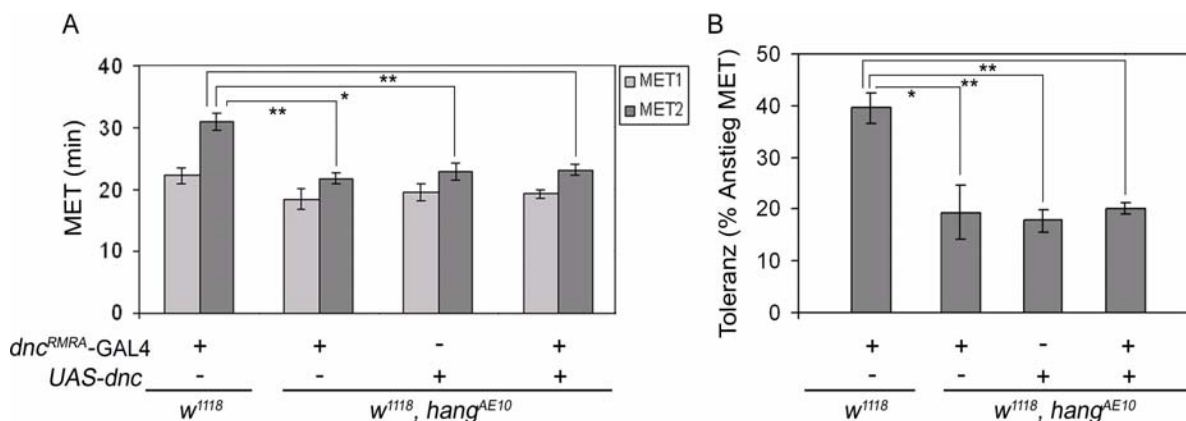


Abb. 3.30: Die Überexpression von *dnc* mit *dnc*^{RMRA}-GAL4 führt zu keiner Veränderung des *hang*^{AE10} Toleranzphänotyps.

A) Die MET1 Werte (hellgrau) sind nicht signifikant unterschiedlich zueinander (*w*¹¹¹⁸; +; *dnc*^{RMRA}-GAL4: 22,2 ± 1,3; *w*¹¹¹⁸; *hang*^{AE10}; +; *dnc*^{RMRA}-GAL4: 18,4 ± 1,6; *w*¹¹¹⁸; *hang*^{AE10}; *UAS-dnc*; +; +: 19,4 ± 1,3; *w*¹¹¹⁸; *hang*^{AE10}; *UAS-dnc*; +; +; *dnc*^{RMRA}-GAL4: 19,2 ± 0,7). Der MET2 Wert (dunkelgrau) von *w*¹¹¹⁸; +; *dnc*^{RMRA}-GAL4 unterscheidet sich signifikant zu den drei anderen Genotypen (*w*¹¹¹⁸; +; *dnc*^{RMRA}-GAL4: 30,9 ± 1,3; *w*¹¹¹⁸; *hang*^{AE10}; +; *dnc*^{RMRA}-GAL4: 21,7 ± 0,9; *w*¹¹¹⁸; *hang*^{AE10}; *UAS-dnc*; +; +: 22,8 ± 1,2; *w*¹¹¹⁸; *hang*^{AE10}; *UAS-dnc*; +; +; *dnc*^{RMRA}-GAL4: 23,1 ± 0,9). **B)** Die Toleranz von *w*¹¹¹⁸; +; *dnc*^{RMRA}-GAL4 ist signifikant höher im Vergleich zu den anderen Genotypen (*w*¹¹¹⁸; +; *dnc*^{RMRA}-GAL4: 39,6 ± 2,9; *w*¹¹¹⁸; *hang*^{AE10}; +; *dnc*^{RMRA}-GAL4: 19,4 ± 5,1; *w*¹¹¹⁸; *hang*^{AE10}; *UAS-dnc*; +; +: 17,7 ± 2,1; *w*¹¹¹⁸; *hang*^{AE10}; *UAS-dnc*; +; +; *dnc*^{RMRA}-GAL4: 20,0 ± 1,1). Die Toleranz der Testgruppe ist nicht höher im Vergleich zu den mutanten Kontrollen. Die Expression von *dnc* im *hang*^{AE10} Hintergrund in *dnc*^{RMRA} spezifischen Zellen kann den *hang*^{AE10} Phänotyp nicht retten. Die Anzahl der Versuch beträgt N=4 und $p^* \leq 0,016$, $p^{**} \leq 0,003$.

3.6.3. Komplementationstest von heterozygoten *hang*^{AE10} und *dnc*^{A143} Mutanten

Ein Komplementationstest zeigt, ob zwei rezessive Mutanten, die einen ähnlichen Phänotyp aufweisen, im gleichen Signaltransduktionsweg wirken. Dazu werden beide Mutanten miteinander gekreuzt und die transheterozygoten Nachkommen der F1 Generation getestet. Zeigen diese Fliegen keinen veränderten Phänotyp, so führen die Mutationen zu keinem sichtbaren Verhaltensdefekt, da sie in unterschiedlichen Signalwegen liegen. Verändert sich jedoch der Phänotyp, so spricht dies dafür, dass sie im gleichen Signalweg zu finden sind. Da sich beide Gene auf dem X-Chromosom befinden, wurden in diesem Versuch weibliche Fliegen im Inebriometer getestet. Um Schwankungen in der Toleranzentwicklung aufgrund unterschiedlicher Körpermasse ausschließen zu können, wurden die Weibchen zwei Tage auf beheizten Gläsern gehalten. In Abbildung 3.31 Teil A sind die Werte der MET1 und MET2 für die Testfliegen und deren Kontrollen zu sehen. Die Fliegenlinie *w*¹¹¹⁸ diente dabei als Funktionskontrolle des Inebriometers und wird deshalb auch nicht in die Statistik mit einbezogen.

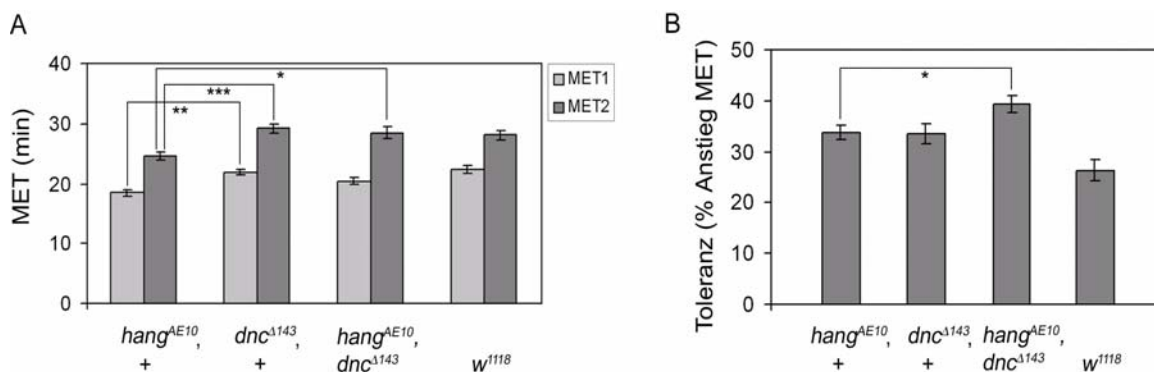


Abb. 3.31: Die *hang*^{AE10}, *dnc*^{A143} transheterozygoten Fliegen zeigen einen veränderten Phänotyp im Vergleich zu den Einzelmutanten.

A) Die Werte der MET1 (hellgrau) sind signifikant unterschiedlich zwischen *hang*^{AE10},+ und *dnc*^{A143},+ und die Werte der MET2 (dunkelgrau) sind signifikant unterschiedlich zwischen *hang*^{AE10},+ und *dnc*^{A143},+ und *hang*^{AE10},+ und der Transheterozygoten (MET1: *hang*^{AE10},+: 18,4 ± 0,6; *dnc*^{A143},+: 21,9 ± 0,5; *hang*^{AE10}, *dnc*^{A143}: 20,4 ± 0,6; *w*¹¹¹⁸: 22,3 ± 0,7), (MET2: *hang*^{AE10},+: 24,6 ± 0,66; *dnc*^{A143},+: 29,2 ± 0,7; *hang*^{AE10}, *dnc*^{A143}: 28,5 ± 1,0; *w*¹¹¹⁸: 28,1 ± 0,7). **B)** Die Toleranz unterscheidet sich signifikant zwischen *hang*^{AE10},+ und der transheterozygoten Fliegenlinie, aber sie unterscheidet sich nicht zwischen *dnc*^{A143},+ und *hang*^{AE10}, *dnc*^{A143} (*hang*^{AE10},+: 33,8 ± 1,5; *dnc*^{A143},+: 33,5 ± 2,0; *hang*^{AE10}, *dnc*^{A143}: 39,4 ± 1,7; *w*¹¹¹⁸: 26,3 ± 2,1). Das heißt, der Phänotyp der transheterozygoten Fliegenlinie ist tendenziell unterschiedlich zu den Einzelmutanten, mit steigender N Zahl würde dies wahrscheinlich signifikant werden. Die Anzahl der Versuche beträgt N=9 und $p^* \leq 0,025$, $p^{**} \leq 0,005$, $p^{***} \leq 0,0005$ (Bonferroni Korrektur von 2).

Die MET1 unterscheidet sich signifikant zwischen der *hang*^{AE10} und *dnc*^{A143} Mutante, aber es ist kein Unterschied zwischen den einzelnen Mutanten und den *hang*^{AE10}, *dnc*^{A143} Fliegen zu erkennen. Die Werte der MET2 sind signifikant unterschiedlich zwischen *hang*^{AE10} und *dnc*^{A143} und zwischen *hang*^{AE10} und den transheterozygoten Fliegen. Die Werte für die Toleranz sind in Teil B gezeigt. Dabei entwickeln die *hang*^{AE10}, *dnc*^{A143} Fliegen signifikant mehr Toleranz im Vergleich zu der *hang*^{AE10} Mutante, aber nicht im Vergleich zur *dnc*^{A143} Mutante. Das Ergebnis zeigt eine tendenzielle Veränderung der Toleranz für die transheterozygoten Fliegen im Vergleich zu den einzelnen Mutanten, jedoch nicht in Form einer reduzierten Toleranz, sondern einer Erhöhung der Toleranz. Der Versuch sollte, aufgrund der unterschiedlichen MET1 zwischen *hang*^{AE10} und *dnc*^{A143} Mutante, nochmals mit einheitlicher erster Ethanolgabe in Falcon-Röhrchen wiederholt werden.

3.6.4. *dnc*^{A143} und *hang*^{AE10} Fliegen haben eine unterschiedliche Kinetik in der Toleranzentwicklung

Die Entwicklung von Toleranz nach einmaliger Alkoholgabe, ist noch nach 24 Stunden nachweisbar. Sie verläuft in zwei Phasen. In der ersten Phase sinkt die Toleranz, nachdem sie nach zwei Stunden ihr Maximum zeigt, schnell ab. Nach vier Stunden sind noch ca. 40% Toleranz vorhanden. In der anschließenden zweiten Phase verringern sich die Toleranzwerte dann langsamer, bis nach 36 Stunden keine Toleranz mehr nachgewiesen werden kann (Scholz *et al.*, 2000). In dem folgenden Versuch soll die Kinetik der Toleranzentwicklung für *dnc*^{A143} und *hang*^{AE10} untersucht werden. Dazu wurden die Fliegen das erste Mal im Inebriometer mit Ethanol begast und anschließend nach unterschiedlichen Zeitintervallen erneut im Inebriometer gemessen. Die Ausnüchterungsphase erstreckte sich über zwei, vier und 16 Stunden. In Abbildung 3.32 sind die MET1, MET2 und die Toleranz Werte der verschiedenen Zeitpunkte für *dnc*^{A143} und Kontrolle dargestellt. Der MET1 (2h) Wert von *dnc*^{A143} ist signifikant höher im Vergleich zur Kontrolle. Dies hat jedoch auf die Toleranzentwicklung keinen Einfluss, da die Mutante mehr Ethanol aufgenommen hat und trotzdem eine reduzierte Toleranz aufweist (Abb. 3.32 B). Die anderen MET Werte sind nicht unterschiedlich zueinander. Teil B zeigt die entwickelte Toleranz der zwei Genotypen zu den unterschiedlichen Zeitpunkten. Nach zwei Stunden zeigt die *dnc*^{A143} Mutante eine hoch signifikant, nach vier Stunden nur noch eine leicht signifikant reduzierte Toleranz gegenüber der Kontrolle. Nach 16 Stunden ist kein Unterschied in der Toleranzentwicklung zwischen Kontrolle und Mutante zu erkennen. Dies deutet darauf hin, dass in der *dnc*^{A143} Mutante die erste Phase der Toleranzentwicklung defekt ist.

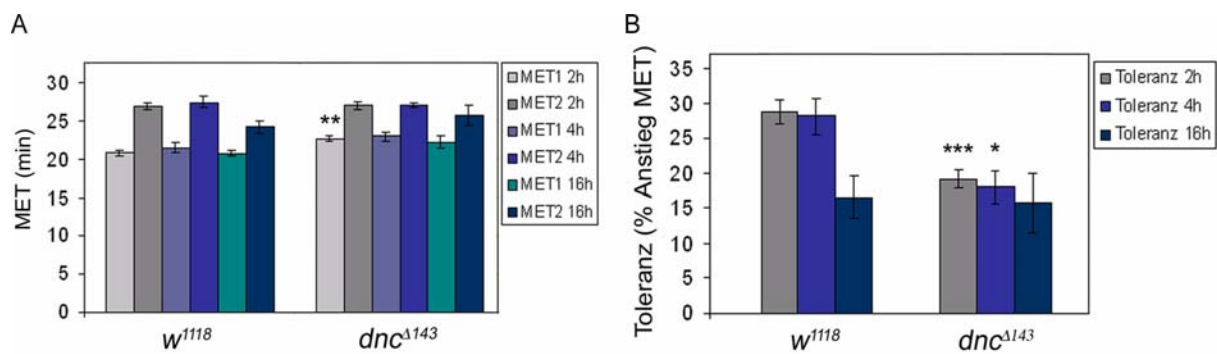


Abb. 3.32: **Kinetik der Toleranzentwicklung in der *dnc^{A143}* Mutante**

A) Der MET1 Wert nach zwei Stunden ist signifikant unterschiedlich zwischen Mutante und Kontrolle, alle anderen MET1 und MET2 Werte sind nicht unterschiedlich zueinander (**2 Stunden:** MET1 *w¹¹¹⁸*: 20,7 ± 0,5; MET1 *dnc^{A143}*: 22,6 ± 0,3; MET2 *w¹¹¹⁸*: 26,9 ± 0,4; MET2 *dnc^{A143}*: 27,0 ± 0,5; **4 Stunden:** MET1 *w¹¹¹⁸*: 21,5 ± 0,7; MET1 *dnc^{A143}*: 22,9 ± 0,6; MET2 *w¹¹¹⁸*: 27,4 ± 0,7; MET2 *dnc^{A143}*: 27,0 ± 0,3; **16 Stunden:** MET1 *w¹¹¹⁸*: 20,7 ± 0,5; MET1 *dnc^{A143}*: 22,2 ± 0,8; MET2 *w¹¹¹⁸*: 24,1 ± 0,9; MET2 *dnc^{A143}*: 25,7 ± 1,4). **B)** Die Werte der Toleranz nach zwei Stunden sind hoch signifikant unterschiedlich, nach vier Stunden leicht signifikant unterschiedlich und nach 16 Stunden nicht mehr signifikant unterschiedlich zwischen Mutante und Kontrolle (**2 Stunden:** *w¹¹¹⁸*: 28,8 ± 1,8; *dnc^{A143}*: 19,1 ± 1,4; **4 Stunden:** *w¹¹¹⁸*: 28,1 ± 2,7; *dnc^{A143}*: 17,9 ± 2,4; **16 Stunden:** *w¹¹¹⁸*: 16,5 ± 3,1; *dnc^{A143}*: 15,8 ± 4,2). Die Anzahl der Versuche beträgt für zwei Stunden N=11, für vier Stunden N=7 und für 16 Stunden N=12, $p^* \leq 0,05$, $p^{**} \leq 0,01$, $p^{***} \leq 0,001$.

In Abbildung 3.33 ist die Kinetik der Toleranzentwicklung für die *hang^{AE10}* Mutante dargestellt. Teil A zeigt wieder die Werte der MET1 und MET2 für beide Fliegenlinien zu verschiedenen Zeitpunkten. Hier fällt auf, dass sowohl MET1 als auch MET2 von *hang^{AE10}* zu jedem Zeitpunkt signifikant reduziert sind im Vergleich zur Kontrolle. Das heißt, die *hang^{AE10}* Mutanten zeigen hier eine erhöhte Ethanol sensitivität. Auch die Werte für die Toleranz in Teil B sind zu jedem Zeitpunkt signifikant niedriger im Vergleich zur Kontrolle. Das würde bedeuten, dass bei der *hang^{AE10}* Mutante sowohl die langfristige als auch die kurzfristige Komponente der Toleranzentwicklung betroffen ist. Falls aber die beiden Komponenten schon nach der ersten Exposition mit Ethanol festgelegt werden, könnte es auch sein, dass nur die langfristige Komponente betroffen ist, da nach 16 Stunden nur noch die Langzeitkomponente gemessen werden kann und diese in den *hang^{AE10}* Tieren nicht mehr vorhanden ist. Allerdings kann bei diesem Versuch nicht genau bestimmt werden, ob die reduzierte Toleranz durch die *hang* Mutation verursacht wird, oder die Fliegen aufgrund einer geringeren MET1 weniger Toleranz entwickeln konnten. Um eine genauere Aussage treffen zu können, müsste den beiden Genotypen in Falcon-Röhrchen eine konstante Alkoholgabe von 20 Minuten verabreicht werden und die Werte der MET2 erneut gemessen werden.

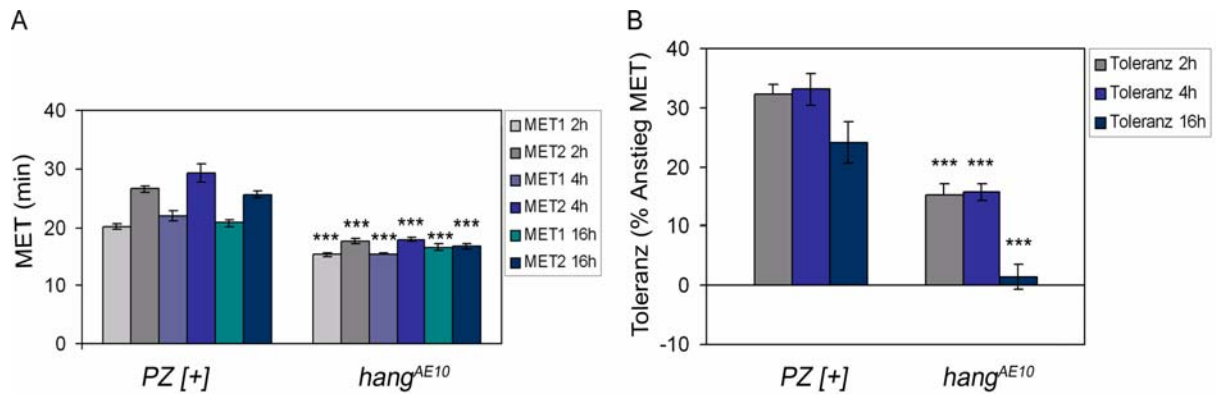


Abb.3.33: **Kinetik der Toleranzentwicklung der *hang^{AE10}* Mutante**

A) Alle Werte der MET1 und MET2 von *hang^{AE10}* sind signifikant niedriger im Vergleich zur Kontrolle (**2 Stunden:** MET1 PZ[+]: 20,1 ± 0,5; MET1 *hang^{AE10}*: 15,4 ± 0,3; MET2 PZ[+]: 26,6 ± 0,5; MET2 *hang^{AE10}*: 17,7 ± 0,4; **4 Stunden:** MET1 PZ[+]: 22,0 ± 0,9; MET1 *hang^{AE10}*: 15,5 ± 0,2; MET2 PZ[+]: 29,3 ± 1,6; MET2: *hang^{AE10}*: 17,9 ± 0,3; **16 Stunden:** MET1 PZ[+]: 20,7 ± 0,6; MET1 *hang^{AE10}*: 16,6 ± 0,5; MET2 PZ[+]: 25,6 ± 0,5; MET2 *hang^{AE10}*: 16,8 ± 0,4). **B)** Die Werte für die Toleranzentwicklung sind für alle drei Zeitpunkte signifikant niedriger für *hang^{AE10}* im Vergleich zur Kontrolle (**2 Stunden:** PZ[+]: 32,2 ± 1,7; *hang^{AE10}*: 15,2 ± 1,9; **4 Stunden:** PZ[+]: 33,2 ± 2,7; *hang^{AE10}*: 15,8 ± 1,5; **16 Stunden:** PZ[+]: 24,1 ± 3,5; *hang^{AE10}*: 1,5 ± 2,2). Die Anzahl der Versuche beträgt für zwei Stunden N=11, für vier Stunden N=5 und für 16 Stunden N=7 und $p^* \leq 0,05$, $p^{**} \leq 0,01$ und $p^{***} \leq 0,001$.

3.6.5. Die Mutanten *dnc¹* und *dnc^{A143}* haben Defekte im olfaktorischen Kurzzeitgedächtnis

Schon 1976 wurde *dnc¹* als Lernmutante identifiziert (Dudai *et al.*, 1976). Die molekulargenetische Grundlage dieser Mutante ist jedoch nicht bekannt. Bei der *dnc^{A143}* Mutante ist die Größe und der Ort der Deletion genau bekannt; sie betrifft die Transkriptgruppe 3. Für diese Gruppe wurde vorgeschlagen, dass sie eine Funktion im Initialen Lernen hat (Qiu *et al.*, 1993). Deshalb wurde das olfaktorische Kurzzeitgedächtnis der *dnc^{A143}* Mutante untersucht. Dazu wurde eine Tully/ Quinn Maschine in leicht veränderter Form verwendet (Schwärzel *et al.*, 2002). In diesem Verhaltensparadigma wird olfaktorisches Vermeidungslernen untersucht (siehe 2.15.3). Dabei wurden die Düfte 4-Methylcyclohexanol (1:80) und 3-Octanol (1:100) verwendet. In Abbildung 3.34 Teil A ist das olfaktorische Gedächtnis für *dnc¹* und *Canton S* (Kontrolle) gezeigt. Die *dnc¹* Fliegen zeigen nach zwei, 30 und 180 Minuten ein signifikant schlechteres Gedächtnis im Vergleich zur Kontrolle.

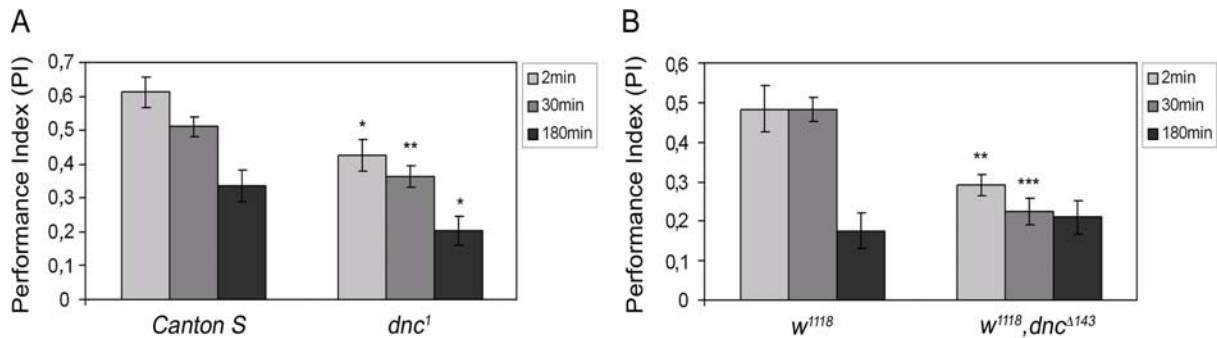


Abb. 3.34: *dnc*¹ und *dnc*^{A143} zeigen eine schlechtere Kurzzeitgedächtnisfunktion im Vergleich zu ihren Kontrollen.

A) Die *dnc*¹ Mutante zeigt nach 2 Minuten, 30 Minuten und 180 Minuten ein signifikant schlechteres Gedächtnis als ihre Kontrolle *Canton S* (**PI 2min:** *Canton S*: 0,61 ± 0,05; *dnc*¹: 0,43 ± 0,05; **PI 30min:** *Canton S*: 0,51 ± 0,03; *dnc*¹: 0,36 ± 0,03; **PI 180min:** *Canton S*: 0,34 ± 0,05; *dnc*¹: 0,20 ± 0,04). **B)** Die *dnc*^{A143} Mutante hat nach 2 Minuten und 30 Minuten ein signifikant schlechteres Gedächtnis im Vergleich zu ihrer Kontrolle *w*¹¹¹⁸ (**PI 2min:** *w*¹¹¹⁸: 0,48 ± 0,06; *dnc*^{A143}: 0,29 ± 0,03; **PI 30min:** *w*¹¹¹⁸: 0,48 ± 0,03; *dnc*^{A143}: 0,22 ± 0,03 **PI 180min:** *w*¹¹¹⁸: 0,18 ± 0,04; *dnc*^{A143}: 0,21 ± 0,04). Die Anzahl der Versuche beträgt für das zwei Minuten Gedächtnis N=9, für das 30 Minuten Gedächtnis N=11 und für das 180 Minuten Gedächtnis N=15. Der Duft 4-Methylcyclohexanol wurde 1:80 verdünnt, der Duft 3-Octanol wurde 1:100 verdünnt. Die Elektroschocks wurden mit einer Stärke von 90 Volt verabreicht. Die Signifikanzgrenze liegt bei $p^* \leq 0,05$, $p^{**} \leq 0,01$, $p^{***} \leq 0,001$.

Am größten ist der Unterschied nach 30 Minuten. In Abb. 3.34 B ist das olfaktorische Kurzzeitgedächtnis von *dnc*^{A143} und *w*¹¹¹⁸ (Kontrolle) dargestellt. Die *dnc*^{A143} Mutante zeigt nach zwei und 30 Minuten ein signifikant schlechteres Gedächtnis im Vergleich zur Kontrolle. Nach 180 Minuten ist jedoch kein Unterschied mehr zwischen der Kontrolle und der Mutante zu messen. Das bedeutet, der Defekt in der *dnc*^{A143} Mutante betrifft die initiale Lern- bzw. Gedächtnisbildung im Bereich von 2 bis zu 30 Minuten, das so genannte Kurzzeitgedächtnis. Bei der *dnc*¹ Mutante scheint der Defekt noch eine weitere Komponente, das mittelfristige Gedächtnis, mit einzuschließen. Diese Effekte sind nicht auf eine unterschiedliche Schock- bzw. Duftwahrnehmung zurückzuführen, denn sowohl Schock- als auch Duftvermeidung sind nicht signifikant unterschiedlich zwischen den Mutanten und ihren Kontrollen (Abb. 3.35 A-C).

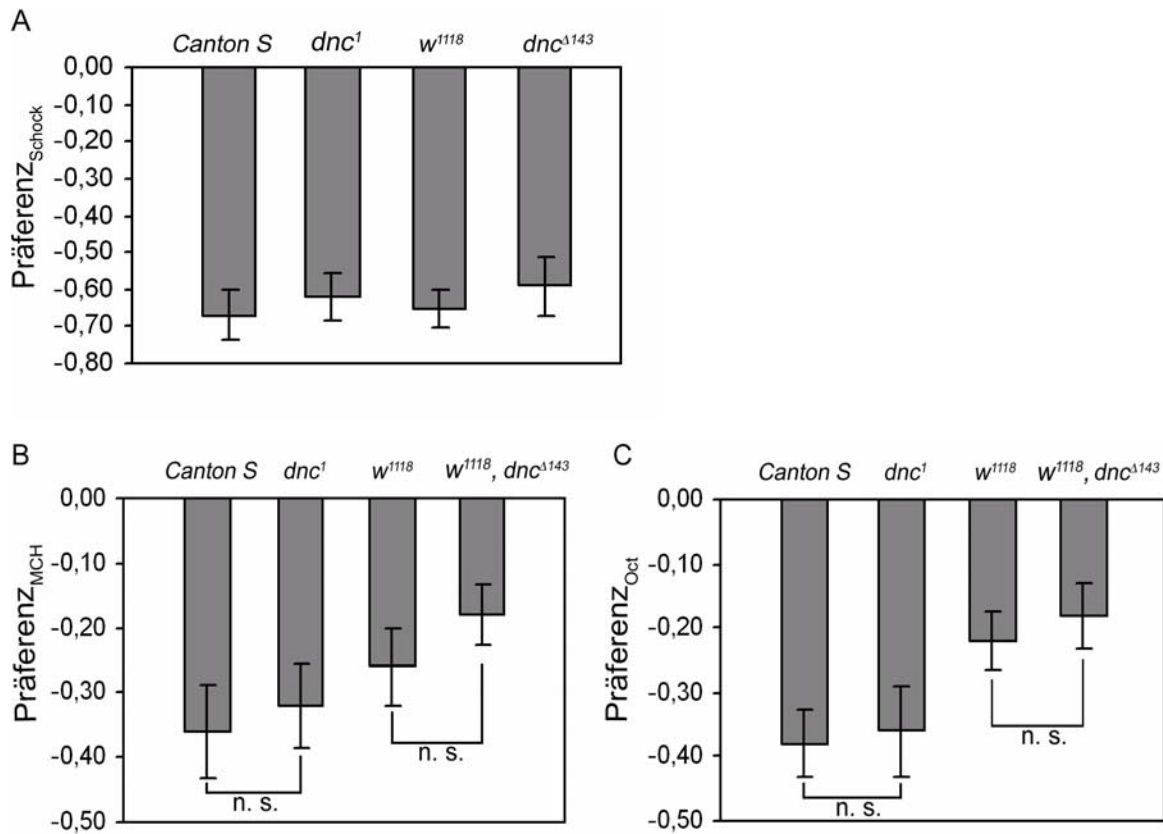


Abb. 3.35: Es gibt keine unterschiedliche Duft- bzw. Schockwahrnehmung zwischen den getesteten Mutanten und ihren Kontrollen.

A) Die Schockwahrnehmung von 90 Volt zeigt keine signifikanten Unterschiede zwischen *Canton S* und *dnc*¹ und zwischen *w*¹¹¹⁸ und *dnc*^{Δ143} (*Canton S*: -0,67 ± 0,07; *dnc*¹: -0,62 ± 0,06; *w*¹¹¹⁸: -0,65 ± 0,05; *dnc*^{Δ143}: -0,59 ± 0,08). **B und C)** Auch die Duftwahrnehmung von 4-Methylcyclohexanol (1:80) (B) bzw. 3-Octanol (1:100) (C) ist nicht signifikant unterschiedlich zwischen *Canton S* und *dnc*¹ und zwischen *w*¹¹¹⁸ und *dnc*^{Δ143} (*Canton S*: -0,36 ± 0,07 (B), -0,38 ± 0,05 (C); *dnc*¹: -0,32 ± 0,06 (B), -0,36 ± 0,07 (C); *w*¹¹¹⁸: -0,26 ± 0,06 (B), -0,22 ± 0,05 (C); *dnc*^{Δ143}: -0,18 ± 0,05 (B), -0,18 ± 0,05 (C)). Die Anzahl der Versuche beträgt für Teil A: N=9, Teil B: N=11 und Teil C: N=11.

3.6.6. Die *hang*^{AE10} Mutante hat keinen Defekt im olfaktorischen Kurzzeitgedächtnis

Da *hang*^{AE10} und *dnc*^{Δ143} ähnliche Phänotypen im Ethanol-induzierten Verhalten zeigen, wurde auch die *hang*^{AE10} Mutante auf Defekte im olfaktorischen Kurzzeitgedächtnis hin untersucht. Dabei zeigt die *hang*^{AE10} Mutante im zwei Minuten Kurzzeitgedächtnis keinen unterschiedlichen Performance Index (PI) im Vergleich zu ihrer Kontrolle *w*¹¹¹⁸. Das bedeutet, Hangover ist nicht an der Kurzzeitgedächtnisbildung beteiligt, im Gegensatz zu Duncce. Die beiden Proteine agieren hier in unterschiedlichen Signalwegen. Es fällt jedoch auf, dass die *w*¹¹¹⁸ Fliegen in diesem Versuch insgesamt einen geringeren PI-Wert aufweisen im Vergleich zu der *w*¹¹¹⁸ Kontrolle in Abbildung 3.34 B. Der PI-Wert in diesem Versuch ist

fast so niedrig, wie der PI-Wert von dnc^{A143} in Abbildung 3.34 B. Dies könnte darauf zurückgeführt werden, dass in dem Versuch 3.34 B eine andere Verdünnung für 4-Methylcyclohexanol (1:80) verwendet wurde, als in diesem Versuch (1:300).

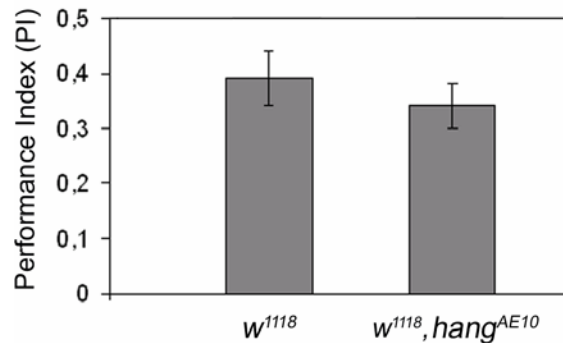


Abb. 3.36: Die $hang^{AE10}$ Mutante entwickelt ein wildtypisches olfaktorisches Kurzzeitgedächtnis.

Der Performance Index für das zwei Minuten Kurzzeitgedächtnis ist zwischen w^{1118} und $w^{1118}, hang^{AE10}$ nicht signifikant unterschiedlich. Der PI-Wert für w^{1118} ist $0,39 \pm 0,05$ und für $w^{1118}, hang^{AE10}$ beträgt er $0,34 \pm 0,04$. Der Verdünnungsfaktor für 4-Methylcyclohexanol ist 1:300 und für 3-Octanol 1:100. Die Stärke der Elektroschocks beträgt 90 Volt. Die Fehlerbalken repräsentieren Standardfehler (SEM). Die Anzahl der Versuche beträgt $N=10$ und $p^* \leq 0,05$.

Die Verdünnung für MCH beträgt hier 1:300. Die unterschiedliche Verdünnung wurde gewählt, um eine gleiche Duftpräferenz von w^{1118} und $w^{1118}, hang^{AE10}$ zu erreichen. Die Daten für die Schockpräferenz und die Duftpräferenzen sind in Abbildung 3.37 A-C dargestellt. Weder bei der Schock- noch bei der Duftwahrnehmung verhalten sich Kontrolle und Mutante unterschiedlich zueinander. Dies bedeutet, dass ihr Lern- bzw Gedächtnisverhalten nicht von einer unterschiedlichen Duft bzw. Schockwahrnehmung beeinflusst wird.

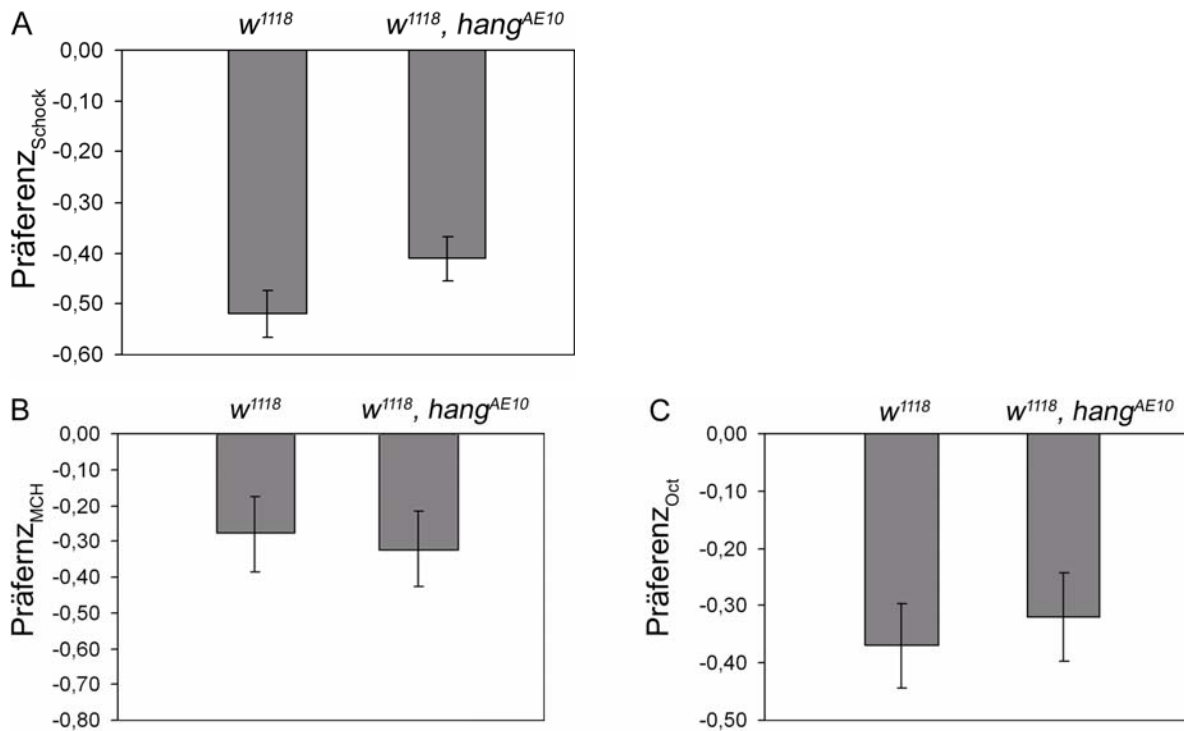


Abb. 3.37: Es gibt keine unterschiedliche Schock- bzw. Duftwahrnehmung zwischen *w¹¹¹⁸* und *hang^{AE10}* Fliegen.

A) Die Vermeidung der Elektroschocks bei 90 Volt ist nicht signifikant unterschiedlich zwischen *w¹¹¹⁸* und *hang^{AE10}* (*w¹¹¹⁸*: $-0,52 \pm 0,05$; *hang^{AE10}*: $-0,41 \pm 0,04$). B) Die Wahrnehmung von 4-Methycyclohexanol (1:300) ist für *w¹¹¹⁸* und *hang^{AE10}* nicht unterschiedlich (*w¹¹¹⁸*: $-0,29 \pm 0,08$; *hang^{AE10}*: $-0,33 \pm 0,08$). C) Auch für die Duftwahrnehmung von 3-Octanol (1:100) zeigt die *hang^{AE10}* Mutante keine Defekte im Vergleich mit ihrer Kontrolle (*w¹¹¹⁸*: $-0,37 \pm 0,07$; *hang^{AE10}*: $-0,32 \pm 0,08$). Die Fehlerbalken repräsentieren Standardfehler (SEM). Die Anzahl der Versuche beträgt für die Schockwahrnehmung N=8, für die 4-MCH Wahrnehmung N=12, für die 3-Octanol Wahrnehmung N=12 und die Signifikanzgrenze liegt bei $p^* \leq 0,05$.

3.6.7. Die Expression von *dnc* mit der *dnc^{RMRA}*-GAL4 Linie rettet scheinbar nicht den olfaktorischen Kurzzeitgedächtnisdefekt von *dnc^{A143}* Mutanten

Der Ethanoltoleranzphänotyp der *dnc^{A143}* Mutante konnte durch die Expression von *dnc* in *dnc^{RMRA}* spezifischen Zellen gerettet werden (Abb. 3.21). Nun sollte überprüft werden, ob die gleichen Gruppen von Neuronen auch die Defekte im olfaktorischen Kurzzeitgedächtnis retten können. Dazu wurde *dnc* mithilfe der *dnc^{RMRA}*-GAL4-Linie im *dnc^{A143}* Hintergrund exprimiert und diese Fliegen dann auf die Entwicklung eines zwei Minuten Kurzzeitgedächtnis untersucht. Abbildung 3.38 zeigt, dass die Testfliegen ein signifikant schlechteres Gedächtnis aufweisen im Vergleich zu der Wildtypkontrolle, aber nicht signifikant unterschiedlich sind zu den mutanten Kontrollen.

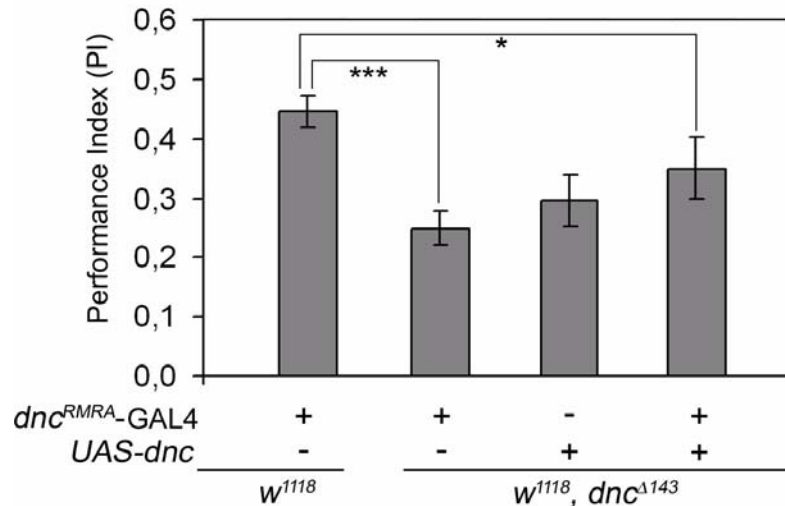


Abb. 3.38: **Die Expression von dnc mithilfe der dnc^{RMRA} -GAL-Linie rettet nicht den olfaktorischen Kurzzeitgedächtnisdefekt der dnc^{A143} Mutante.**

Die Testfliegen haben ein signifikant schlechteres Gedächtnis im Vergleich zu der wildtypischen Kontrolle $w^{1118};+;dnc^{RMRA}$ -GAL4. Sie sind jedoch nicht signifikant unterschiedlich zu den Kontrollen $w^{1118}, dnc^{A143};+;dnc^{RMRA}$ -GAL4 und $w^{1118}, dnc^{A143}, UAS-dnc;+;+$. Da es sich bei diesen Kontrollen um Mutanten handelt, bedeutet das Ergebnis der Testfliegen, dass der Phänotyp der dnc^{A143} Mutante nicht gerettet werden kann. (PI: $w^{1118};+;dnc^{RMRA}$ -GAL4: 0,45 ± 0,03; $w^{1118}, dnc^{A143};+;dnc^{RMRA}$ -GAL4: 0,25 ± 0,03; $w^{1118}, dnc^{A143}, UAS-dnc;+;+$: 0,30 ± 0,04; $w^{1118}, dnc^{A143}, UAS-dnc;+;dnc^{RMRA}$ -GAL4: 0,35 ± 0,05). Die Verdünnung für 4-Methylcyclohexanol ist 1:80 und für 3-Octanol 1:100. Die Stärke der Elektroschocks beträgt 90 Volt. Die Anzahl der Versuche beträgt N=12 und $p^* \leq 0,016$, $p^{***} \leq 0,0003$ (Bonferroni Korrektur von 3).

Das heißt, der Gedächtnisphänotyp der dnc^{A143} Mutante kann anscheinend nicht durch Expression von dnc in dnc^{RMRA} Zellen gerettet werden. Wenn man allerdings die Schock- und Duftwahrnehmung der einzelnen Genotypen betrachtet (Abb. 3.39 A-C) so fällt auf, dass der Schock von 90 Volt und die Wahrnehmung von 3-Octanol (1:100) bei allen Genotypen gleich ist, nicht jedoch die Duftwahrnehmung für 4-Methylcyclohexanol (1:80). Diese unterscheidet sich signifikant zwischen $w^{1118}, dnc^{A143};+;dnc^{RMRA}$ -GAL4, $w^{1118}, dnc^{A143}, UAS-dnc;+;+$ und $w^{1118}, dnc^{A143}, UAS-dnc;+;dnc^{RMRA}$ -GAL4. Für einen aussagekräftigen Rettungsversuch müsste jedoch die Duftwahrnehmung für alle Genotypen gleich sein, andernfalls könnte dieser Unterschied das Lernverhalten der Fliegen beeinflussen und zu einem anderen Ergebnis führen.

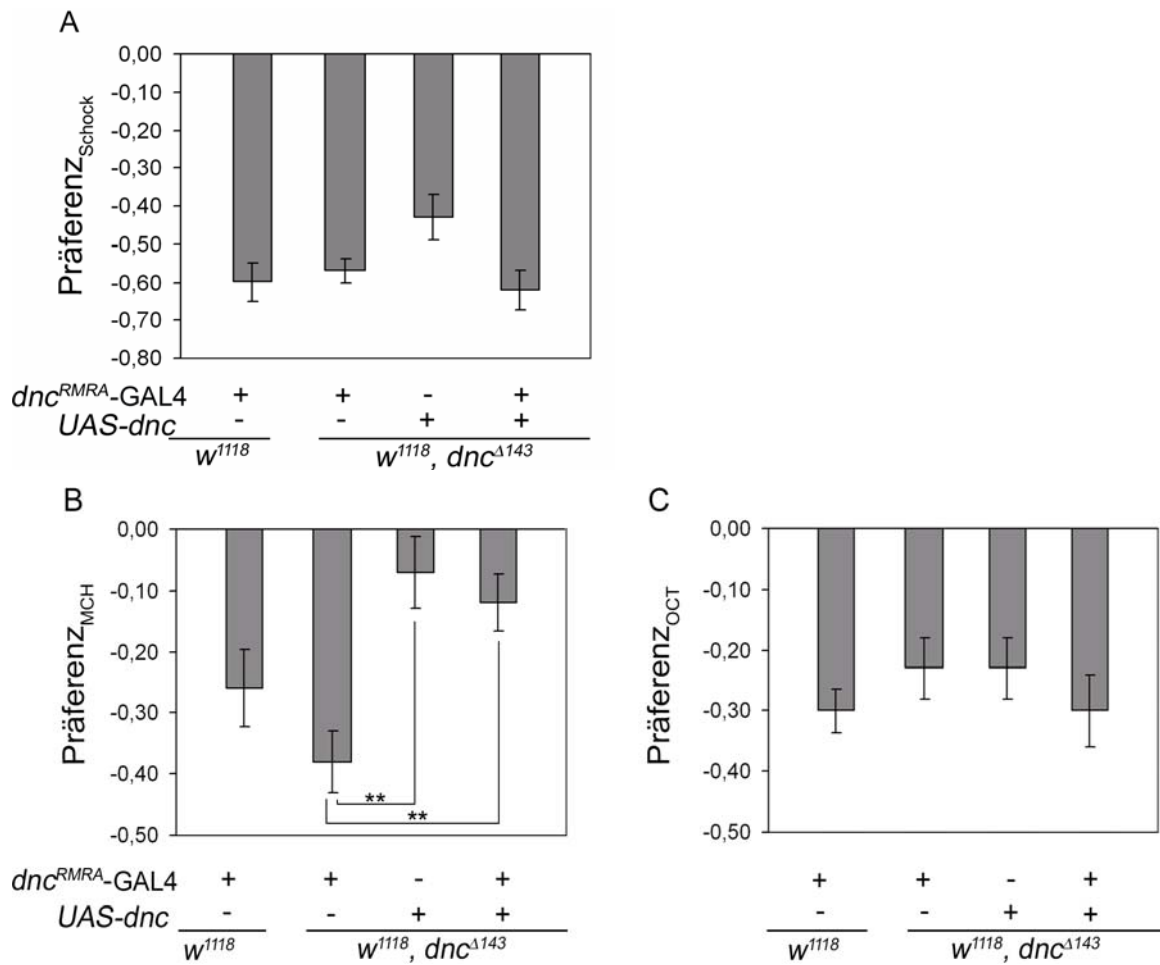


Abb. 3.39: Die Test- und Kontrollfliegen zeigen eine unterschiedliche 4-MCH Duftwahrnehmung

A) Die Vermeidung der Elektroschocks bei 90 Volt ist nicht signifikant unterschiedlich zwischen den einzelnen Genotypen ($w^{1118}; +; dnc^{RMRA}\text{-GAL4}; +; UAS\text{-}dnc; -$: $-0,6 \pm 0,05$; $w^{1118}, dnc^{A143}; +; dnc^{RMRA}\text{-GAL4}; +; UAS\text{-}dnc; -$: $-0,57 \pm 0,03$; $w^{1118}, dnc^{A143}; +; dnc^{RMRA}\text{-GAL4}; -; UAS\text{-}dnc; +$: $-0,43 \pm 0,06$; $w^{1118}, dnc^{A143}; +; dnc^{RMRA}\text{-GAL4}; +; UAS\text{-}dnc; +$: $-0,62 \pm 0,05$). **B)** Die Wahrnehmung von 4-Methycyclohexanol (1:80) ist für $w^{1118}, dnc^{A143}; +; dnc^{RMRA}\text{-GAL4}; +; UAS\text{-}dnc; -$ und $w^{1118}, dnc^{A143}; +; dnc^{RMRA}\text{-GAL4}; -; UAS\text{-}dnc; +$ signifikant unterschiedlich ($w^{1118}; +; dnc^{RMRA}\text{-GAL4}; +; UAS\text{-}dnc; -$: $-0,26 \pm 0,06$; $w^{1118}, dnc^{A143}; +; dnc^{RMRA}\text{-GAL4}; +; UAS\text{-}dnc; -$: $-0,38 \pm 0,05$; $w^{1118}, dnc^{A143}; +; dnc^{RMRA}\text{-GAL4}; -; UAS\text{-}dnc; +$: $-0,07 \pm 0,06$; $w^{1118}, dnc^{A143}; +; dnc^{RMRA}\text{-GAL4}; +; UAS\text{-}dnc; +$: $-0,12 \pm 0,05$). **C)** Für die Duftwahrnehmung von 3-Octanol (1:100) zeigen die einzelnen Genotypen keine signifikanten Unterschiede zueinander ($w^{1118}; +; dnc^{RMRA}\text{-GAL4}; +; UAS\text{-}dnc; -$: $-0,30 \pm 0,04$; $w^{1118}, dnc^{A143}; +; dnc^{RMRA}\text{-GAL4}; +; UAS\text{-}dnc; -$: $-0,23 \pm 0,05$; $w^{1118}, dnc^{A143}; +; dnc^{RMRA}\text{-GAL4}; -; UAS\text{-}dnc; +$: $-0,23 \pm 0,05$; $w^{1118}, dnc^{A143}; +; dnc^{RMRA}\text{-GAL4}; +; UAS\text{-}dnc; +$: $-0,3 \pm 0,06$). Die Signifikanzgrenze liegt bei $p^{**} \leq 0,003$ (Bonferroni Korrektur von 3). Die Anzahl der Versuche beträgt für die Schockwahrnehmung $N=12$, für die 4-MCH Wahrnehmung $N=12$ und für die 3-Octanol Wahrnehmung $N=12$.

Für eine genauere Aussage müssen gleiche Bedingungen in der MCH-Präferenz gefunden werden und anschließend der Rettungsversuch wiederholt werden, da mit dieser unterschiedlichen MCH-Präferenz keine genaue Aussage getroffen werden kann.

4. Diskussion

4.1. HANG ist möglicherweise ein RNA-modifizierendes Protein, das in nukleären Kompartimenten lokalisiert ist.

Das Hangover Protein weist 16 klassische C₂H₂ Zinkfingerdomänen auf, welche vorwiegend bei Transkriptionsfaktoren gefunden werden (Rosenberg *et al.*, 1986). Deshalb wurde zunächst vermutet, dass es sich bei Hangover um einen Transkriptionsfaktor handelt. Der Versuch, Hangover an polytären Chromosomen zu lokalisieren, zeigte jedoch keine Interaktion von HANG mit der DNA bzw. dem Chromatin, im Gegensatz zum Chromatin-bindenden Polycomb (Abb. 3.1). Da es sich bei diesem Versuch um eine ektopische Expression von Hangover handelte und diese nicht unbedingt das wildtypische Verhalten des Proteins widerspiegelt, wäre eine DNA-Bindung von HANG trotzdem denkbar. Der klassische Nachweis für eine eindeutige DNA-Protein Interaktion wäre ein DNA-Footprint Experiment. Dabei könnte eine DNA-Protein Bindung direkt nachgewiesen werden und die genaue DNA-Bindungssequenz identifiziert werden. Der Nachteil dieses Versuches wäre, dass nur die *in vitro* Situation untersucht wird und, dass die Zielgene des Proteins bekannt sein müssen.

Unabhängig davon können die C₂H₂ Zinkfingerproteine zusätzlich zu ihrer DNA Affinität auch RNA- und Protein-Interaktionen aufweisen (Reuter *et al.*, 1990; Joho *et al.*, 1990). Das bekannteste Beispiel für ein RNA- und DNA-bindendes Zinkfingerprotein in dieser Gruppe ist TFIIA aus *Xenopus* Oocyten (Miller *et al.*, 1985). Demnach ist es durchaus möglich, dass HANG mit DNA, RNA und auch Proteinen interagieren kann. Dafür spricht auch die große Anzahl an Zinkfingermotiven, die oft mit der Bindung von verschiedenen Liganden einhergeht (Iuchi, 2001). Außerdem wurde in einem *in vitro* Versuch gezeigt, dass bestimmte HANG Zinkfingerdomänen RNA binden können (Abb. 3.5). Zwei dieser Zinkfingerdomänen gehören der U1-ähnlichen Unterklasse an, die in RNA-modifizierenden Proteinen zu finden sind (Nelissen *et al.*, 1991).

Viele RNA-prozessierende Proteine sind in nukleären Kompartimenten lokalisiert, die ein punktförmiges Muster produzieren (Lamond und Earnshaw, 1998). Die Hangover Expression in neuronalen Zellen des Gehirns zeigt ebenfalls eine punktförmige Verteilung innerhalb des Zellkerns (Abb. 3.3). Dies spricht für eine Lokalisation des Proteins in nukleären

Kompartimenten und für eine mögliche Beteiligung von HANG an RNA-modifizierenden Prozessen. Zur Identifizierung der genauen Funktion von HANG wurden Co-Lokalisationsstudien in Speicheldrüsenzellen durchgeführt (Abb. 3.2). Es zeigte sich, dass HANG keine DNA bindet und auch nicht in den Nukleoli zu finden ist. Eine Interaktion mit Antikörpern, die Proteine des Spleißosoms erkennen, wie z.B. hnRNPs der Klasse A und B und SC 35, war ebenfalls nicht detektierbar (Abb. 3.2). Diese Studien sind jedoch nicht besonders aussagekräftig, weil es sich wiederum um eine ektopische Expression von Hangover handelt. Da die Interaktionspartner nicht in vergleichbarer Menge exprimiert werden, kann dies eine mögliche Interaktion der Proteine einschränken. Deshalb wäre es von Vorteil, weitere Co-Lokalisationsstudien im wildtypischen Gehirn durchzuführen. Kandidaten dafür sind u.a. in Interchromatin Granules (ICG) zu finden, weil in diesen Kompartimenten *small nuclear ribonucleoproteins* (snRNP), *small nuclear RNAs*, Spleißfaktoren und Untereinheiten der RNA-Polymerase II gespeichert werden (Fu und Maniatis, 1990). Die RNA-modifizierenden Proteine in den ICGs liegen als Komplex vor, der in humanen Zellen bis zu 130 Proteine enthalten kann (Rappsilber *et al.*, 2002; Mortillaro *et al.*, 1996; Mintz *et al.*, 1999). Interessant wäre eine Co-Lokalisation mit HANG, da die ICGs keine hnRNPs und keine DNA enthalten (Fakan, 1994). Aufgrund der großen Anzahl an RNA-modifizierenden Proteinen sollte man jedoch die Suche nach möglichen Interaktionspartnern etwas einschränken. HANG wird in den meisten neuronalen Zellen exprimiert und hat u.a. eine wichtige Funktion bei der Entwicklung von neuronaler Plastizität, wie z. B. bei der Boutonbildung an der neuromuskulären Synapse (Schwenkert *et al.*, 2008). Ein guter Kandidat für weitere Co-Lokalisationsstudien mit HANG wäre deshalb das Embryonic Lethal Abnormal Vision (ELAV) Protein. Denn dieses Protein besitzt ebenfalls neuronale Funktion und wird in nukleären Domänen exprimiert. Es ist in den sog. Cajal bodies zu finden (Robinow und White, 1991; Yannoni und White, 1997) und ist für die negative Regulierung der 3' mRNA Prozessierung und die korrekte neuronale Entwicklung verantwortlich (Soller und White, 2003). Larven in denen gleichzeitig *hang* und *elav* mit der *D42-GAL4* Linie überexprimiert werden, zeigen Abnormalitäten in der Entwicklung von Speicheldrüsen (Daten nicht gezeigt). Dies deutet auf eine Interaktion der beiden Proteine hin. Eine Co-Lokalisation der beiden Proteine würde einen Hinweis geben, in welchen RNA regulierenden Prozess HANG involviert ist.

4.2. cAMP hat eine wichtige Funktion im Ethanol-induzierten Verhalten

In Nagern und Fliegen wurden verschiedene Gene identifiziert, die in die Regulation von Ethanolsensitivität involviert sind. Dazu gehören auch jene, welche an der Veränderung der cAMP Level beteiligt sind. Im cAMP Signalweg kommt es bei einer G-Protein gekoppelten Aktivierung der Adenylatzyklase zur Produktion von cAMP aus ATP. Die erhöhte cAMP Konzentration führt zur Aktivierung der Proteinkinase A (PKA) und damit zum Eintritt der katalytischen Untereinheit der PKA in den Nukleus. Diese induziert über Phosphorylierung von CREB eine CREB-abhängige Transkription (Review: Bellen, 1998). In *Drosophila* zeigen *rutabaga* Mutanten, die eine verringerte Ca^{2+} /Calmodulin-abhängige Adenylatzyklase Aktivität aufweisen, eine erhöhte Ethanolsensitivität und Fliegen mit einer erhöhten Proteinkinase A Funktion entwickeln eine erhöhte Resistenz gegenüber Ethanol (Moore *et al.*, 1998; Rodan *et al.*, 2002). *Drosophila* Mutanten mit einer defekten regulatorischen Untereinheit von PKA zeigen eine reduzierte Ethanolsensitivität und Mäuse mit fehlender regulatorischer β PKA-Untereinheit eine erhöhte Resistenz gegenüber Ethanol (Park *et al.*, 2000; Thiele *et al.*, 2000). Dass dieses Verhalten auf die veränderten cAMP Level in den Tieren zurückgeführt werden kann, lassen auch *in vitro* Studien vermuten. Dabei verursachen anhaltende Ethanolbehandlungen eine reduzierte cAMP Konzentration in primären zerebralen Neuronen und in N1E-115 Neuroblastoma Zellen (Rabin 1990; Charness *et al.*, 1988).

Ein weiteres Enzym mit entscheidendem Einfluss auf die cAMP Konzentration in *Drosophila* ist die Phosphodiesterase (PDE) Dunce (Davis und Kiger, 1981). Dunce ist das Ortholog zur humanen PDE4 (Houslay und Adams, 2003) und hydrolysiert spezifisch cAMP zu AMP (Davis und Kiger, 1981). In wie weit die cAMP Konzentration Einfluss auf Ethanol-induziertes Verhalten hat, sollte die Manipulation von cAMP in bestimmten Bereichen des Gehirns veranschaulichen. Dafür wurde die *dnc^{RMRA}* Promotor-GAL4 Linie verwendet, die das endogene Expressionsmuster der *dnc^{RMRA}* Transkripte wiedergeben soll. Die GAL4 Linie hat ein breit gefächertes Expressionsmuster, das auch in Teilen des Zentralkomplexes zu finden ist, einem wichtigen Bereich der Ethanoltoleranzentwicklung (Scholz *et al.*, 2000; Urizar *et al.*, 2007). In den folgenden Versuchen wurde sowohl *dunce* als auch *rutabaga* mithilfe der *dnc^{RMRA}*-GAL4 Linie überexprimiert. Bei *dunce* sollte dies zu einer verringerten und bei *rutabaga* zu einer erhöhten cAMP Konzentration in den Tieren führen. Doch weder die Überexpression der Phosphodiesterase, noch die der Adenylatzyklase führte zu einer Veränderung der Sensitivität bzw. Resistenz oder Toleranz gegenüber Ethanol (Abb. 3.26 und Abb. 3.27). Dies lässt folgende Vermutung zu: Eine verstärkte Expression von *Rutabaga* und

die damit erhöhte cAMP Konzentration in der Zelle führt zur Aktivierung von Dunce. Die dabei induzierte Hydrolysereaktion stellt das cAMP Gleichgewicht wieder her und deshalb wird das Ethanol-induzierte Verhalten nicht verändert. Für eine genauere Aussage müsste allerdings die cAMP Konzentration in diesen Fliegen gemessen werden. Eine weitere Erklärung wäre, dass das verwendete *UAS-rutabaga* Transgen nicht funktionell ist oder aber, dass die cAMP Regulation von Rutabaga in den *dnc^{RMRA}* spezifischen Zellen keinen Einfluss auf Ethanol-induziertes Verhalten hat. Die Überexpression von Dunce und die damit erhöhte cAMP Hydrolyse könnte ebenfalls über einen Rückkopplungsprozess zur Aktivierung der Adenylatzyklase führen, welche dann cAMP produziert und somit dessen Konzentration wieder ins Gleichgewicht bringt. Der in Abb. 3.21 beschriebene Rettungsversuch zeigt die Funktionalität des *UAS-dnc* Transgens, so wie die durch Dunce vermittelte cAMP-abhängige Entwicklung von Ethanoltoleranz in *dnc^{RMRA}* spezifischen Neuronen.

Das Gen *pka-c* kodiert für die katalytische Untereinheit der Proteinkinase A, die über cAMP aktiviert wird und dann den Transkriptionsfaktor CREB phosphoryliert. Die Überexpression von *pka-c* in den *dnc^{RMRA}* spezifischen Zellen führt zu einer erhöhten Resistenz der Fliegen gegenüber Ethanol. Das zeigt, dass die Modulierung der cAMP vermittelten Signalverarbeitung zu Veränderungen im Ethanol-induzierten Verhalten führt, wohingegen die Überexpression von einzelnen cAMP regulierenden Proteinen in *dnc^{RMRA}* spezifischen Neuronen nicht ausreicht um eine Verhaltensänderung herbeizuführen.

Die *hang^{AE10}* Mutanten haben eine wichtige Funktion in der Entwicklung von Ethanoltoleranz. Sie zeigen eine normale Ethanolsensitivität, aber eine signifikante Reduktion in der Ethanoltoleranz (Scholz *et al.*, 2005). Der molekulare Prozess, in dem HANG wirkt und der zur Ethanoltoleranz beiträgt, ist jedoch nicht genau bekannt. Mithilfe von möglichen Zielgenen sollte mehr über seine Signalwege und Prozesse herausgefunden werden. In einem cDNA Microarray Experiment wurde *dunce* als putatives Zielgen von HANG isoliert (Scholz und Klebes, unveröffentlichte Daten). Sowohl die *dnc^l* als auch die *dnc^{RM}* Transkriptspezifische *dnc^{A143}* Mutanten zeigen eine reduzierte Ethanoltoleranz, ähnlich dem *hang^{AE10}* Mutanten Phänotyp (Abb. 3.19). Interessanterweise zeigen diese *dnc* Mutanten, im Gegensatz zu anderen Mutanten des cAMP Signalweges, aber genauso wie *hang^{AE10}* Fliegen keine Veränderungen in der Ethanolsensitivität (Moore *et al.*, 1998; diese Arbeit). Dies könnte zum einen damit erklärt werden, dass es in *Drosophila* noch fünf weitere PDEs gibt (Day *et al.*, 2005). Demnach könnten bestimmte PDEs für die Entwicklung von Toleranz zuständig sein und andere PDEs sind für die Sensitivität bzw. Resistenz gegenüber Ethanol verantwortlich.

Eine weitere Erklärung wäre, dass die verschiedenen Isoformen von Duncce unterschiedlich auf Ethanol reagieren. So zeigt die *dnc^{M11}* Mutante eine erhöhte Resistenz gegenüber Ethanol und *dnc^{M14}* eine erhöhte Sensitivität (Scholz, unveröffentlichte Daten). Dies spricht dafür, dass in Duncce mehrere Isoformen in unterschiedlicher Art und Weise am Ethanol-induzierten Verhalten beteiligt sind. Betrachtet man die Proteinstrukturen der einzelnen Isoformen, so fällt auf, dass sie sich durch spezifische N-terminale Bereiche und verschiedene Lokalisationssequenzen, wie z.B. der *nuclear localization sequenz* (NLS) oder der *twin-arginine translocation* (TAT)-Domäne, auszeichnen (Abb. 1.8). Für das humane Homolog PDE4d wurde gezeigt, dass es für bis zu vier verschiedene Isoformen kodiert, die in unterschiedlichen subzellulären Domänen exprimiert werden (Chandrasekaran *et al.*, 2008). Die unterschiedlichen Duncce Isoformen in *Drosophila* könnten demnach für eine unterschiedliche PDE Aktivität oder für eine bestimmte Lokalisation verantwortlich sein und das unterschiedliche Verhalten gegenüber Ethanol erklären.

Die Phänotypen der *hang^{AE10}*, *dnc¹* und *dnc^{A143}* Mutanten sind sehr ähnlich und führen deshalb zu folgender Vermutung: Das Hangover Protein könnte über die Regulation bestimmter *dnc* Transkripte auf den cAMP Signalweg einwirken und so zur Entwicklung von Ethanoltoleranz beitragen. Die Rettung der reduzierten Ethanoltoleranz von *dnc^{A143}* Mutanten und die Verbesserung der verminderten Toleranz in *hang^{AE10}* Fliegen mithilfe der Promotor *dnc^{RMRA}*-GAL4 Linie sprechen ebenfalls für eine Funktion der beiden Proteine in denselben Zellen. Das heißt, möglicherweise wirken Duncce und HANG in derselben Signaltransduktionskaskade.

Die Ergebnisse eines Komplementationstestes können ebenfalls Aufschluss darüber geben, ob zwei Mutanten im selben Signalweg wirken. Im folgenden Versuch wurden heterozygote *dnc^{A143}* bzw. *hang^{AE10}* Weibchen und transheterozygote *dnc^{A143}*, *hang^{AE10}* Fliegen auf die Entwicklung von Ethanoltoleranz getestet. Falls beide Mutanten im selben Signalweg zu finden sind, würde man eine Verstärkung des Phänotyps bei den transheterozygoten *dnc^{A143}*, *hang^{AE10}* Fliegen im Vergleich zu den heterozygoten Mutanten *dnc^{A143}* und *hang^{AE10}* erwarten. Die Ergebnisse dieses Versuchs zeigten zwar eine unterschiedliche Verhaltensantwort, allerdings entwickelten die transheterozygoten Weibchen keine reduzierte sondern eine höhere Toleranz im Vergleich zu der *hang^{AE10}* Einzelmutante. Interessanterweise zeigte ein früheres identisch durchgeführtes Experiment eine tendenziell schlechtere Toleranz der transheterozygoten Fliegen im Vergleich zu den Einzelmutanten. Die Anzahl der Versuche war jedoch zu gering um eine statistische Auswertung durchzuführen (Schneider, 2008). Eine Erklärung für diese widersprüchlichen Ergebnisse ist, dass bei dem Versuch in dieser Arbeit

sowohl die heterozygoten *dnc*^{A143} Mutanten, als auch die transheterozygoten Fliegen eine signifikant höhere MET1 aufweisen im Vergleich zu den heterozygoten *hang*^{AE10} Mutanten. Aufgrund der dosisabhängigen Toleranzentwicklung kann dies zu falschen Toleranzergebnissen führen. Für eine eindeutige Aussage müssten die einzelnen Fliegenlinien mit einer einheitlichen ersten Ethanol dosis noch einmal auf ihre Toleranzentwicklung untersucht werden. Dieses Ergebnis könnte dann mit den Toleranzdaten von heterozygoten *dnc*^{A143}, *hang*^{AE10} Doppelmutanten verglichen werden, denn diese Fliegen sollten normalerweise denselben Phänotyp aufweisen. Wird in beiden Versuchen ein ähnlicher Phänotyp gezeigt, kann eine konkrete Aussage über einen gemeinsamen Signalweg der beiden Mutanten getroffen werden.

4.3. Die zelluläre Stressantwort wird über cAMP Level reguliert

Neben Hitze kann auch Ethanol eine Hitzeschock-ähnliche Antwort in der Zelle auslösen (Neidhardt *et al.*, 1984; David *et al.*, 1987). So zeigen verschiedene Microarray Experimente eine verstärkte Aktivierung von Hitzeschockproteinen (HSP) nach einer Alkoholbehandlung (Lewohl *et al.*, 2000; Guatala *et al.*, 2004; Worst *et al.*, 2005). Die HSPs funktionieren meist als Chaperone, die Zellen vor reaktiven oxigenen Substanzen (ROS) schützen, indem sie Proteine vor der stressbedingten Lipidperoxidation bewahren (Morrow und Tanguay, 2003; Soerensen *et al.*, 2003). Die *hang*^{AE10} Mutante weist sowohl Defekte in der Alkoholtoleranz als auch in der zellulären Stressantwort auf. Crosstoleranzexperimente mit einem Hitzeschock anstelle der ersten Ethanolgabe zeigten, dass in diesen Mutanten die zelluläre Stressantwort, die für die Entwicklung von Ethanol toleranz benötigt wird, beeinträchtigt ist und deshalb keine wildtypische Ethanol toleranz entwickelt werden kann (Scholz *et al.*, 2005). Auch die *dnc*¹ und *dnc*^{A143} Mutanten entwickeln eine reduzierte Crosstoleranz (Abb. 3.20). In verschiedenen Studien wurde gezeigt, dass Veränderungen der cAMP Konzentration und der PDE Aktivität häufig mit zellulärem und oxidativem Stress in Verbindung gebracht werden können. Nach Lungenentzündungen wurden erhöhte Mengen an reaktiven oxigenen Substanzen festgestellt, die mit einer erhöhten PDE4 Aktivität und einer Erniedrigung der cAMP Level in Makrophagen und Epithelzellen einhergeht (Brown *et al.*, 2007). Häufig werden Entzündungen im bronchialen Bereich mit Alkoholismus in Verbindung gebracht (Murray *et al.*, 1998; Tabak *et al.*, 2001). So führt eine anhaltende Ethanol exposition zu einer Aktivierung der PDE4 Aktivität und damit zu einer Reduktion der cAMP Level in bovinen bronchialen Epithelzellen (Forgè *et al.*, 2003). Dies legt nahe, dass der Defekt in der

zellulären Stressantwort in *dnc^l* und *dnc^{A143}* Fliegen direkt und in *hang^{AE10}* Mutanten indirekt über cAMP geregelt wird. In mehreren Untersuchungen wurde jedoch gezeigt, dass eine erhöhte cAMP Konzentration eine entzündungshemmende und damit schützende Wirkung gegenüber ROS hat (Souness *et al.*, 2000; Erdogan *et al.*, 2007; Erdogan *et al.*, 2008). Dies ist widersprüchlich zur reduzierten Crosstoleranz der *dnc^l* Mutante, die eigentlich erhöhte cAMP Werte aufweist (Davis und Kiger, 1981) und damit vor Stress aktivierenden Substanzen geschützt sein müsste. Eine Erklärung für die Defekte in der zellulären Stressantwort, trotz erhöhtem cAMP Spiegel wäre, dass in den *dnc* Mutanten und in der *hang^{AE10}* Mutante die cAMP Konzentration durchgehend erhöht vorliegt und nicht kurzfristig durch äußere Einflüsse induziert wird. Deshalb ist wahrscheinlich auch die PKA chronisch aktiver und kann bei einem zusätzlichen stressauslösenden Reiz zu keiner wirkungsvollen Antwort führen, da die enzymatische Reaktion bereits in der Sättigungsphase liegt. Um eine genauere Aussage über diesen Mechanismus treffen zu können, sollte die Funktion der cAMP Konzentration in den Crosstoleranzexperimenten genauer untersucht werden. Dafür könnte wildtypischen Fliegen der PDE4 Inhibitor Rolipram gefüttert werden, um so kurzfristig erhöhte cAMP Level zu induzieren. Diese Fliegen sollten aufgrund der erhöhten cAMP Level einen verstärkten Schutz gegenüber zellulärem Stress besitzen und eine höhere Toleranz im Vergleich zur Rolipram-negativen Kontrolle aufweisen. Das Ergebnis dieses Versuches könnte somit weitere Hinweise über die Wirkung von cAMP auf die Toleranz und die zelluläre Stressantwort geben.

Mit dem Versuch, die Defekte in der zellulären Stressantwort von *dnc^{A143}* Mutanten mithilfe des *UAS-dnc* Transgens und der *dnc^{RMRA}*-GAL4 Linie zu retten, hätte gezeigt werden können, dass die Reduktion in dieser Mutante von der PDE Funktion in bestimmten Neuronen abhängt. Es kann jedoch keine konkrete Aussage über das Ergebnis gemacht werden, da sich die verwendeten Kontrollen nicht entsprechend verhalten haben (Abb. 3.23). Dies liegt wahrscheinlich daran, dass das GAL4/UAS-System an sich schon anfällig gegenüber Hitze ist. Denn das GAL4 Konstrukt besitzt einen *heat shock protein 70* basal Promotor (Brand und Perrimon, 1993), der durch einen Hitzeschock aktiviert werden kann (Duffy, 2002). Auch das in diesem Versuch verwendete *UAS-dnc* Transgen wird wahrscheinlich durch erhöhte Temperatur aktiviert, wie der Versuch in Abb. 3.24 zeigt. Deshalb ist es nicht möglich Veränderungen zwischen Testgruppe und Kontrollen zu erkennen. Aus diesem Grund kann nicht eindeutig nachgewiesen werden, dass der Defekt in der zellulären Stressantwort in *dnc^{A143}* Fliegen auf den Verlust von *dunce* zurückzuführen ist.

4.4. Ist die reduzierte Ethanoltoleranz in *dnc*^{A143} und *hang*^{AE10} Fliegen auf Defekte im Lernen bzw. Gedächtnis zurückzuführen?

Studien an Nagern legen nahe, dass die Ethanoltoleranzentwicklung mit einer Pavlov'schen Konditionierung einher geht (Kalant *et al.*, 1971; LeBlanc *et al.*, 1975; Wenger *et al.*, 1981; Cole *et al.*, 1999). Dabei scheint eine Konditionierung bei niedrigen Ethanol Dosen notwendig zu sein, um Ethanoltoleranz zu entwickeln, nicht aber bei hohen Ethanolkonzentrationen (Le, Kalant und Khanna, 1987a). In *Drosophila* weisen verschiedene Mutanten sowohl Defekte im Lernen und Gedächtnis, als auch im Ethanol-induzierten Verhalten auf. Gezeigt wurde dies unter anderem für *synapsin* (Godenschwege *et al.*, 2004), *homer* (Urizar *et al.*, 2007) und *fas II* (Moore *et al.*, 1998; Keene und Waddel, 2007). Auffallend ist, dass viele Gene des cAMP-abhängigen PKA Signalweges Defekte im Ethanol-induzierten Verhalten und in der Gedächtnisentwicklung aufweisen, wie z.B. *cheapdate* (Moore *et al.*, 1998; Keene und Waddel, 2007), *rutabaga* und *pka-c1* (Moore *et al.*, 1998; Cheng *et al.*, 2001; Keene und Waddel, 2007).

Auch die Phosphodiesterase *dunce* wurde ursprünglich aufgrund ihrer Lerndefekte identifiziert (Dudai *et al.*, 1976). In späteren Studien zeigte sich, dass die *Dunce* Isoformen *Dnc*^{PA} und *Dnc*^{PM} wahrscheinlich für Initiales Lernverhalten zuständig sind. Wohingegen die Isoformen *Dnc*^{PI}, *Dnc*^{PJ}, *Dnc*^{PK}, *Dnc*^{PC} und *Dnc*^{PD} für einen Teil der PDE Aktivität verantwortlich sind und die Isoformen *Dnc*^{PN}, *Dnc*^{PG}, *Dnc*^{PL} und *Dnc*^{PF} die andere Hälfte der PDE Aktivität und die weibliche Fruchtbarkeit regulieren (Qiu *et al.*, 1993).

In *dnc*^{A143} Mutanten ist das erste Exon, inklusive ATG, von *dnc*^{RM} deletiert (Saratsis, 2006), was zu einer Reduktion der *dnc*^{RMRA} Transkriptionslevel führt (Abb. 3.11). Demnach ist es nicht überraschend, dass in diesen Mutanten das Lernen bzw. Gedächtnis beeinträchtigt ist. Im Tully/ Quinn Paradigma zeigen diese Fliegen Defekte im olfaktorisch-assoziierten Kurzzeitgedächtnis nach zwei und dreißig Minuten (Abb. 3.34). Interessanterweise liegen genau die beiden für das Initiale Lernen verantwortlichen Transkripte in *hang*^{AE10} Mutanten reduziert vor (Abb. 3.7). Dies führte zu der Frage, ob in *dnc*^{A143} Mutanten und damit auch in *hang*^{AE10} Mutanten Defekte im Kurzzeitgedächtnis für die reduzierte Ethanoltoleranz verantwortlich sind. Die *hang*^{AE10} Fliegen entwickeln jedoch kein verändertes zwei Minuten Kurzzeitgedächtnis im Vergleich zu den Kontrollfliegen (Abb. 3.36), ihr Verhalten im Mittelzeit und Langzeitgedächtnis wurden nicht untersucht. Der phänotypische Unterschied im olfaktorischen Kurzzeitgedächtnis zwischen den beiden Mutanten erscheint zunächst widersprüchlich, da eine Regulation von *dunce* durch *HANG* angenommen wird. Mithilfe von

RT-PCR konnte jedoch nicht genau festgestellt werden, ob in der *dnc^{A143}* Mutante eine Restexpression von *dnc^{RM}* vorhanden ist und ob die Expression von *dnc^{RA}* betroffen ist. Genauso konnte nicht herausgefunden werden, in wieweit die Reduktion der beiden Transkripte in der *hang^{AE10}* Mutante unterschiedlich ist. Es ist also durchaus möglich, dass in den *hang^{AE10}* Fliegen die reduzierte Expression von *dnc^{RMRA}* ausreicht, um ein normales Kurzzeitgedächtnis zu entwickeln, ebenso könnte die Funktion von *dnc^{RM}* im Lernverhalten unabhängig von der Rolle in der Toleranzentwicklung sein. Für den letzt genannten Punkt spricht auch das Ergebnis einer Studie, bei der für 52 untersuchten Mutanten keine eindeutige Korrelation zwischen Gedächtnisdefekten und reduzierter Ethanoltoleranz festgestellt werden konnte (Berger *et al.*, 2008). Immunhistochemische Analysen mit einem Dnc^{PM} spezifischen Antikörper könnten Aufschluss über eine Restexpression von *dnc^{RM}* in *dnc^{A143}* Mutanten geben und die Expressionsstärke von *dnc^{RMRA}* in *hang^{AE10}* Mutanten aufzeigen.

Die Entwicklung von Toleranz in *Drosophila* verläuft in zwei Phasen. Die erste Komponente führt nach zwei Stunden zu einem Maximum an Toleranz, welches dann zügig abgebaut wird. Nach ca. vier Stunden beginnt die zweite Komponente, hier verlangsamt sich der Rückgang der Toleranz, bis nach ungefähr 36 Stunden keine Toleranz mehr nachgewiesen werden kann (Scholz *et al.*, 2000). Betrachtet man die Kinetik der Toleranzentwicklung von *dnc^{A143}* und *hang^{AE10}* Mutanten über 16 Stunden (Abb. 3.32 und Abb. 3.33), so fällt auf, dass *dnc^{A143}* Defekte in der ersten Phase der Toleranzentwicklung aufweist und *hang^{AE10}* sowohl in der ersten als auch in der zweiten Phase eine reduzierte Toleranz zeigt. Wenn beide Komponenten der Toleranzentwicklung bereits nach der ersten Ethanolexposition festgelegt werden, dann könnte in den *hang^{AE10}* Fliegen auch nur der zweite Bereich der Toleranzentwicklung betroffen sein. Denn nach 16 Stunden kann nur noch die Langzeitkomponente der Toleranz gemessen werden und diese fehlt in den *hang^{AE10}* Mutanten vollständig. Das bedeutet, dass nur ein Teil der reduzierten Ethanoltoleranz in *hang^{AE10}* Fliegen, aber die gesamte Reduktion der Toleranz in *dnc^{A143}* Mutanten auf Defekte im cAMP vermittelten Signalweg zurückzuführen sind.

Ähnlich wie bei der Toleranzentwicklung gibt es auch verschiedene Gedächtnisphasen. Es gibt das Kurzzeitgedächtnis (STM), das unmittelbar nach dem Training beginnt und nach ca. einer Stunde abklingt, das Mittelzeitgedächtnis (MTM) schließt sich unmittelbar an das Kurzzeitgedächtnis an und erstreckt sich ungefähr über drei Stunden. Außerdem existieren zwei Formen des Langzeitgedächtnisses, die sich genetisch und funktionell unterscheiden. Die eine Art des Langzeitgedächtnis (ARM) entwickelt sich nach extensiven, durchgehendem Training, beinhaltet aber keine Proteinbiosynthese, die andere Form des Langzeitgedächtnis

(LTM) benötigt die Proteinbiosynthese und wird nach kurzzeitigen Unterbrechungen in der Trainingsphase entwickelt. Beide Langzeitgedächtnisformen können noch nach 24 Stunden nachgewiesen werden (Tully *et al.*, 1994; Review: Heisenberg, 2003). Vergleicht man nun die Kinetik der Toleranzentwicklung mit der Gedächtnisentwicklung der *dnc^{A143}* und *hang^{AE10}* Mutanten, so könnte man spekulieren, dass die Defekte in der Toleranzentwicklung von *dnc^{A143}* der Komponente des Kurzzeitgedächtnisses entsprechen und *hang^{AE10}* Fliegen möglicherweise ein vermindertes Mittelzeit- bzw. Langzeitgedächtnis aufweisen könnten. Das würde bedeuten, dass Lernen und Gedächtnis in *dnc^{A143}* und *hang^{AE10}* Mutanten unabhängig von der Toleranzentwicklung über unterschiedliche cAMP Signalwege reguliert werden.

4.5. Ausblick

Verschiedene Ergebnisse, wie z.B. die Bindung von RNA an bestimmte HANG Proteindomänen und die punktförmige Expression des Proteins im Zellkern sprechen für eine RNA-modifizierende Funktion von Hangover. Für genauere Analysen dieses molekularen Mechanismus können Co-Lokalisationsstudien mit weiteren RNA-prozessierenden Markerproteinen durchgeführt werden. Diese sollten jedoch in wildtypischen Zellen stattfinden, um eine möglichst natürliche Situation der beiden möglichen Interaktionspartner zu gewährleisten. Ein guter Kandidat ist das Embryonic Lethal Abnormal Vision (ELAV) Protein, da es genauso wie HANG eine neuronale Funktion und eine Expression innerhalb nukleärer Kompartimente aufweist (Robinow und White, 1991; Yannoni und White, 1997; Soller und White, 2003).

Für weitere Analysen der *dunce* Funktion ist es aufschlussreich den Wirkungsort innerhalb der Zelle zu identifizieren. Dafür müsste ein *Dnc^{RM}* spezifischer Antikörper hergestellt werden, mit dem zum einen die Expression des *Dnc^{RM}* Proteins im Gehirn bestimmt und die Spezifität der *dnc^{RMRA}*-GAL4 Linie getestet werden könnte. Außerdem wäre eine quantitative Untersuchung des exprimierten *Dnc^{RM}* Proteins in der *dnc^{A143}* Mutante und in *hang^{AE10}* Mutanten möglich. Dies würde Aufschluss darüber geben, ob es sich bei *dnc^{A143}* Fliegen um Nullmutanten für *dnc^{RM}* handelt und ob die Reduktion der Transkriptgruppe 3 in der *hang^{AE10}* Mutante beide Transkripte betrifft. Diese Ergebnisse könnten vielleicht auch die phänotypischen Unterschiede zwischen *dnc^{A143}* und *hang^{AE10}* Fliegen für das olfaktorische Kurzzeitgedächtnis erklären. In diesem Zusammenhang sollte auch das Mittelzeit- und Langzeitgedächtnis für *hang^{AE10}* Mutanten getestet werden.

Die verschiedenen Dnc Isoformgruppen besitzen jeweils spezifische N-terminale Bereiche, die wahrscheinlich für die Lokalisation der Proteine und damit für deren unterschiedliche Aktivitäten verantwortlich sind. Mithilfe von bestimmten *dnc* cDNAs im UAS-Vektor könnte untersucht werden inwieweit die Expression dieser Bereiche, die z.B. eine TAT-Domäne oder eine NLS Sequenz beinhalten, Einfluss auf die Rettung der reduzierten Toleranz von *dnc*^{A143} bzw. *hang*^{AE10} Mutanten hat.

Unabhängig davon wurde für die Rettung der reduzierten Toleranz dieser beiden Mutanten gezeigt, dass sie dieselben, durch *dnc*^{RMRA}-GAL4 getriebenen, Neurone benötigen. Da diese *dnc*^{RMRA}-GAL4 Linie ein sehr breit gefächertes Expressionsmuster besitzt, wäre es interessant die Gehirnstrukturen bzw. Neurone, die für die Rettung der reduzierten Ethanoltoleranz in *hang*^{AE10} und *dnc*^{A143} Mutanten benötigt werden, weiter einzugrenzen. Dazu müsste das Expressionsmuster von verschiedenen GAL4 Linien untersucht werden und mit den geeigneten Linien Rettungsversuche durchgeführt werden.

Verschiedene Studien in Nagern legen nahe, dass die Entwicklung von Ethanoltoleranz eine gelernte Komponente beinhaltet (Kalant *et al.*, 1971; LeBlanc *et al.*, 1975; Wenger *et al.*, 1981; Cole *et al.*, 1999). In *Drosophila* wurde gezeigt, dass verschiedene Mutanten sowohl Defekte im Lernen und Gedächtnis, als auch im Ethanol-induzierten Verhalten aufweisen (Moore *et al.*, 1998; Keene und Waddell, 2007; Godenschwege *et al.*, 2004; Urizar *et al.*, 2007). Es konnte jedoch kein direkter Zusammenhang zwischen den beiden Defekten nachgewiesen werden. Auch die Ergebnisse dieser Arbeit sprechen für separate Mechanismen bei der Gedächtnisbildung und der Toleranzentwicklung. Rettungsversuche für das reduzierte Kurzzeitgedächtnis von *dnc*^{A143} Mutanten mithilfe von GAL4 Linien, die eine spezifische Expression im olfaktorischen System aufweisen, könnten Informationen über wichtige Gehirnregionen bei der Gedächtnisbildung aufzeigen. Je genauer man die einzelnen Gehirnregionen der Gedächtnisbildung bzw. der Toleranzentwicklung zuordnen kann, desto besser ist eine mögliche Verknüpfung oder unabhängige Funktion der beiden zu erkennen.

5. Zusammenfassung

Die Entwicklung von Ethanoltoleranz ist ein Indikator für eine mögliche Abhängigkeit von Alkohol. Der genaue molekulare Mechanismus der Ethanoltoleranzentwicklung ist jedoch nicht bekannt. *Drosophila* ermöglicht die molekulare und phänotypische Untersuchung von verschiedenen Mutanten mit veränderter Toleranz und kann so zu einem besseren Verständnis beitragen (Scholz *et al.*, 2000). Die *hang*^{AE10} Mutante entwickelt eine reduzierte Ethanoltoleranz, wobei dieser Phänotyp auf Defekte in der zellulären Stressantwort zurückzuführen ist (Scholz *et al.*, 2005). Für ein besseres Verständnis, in welchen molekularen Mechanismen bzw. Signalwegen HANG wirkt, wurde die Funktion des Proteins auf zellulärer Ebene analysiert und mögliche Zielgene charakterisiert.

Hangover besitzt 16 Zinkfingerdomänen, inklusive zwei speziell in RNA-modifizierenden Proteinen vorkommende Zinkfingerdomänen (Scholz *et al.*, 2005; Nelissen *et al.*, 1991). Diese auffällige Proteinstruktur spricht für eine Interaktion von HANG mit Nukleinsäuren. Immunhistochemische Analysen von ektopisch exprimiertem Hangover Protein ergaben, dass dieses nicht mit der DNA co-lokalisiert und auch nicht an polytären Chromosomen nachgewiesen werden kann. Die ektopische Expression von HANG in Speicheldrüsenzellen zeigte eine punktförmige Verteilung des Proteins innerhalb des Zellkerns. Dieses punktförmige Expressionsmuster wird häufig in RNA-bindenden Proteinen gefunden (Spector, 2001). Deshalb wurden Co-Lokalisationsstudien von HANG mit Markern für RNA-modifizierende Proteine durchgeführt. Dabei wurde keine Interaktion mit den Nukleoli gefunden. Verschiedene Markerproteine des Spleißapparates zeigten ebenfalls keine Co-Lokalisation mit Hangover. Da es sich bei den Studien aber um eine ektopische Expression des Proteins handelte, muss diese nicht unbedingt dem wildtypischen Verhalten von HANG entsprechen, da der Interaktionspartner nicht in vergleichbaren Mengen exprimiert wird. Mithilfe von *in vitro* Experimenten konnte außerdem die Bindung von RNA an bestimmten Hangover Proteinbereichen nachgewiesen werden und auch die wildtypische Hangover Expression in neuronalen Zellen des Gehirns zeigte die, für RNA-modifizierende Proteine, typische punktförmige Verteilung innerhalb des Zellkerns. Diese Ergebnisse legen nahe, dass HANG eine RNA-regulierende Funktion hat.

In einem cDNA Microarray Experiment wurde das Gen *dunce* als mögliches Zielgen von Hangover identifiziert (Klebes und Scholz, unveröffentlichte Daten). Das Gen *dunce* kodiert für eine Phosphodiesterase, welche spezifisch cAMP hydrolysiert (Davis und Kiger, 1981). Es existieren 14 Transkripte, die ausgehend von ihrer Größe und Funktion in vier Gruppen

zusammengefasst werden können (<http://flybase.org/>; Qiu *et al.*, 1993). Zur Bestätigung der cDNA Microarray Experimente wurden die *dnc* Transkriptunterschiede in Wildtyp und *hang*^{AE10} Mutante mithilfe von semiquantitativer RT-PCR für jede der vier Gruppen untersucht. Dabei konnte eine Reduktion der *dnc*^{RMRA}-Transkriptgruppe in *hang*^{AE10} Mutanten nachgewiesen werden. Aufgrund dieser Ergebnisse wurde die *dnc*^{RMRA}-spezifische *dnc*^{A143} Mutante hergestellt (Saratsis, 2006) und auf Verhaltensebene analysiert. Die Experimente zeigten, dass sowohl *dnc*¹, als auch die *dnc*^{A143} Mutante eine reduzierte Ethanoltoleranz und Defekte in der zellulären Stressantwort aufweisen. Für die Rettung der reduzierten Toleranz von *hang*^{AE10} und *dnc*^{A143} in *dnc*^{RMRA}-spezifischen Neuronen wurde die *dnc*^{RMRA} Promotor-GAL4 Linie hergestellt (Saratsis, 2006). *In-situ* Hybridisierungsexperimente legen nahe, dass das Expressionsmuster der *dnc*^{RMRA}-GAL4 Linie das endogene Expressionsmuster der *dnc*^{RMRA} Transkripte wiedergibt. Für eine eindeutige Aussage müssten allerdings noch Co-Lokalisationsstudien mit einem *Dnc*^{RMRA} spezifischen Antikörper durchgeführt werden. Die *dnc*^{RMRA}-GAL4 Linie hat ein relativ breites Expressionsmuster, sie exprimiert ungefähr in jeder 200sten Zelle des Gehirns. Dabei werden die Antennalloben, Bereiche des Pilzkörpers und einige Teile des Zentralkomplexes innerviert.

Die reduzierte Ethanoltoleranz der *dnc*^{A143} Mutanten konnte über die Expression von *UAS-dnc* mit der *dnc*^{RMRA}-GAL4 Linie auf Wildtyp Level gerettet werden. Die reduzierte Toleranz der *hang*^{AE10} Mutante konnte mithilfe derselben GAL4 Linie verbessert werden. Dies beweist, dass in beiden Mutanten dieselben Zellen für die Entwicklung von Ethanoltoleranz benötigt werden und sie wahrscheinlich in der gleichen Signaltransduktionskaskade eine Funktion haben. Expressionsstudien zeigten, dass *dnc*^{RMRA} downstream von *hang* liegt. Der Versuch, den *hang*^{AE10} Toleranzphänotyp durch Expression von *dnc* mithilfe der *dnc*^{RMRA}-GAL4 Linie zu retten, führte jedoch zu keiner Verbesserung des Phänotyps. Das heißt, eine Verstärkung von *Dunce* im *hang*^{AE10} mutanten Hintergrund reicht nicht aus, um die *HANG* Funktion wieder herzustellen. Eine nahe liegende Erklärung ist, dass *HANG* nicht nur das Gen *dunce* reguliert sondern noch andere Gene modifiziert und die Regulationsdefekte in *hang*^{AE10} Mutanten durch die *dnc* Expression nicht aufgehoben werden können. Aufgrund der Anfälligkeit der *UAS/ GAL4* Systems gegenüber Hitze war es außerdem nicht möglich die Defekte der zellulären Stressantwort von *dnc*^{A143} bzw. *hang*^{AE10} Fliegen zu retten.

Die Rettung der reduzierten Ethanoltoleranz der *dnc*^{A143} Mutante führte außerdem zu der Vermutung, dass die cAMP Regulation eine wichtige Funktion bei der Ethanoltoleranzentwicklung hat. Über die Expression von cAMP-regulierenden Proteinen in *dnc*^{RMRA}-spezifischen Neuronen wurde der Einfluss von cAMP bei Ethanol-induziertem

Verhalten überprüft. Dabei sollte die Überexpression von *dunce* zu einer Erniedrigung und die Überexpression von *rutabaga* zu einer Erhöhung der cAMP Konzentration in den Zellen führen. Bei beiden Versuchen konnte weder eine Veränderung für die Ethanol sensitivität, noch für die Toleranzentwicklung festgestellt werden. Eine Erklärung hierfür wäre, dass Veränderungen in der cAMP Konzentration über Rückkopplungsmechanismen zwischen *Dunce* und *Rutabaga* ausgeglichen werden können. Für eine genauere Aussage müsste jedoch die cAMP Konzentration in diesen Fliegen gemessen werden. Die Überexpression von *pka-c*, ein Gen das für die katalytische Untereinheit von PKA kodiert, in *dnc^{RMRA}* spezifischen Zellen führt zu einer erhöhten Ethanolresistenz. Das bedeutet, dass die Modulation der cAMP Konzentration durch *dunce* und *rutabaga* in *dnc^{RMRA}* spezifischen Zellen keinen Einfluss auf Ethanol-induziertes Verhalten hat, wohingegen die Stärke der cAMP vermittelten Signalverarbeitung über die cAMP-abhängige PKA zu Veränderungen im Verhalten führt.

Für Mutanten des cAMP Signalweges ist außerdem bekannt, dass sie Defekte im olfaktorischen Lernen bzw. Gedächtnis aufweisen. Deshalb wurden die *dnc^{A143}*, *dnc¹* und *hang^{AE10}* Mutanten in diesem Paradigma getestet. Sowohl *dnc¹*, als auch *dnc^{A143}* Fliegen zeigten einen reduzierten Performance Index für das zwei und 30 Minuten Gedächtnis. Nach 180 Minuten verhielten sich die *dnc^{A143}* Mutanten nicht mehr unterschiedlich zum Wildtyp, die *dnc¹* Mutante zeigte jedoch immer noch eine Reduktion des Performance Index im Vergleich zur Kontrolle. Demnach ist in *dnc^{A143}* Mutanten nur das Kurzzeitgedächtnis betroffen, wohingegen *hang^{AE10}* Mutanten keine Reduktion des Performance Index für das olfaktorische Kurzzeitgedächtnis aufweisen. Es ist jedoch nicht bekannt, wie sich *hang^{AE10}* Fliegen bei Messung für das Mittelzeit- und Langzeitgedächtnisses verhalten.

Ähnlich wie bei der Gedächtnisentwicklung gibt es auch bei der Toleranzentwicklung verschiedene Phasen. Es existieren zwei Phasen, dabei handelt es sich um eine kurzfristige und eine langfristige Phase. Um herauszufinden welche der beiden Komponenten bei den *dnc^{A143}* bzw. *hang^{AE10}* Mutanten betroffen ist und ob dies mit den Defekten in der Gedächtnisentwicklung übereinstimmt, wurde die Kinetik der Toleranzentwicklung der beiden Fliegenlinien untersucht. Der Versuch zeigte, dass bei *dnc^{A143}* Mutanten die erste Phase der Toleranzentwicklung defekt ist, wohingegen bei der *hang^{AE10}* Mutante die erste und zweite Phase betroffen ist. Das bedeutet, dass ein Teil der reduzierten Toleranz in *hang^{AE10}* Mutanten und die gesamte Reduktion in *dnc^{A143}* Mutanten auf Defekte im gemeinsamen cAMP-regulierten Signalweg zurückzuführen sind. Die unterschiedlichen Ergebnisse der beiden Mutanten in der Gedächtnisentwicklung deuten außerdem daraufhin, dass Lernen und

Gedächtnis in *dnc*^{A143} und *hang*^{AE10} Mutanten von der Toleranzentwicklung unabhängig über unterschiedliche cAMP-abhängige Signaltransduktionskaskaden reguliert werden.

6. Summary

The development of ethanol tolerance is an indicator for a possible alcohol addiction. However the correct molecular mechanism of ethanol tolerance development is not known. The model organism *Drosophila* allows molecular and phenotypic observations of several mutants with altered ethanol tolerance (Scholz *et al.*, 2000). *Hang*^{AE10} mutants develop reduced ethanol tolerance because of defects in the cellular stress response (Scholz *et al.*, 2005). For a better understanding of molecular mechanisms or signaling pathways, HANG putative target genes were identified, characterized and the protein function was analyzed on cellular level. The Hangover protein has 16 zinc finger domains, two of them are found in RNA modifying proteins (Scholz *et al.*, 2005; Nelissen *et al.*, 1991). This striking protein structure argues for an interaction of HANG with nucleic acids. In immunohistochemical studies with an ectopically expressed Hangover protein neither colocalization with DNA nor detectable Hangover binding on polytene chromosomes was observed. The ectopic expression of HANG in salivary glands shows a speckled protein distribution in the nucleus, which is similar to the expression pattern in RNA modifying proteins (Spector, 2001). Therefore colocalization studies of HANG with markers for RNA modifying proteins were performed. However no interaction with nucleoli was found. Certain factors of the splicing machinery also show no colocalization with Hangover. Since the studies were done with ectopically expressed protein, the results do not necessarily reflect the wild type behavior of HANG, as the interaction partner is not expressed in a comparable amount. RNA binding to specific parts of the Hangover protein was detected by *in vitro* experiments. Furthermore wild type expression of Hangover in neuronal cells shows the typical speckled distribution of RNA modifying proteins. These results suggest a RNA regulating function of HANG.

In cDNA microarray experiments *dunce* was identified as a putative target gene of Hangover (Klebes and Scholz, unpublished data). The gene *dunce* encodes a phosphodiesterase that specifically hydrolyses cAMP (Davis and Kiger, 1981). The 14 *dnc* transcripts can be divided into four groups based on their length and function (<http://flybase.org/>; Qiu *et al.*, 1993). To confirm the results of the cDNA microarray experiments, semiquantitative RT-PCRs were performed to analyze the differences in *dnc* transcript levels between wild type and *hang*^{AE10} mutants for each *dnc* group. A reduced amount of *dnc*^{RMRA} transcripts was observed in *hang*^{AE10} mutants. On the basis of these results the *dnc*^{RMRA} transcript specific *dnc*^{A143} mutant was generated (Saratsis, 2006) and tested on behavioral level. Behavioral analysis of *dnc*^I and *dnc*^{A143} mutants showed reduced ethanol tolerance and defects in the cellular stress response.

For rescue experiments of reduced ethanol tolerance in *hang*^{AE10} and *dnc*^{A143} mutants in specific *dnc*^{RMRA} neurons, the promoter *dnc*^{RMRA}-GAL4 line was generated (Saratsis, 2006). *In-situ* hybridization studies suggested that the expression pattern of *dnc*^{RMRA}-GAL4 reflects the endogenous expression of the *dnc*^{RMRA} transcripts. For unambiguous results colocalization studies with a specific Dnc^{RMRA} antibody has to be done. The *dnc*^{RMRA}-GAL4 line shows a broad expression pattern, with transgene expression in about every 200th cell in the brain. It innervates the antennal lobes, parts of the mushroom body and regions of the central complex.

The reduced ethanol tolerance in *dnc*^{A143} mutants was rescued to wild type level by expressing *UAS-dnc* with the promoter *dnc*^{RMRA}-GAL4 line. Whereas the reduced ethanol tolerance in *hang*^{AE10} mutants was advanced by expressing *UAS-hang* with the same GAL4 line. This demonstrates that both mutants involve the same set of neurons for developing ethanol tolerance and probably act in the same signaling pathway. Expression studies showed that *dnc*^{RMRA} lies downstream of *hang*. The attempt to rescue the reduced ethanol tolerance in *hang*^{AE10} flies by expressing *dnc* using *dnc*^{RMRA}-GAL4 line did not advance the tolerance in these flies. An obvious explanation is that HANG does not only regulate *dunce* but also other genes and these regulation defects in *hang*^{AE10} mutants cannot be reversed by *dnc* expression. Due to the sensitivity of the UAS/ GAL4 system towards heat it was impossible to rescue the cellular stress response defects in *dnc*^{A143} and *hang*^{AE10} mutants.

The rescue of the *dnc*^{A143} tolerance phenotype resulted in the assumption that cAMP regulation has an important function in the development of ethanol tolerance. The effect of cAMP on ethanol induced behavior should be tested by expression of cAMP regulating proteins in *dnc*^{RMRA} specific neurons. There the overexpression of *dunce* should result in an increase and the overexpression of *rutabaga* should lead to a decrease in cAMP levels. However, for both experiments there was neither a change in ethanol sensitivity nor in ethanol tolerance. An explanation would be that changes in cAMP concentration could be balanced by feedback loops between Dunce and Rutabaga. For a decisive conclusion the cAMP concentration in these flies has to be measured. Overexpressing *pka-c*, a gene that encodes the catalytic subunit of PKA in *dnc*^{RMRA} specific cells, leads to a higher resistance towards ethanol. This shows that the modulation of cAMP level by Dunce and Rutabaga has no effect on ethanol induced behavior in *dnc*^{RMRA} specific cells. Whereas the intensity of cAMP mediated signaling processes result in behavioral changes.

Several mutants of the cAMP signaling pathway are impaired in olfactory learning and memory. Therefore *dnc*¹, *dnc*^{A143} and *hang*^{AE10} mutants were tested in this paradigm. *Dnc*¹ as

well as *dnc*^{A143} flies showed reduced performance indices two and 30 minutes memory. After 180 minutes the performance index of *dnc*^{A143} mutants was not significantly different from wild type whereas *dnc*^l mutants still had a reduction in comparison to wild type. Thus, *dnc*^{A143} mutants have defects in short-term memory whereas short-term memory of *hang*^{AE10} mutants is not affected. However it is not known how *hang*^{AE10} flies will perform for mid-term and long-term memory formation.

Similar to memory formation there exist different phases of tolerance development. To detect, if the long-term or the short-term form of tolerance is affected, the kinetic of tolerance development was investigated for *dnc*^{A143} and *hang*^{AE10} mutants. In *dnc*^{A143} mutants the first phase of tolerance development is defective, whereas in *hang*^{AE10} mutants the early and the late phase seem to be affected. Thus a part of the reduced tolerance in *hang*^{AE10} and the complete reduction in *dnc*^{A143} mutants could be due to defects in the same signaling pathway regulated via cAMP. The variable results for the development of short-term memory in both mutants indicate that memory formation in *dnc*^{A143} and *hang*^{AE10} mutants is independent of ethanol tolerance development and is regulated by different cAMP signaling pathways.

7. Literaturverzeichnis

Alberts, Bray B. D., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K. und Watson, J. D., 1989: Molecular Biology of the Cell. 2nd edition. New York: Garland Publishing

Asher, O., Cunningham, T. D., Yao, L., Gordon, A. S., Diamond, I., 2002: Ethanol stimulates cAMP-responsive element (CRE)-mediated transcription via CRE-binding protein and cAMP-dependent protein kinase. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 301 (1): 66-70

Beard, M. B., Olsen, A., E., Jones, R. E., Erdogan, S., Houslay, M. D., Bolger, G. B., 2000: UCR1 and UCR2 domains unique to the cAMP-specific phosphodiesterase family form a discrete module via electrostatic interactions. *J. Biol. Chem.* 275 (14): 10349-58

Bellen, H. J., 1998: The Fruit Fly: A model organism to study the genetic of alcohol abuse and addiction? *Cell* 93: 909-912

Berger, K. H., Kong, E. C., Dubnau, J., Tully, T., Moore, M. S., Heberlein, U., 2008: Ethanol sensitivity and tolerance in long-term memory mutants of *Drosophila melanogaster*. *Alcohol. Clin. Exp. Res.* 32 (5): 895-908

Blokhina, O., Virolainen, E., Fagerstedt, K. V., 2003: Antioxidants, oxidative damage and oxygen deprivation stress: a review. *Ann. Bot. (Lond).* 91 Spec No: 179-94

Bolger, G., Michaeli, T., Martins, T., John, St., Steiner, B., Rodgers, L., Riggs, M., Wigler, M., Ferguson, K., 1993: A family of human phosphodiesterases homologous to the dunce learning and memory gene product of *Drosophila melanogaster* are potential targets for antidepressant drugs. *Mol. Cell Biol.* 13 (10): 6558-71

Bosron, W. F., Li, T. K., 1986: Genetic polymorphism of human liver alcohol and aldehyde dehydrogenases, and their relationship to alcohol metabolism and alcoholism. *Hepatology* 6 (3): 502-10

Brand, A. H., Perrimon, N., 1993: Targeted gene expression as a means of altering cell fates and generating dominant phenotypes. *Development* 118 (2): 401-15

Brown, D. M., Hutchison, L., Donaldson, K., MacKenzie, S. J., Dick, C. A., Stone, V., 2007: The effect of oxidative stress on macrophages and lung epithelial cells: the role of phosphodiesterases 1 and 4. *Toxicol. Lett.* 168 (1): 1-6

Buchner, E., Buchner, S., Crawford, G., Mason, W. T., Salvaterra, P. M., Sattelle, D. B., 1986: Choline acetyltransferase-like immunoreactivity in the brain of *Drosophila melanogaster*. *Cell Tissue Res.* 246: 57-62

Budnik, V., Martin-Morris, L., White, K., 1986: Perturbed pattern of catecholamine-containing neurons in mutant *Drosophila* deficient in the enzyme dopa decarboxylase. *J Neurosci.* 6 (12): 3682-91

Canniff, W., 1872: The Effects of Alcohol upon the Human System. Toronto, Adam Stevenson & Co pp 142-151

- Chandrasekaran, A., Toh, K. Y., Low, S. H., Tay, S. K., Brenner, S., Goh, D. L.,** 2008: Identification and characterization of novel mouse PDE4D isoforms: molecular cloning, subcellular distribution and detection of isoform-specific intracellular localization signals. *Cell Signal.* 20 (1): 139-53
- Charness, M. E., Querimit, L. A., Hentleff, M.,** 1988: Ethanol differentially regulates G proteins in neural cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 155 (1) : 138-43
- Chen, C. N., Denome, S., Davis, R. L.,** 1986: Molecular analysis of cDNA clones and the corresponding genomic coding sequences of the *Drosophila dunce+* gene, the structural gene for cAMP phosphodiesterase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83 (24) : 931-7
- Chen, C. N., Malone, T., Beckendorf, S. K., Davis, R. L.,** 1987: At least two genes reside within a large intron of the *dunce* gene of *Drosophila*. *Nature* 329 (6141): 721-4
- Cheng, K. W., Leung, P. C.,** 2001: Human gonadotropin-releasing hormone receptor gene transcription: up-regulation by 3',5'-cyclic adenosine monophosphate/protein kinase A pathway. *Mol. Cell Endocrinol.* 181 (1-2): 15-26
- Hoffman, A. A., Cohan, F. M.,** 1986: Genetic divergence under uniform selection. III. Selection for knockdown resistance to ethanol in *Drosophila pseudoobscura* populations and their replicate lines. *Heredity* 58 (Pt 3): 425-33
- Cole, J. C., Littleton, J. M., Little, H. J.,** 1999: Effects of repeated ethanol administration in the plus maze; a simple model for conditioned abstinence behaviour. *Psychopharmacology (Berl)* 142 (3): 270-9
- Conti, M., Jin, S. L.,** 1999: The molecular biology of cyclic nucleotide phosphodiesterases. *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.* 63 : 1-38
- Crabbe, J. C., Rigter, H., Uijlen, J., Strijbos, C.,** 1979: Rapid development of tolerance to the hypothermic effect of ethanol in mice. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 208 (1). 128-33
- Crabbe, J. C., Phillips, T. J., Feller, D. J., Hen, R., Wenger, C. D., Lessov, C. N., Schafer, G. L.,** 1996: Elevated alcohol consumption in null mutant mice lacking 5-HT_{1B} serotonin receptors. *Nat. Genet.* 14: 98-101
- Crittenden, J. R., Skoulakis, E. M., Han, K. A., Kalderon, D., Davis, R. L.,** 1998: Tripartite mushroom body architecture revealed by antigenic markers. *Learn. Mem.* 5 (1-2): 38-51
- Cunningham, C., Ganoza, M. C.,** 1984: Detection of a 16S rRNA initiator-tRNA complex by a new selective labelling method. *Mol. Biol. Rep.* 10 (2): 115-21
- David, B. S., William, A., Walter, A. G., Carol, A. G.,** 1987: The heat shock response in is regulated by changes in the concentration of σ^{32} . *Nature* 329: 348-51
- Davis, G. W., Schuster, C. M., Goodman, C. S.,** 1996: Genetic dissection of structural and functional components of synaptic plasticity. III. CREB is necessary for presynaptic functional plasticity. *Neuron* 17 (4): 567-70

- Davis, R. L., Kiger, J. A. Jr.,** 1981: Dunce mutants of *Drosophila melanogaster*: mutants defective in the cyclic AMP phosphodiesterase enzyme system. *J. Cell Biol.* 90 (1): 101-7
- Day, J. P., Dow, J. A., Houslay, M. D., Davies, S. A.,** 2005: Cyclic nucleotide phosphodiesterases in *Drosophila melanogaster*. *Biochem. J.* 388 (Pt 1): 333-42
- De la Monte, S. M., Tong, M., Cohen, A. C., Sheedy, D., Harper, C., Wands, J. R.,** 2008: Insulin and insulin-like growth factor resistance in alcoholic neurodegeneration. *AlcoholClin. Exp. Res.* 32 (9): 1630-44
- Diamond, I., Gordon, A. S.,** 1997: Cellular and molecular neuroscience of alcoholism. *Physiol. Rev.* 77 (1): 1-20
- Dimitrijevic, N., Dzitoyeva, S., Satta, R., Imbesi, M., Yildiz, S., Manev, H.,** 2005: *Drosophila* GABA(B) receptors are involved in behavioral effects of gamma-hydroxybutyric acid (GHB). *Eur. J. Pharmacol.* 519 (3): 246-52
- Dudai, Y., Jan, Y. N., Byers, D., Quinn, W. G., Benzer, S.,** 1976: *dunce*, a mutant of *Drosophila* deficient in learning. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 73 (5): 1684-8
- Duerr, J. S., Quinn, W. G.,** 1982: Three *Drosophila* mutations that block associative learning also affect habituation and sensitization. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 79 (11): 3646-50
- Duffy, J. B.,** 2002: GAL4 system in *Drosophila*: a fly geneticist's Swiss army knife. *Genesis* 34 (1-2): 1-15
- Erdogan, S., Celik, S., Aslantas, O., Kontas, T., Ocak, S.,** 2007: Elevated cAMP levels reverse *Brucella melitensis*-induced lipid peroxidation and stimulate IL-10 transcription in rats. *Res. Vet. Sci.* 82 (2): 181-6
- Erdogan, S., Aslantas, O., Celik, S., Atik, E.,** 2008: The effects of increased cAMP content on inflammation, oxidative stress and PDE4 transcripts during *Brucella melitensis* infection. *Res. Vet. Sci.* 84 (1): 18-25
- Fadda, F., Rossetti, Z. L.,** 1998: Chronic ethanol consumption: from neuroadaptation to neurodegeneration. *Progress in Neurobiology* Vol. 56: 385-431
- Fakan, S.,** 1994: Perichromatin fibrils are in situ forms of nascent transcripts. *Trends Cell Biol.* 4 (3): 86-90
- Feany, M. B., Quinn, W. G.,** 1995: A neuropeptide gene defined by the *Drosophila* memory mutant *amnesiac*. *Science* 168: 869-873
- Feder, M. E., Hofmann, G. E.,** 1999: Heat-shock proteins, molecular chaperones, and the stress response: evolutionary and ecological physiology. *Annu. Rev. Physiol.* 61: 243-82
- Forgèt, M. A., Sisson, J. H., Spurzem, J. R., Wyatt, T. A.,** 2003: Ethanol increases phosphodiesterase 4 activity in bovine bronchial epithelial cells. *Alcohol* 31 (1-2): 31-8

- Franz, M.**, 2005: Identifizierung des zellulären Prozesses in dem *hangover* eine Funktion hat. Diplomarbeit, Bayerische Julius-Maximilians Universität Würzburg.
- Fu, X. D., Maniatis, T.**, 1992: The 35-kDa mammalian splicing factor SC35 mediates specific interactions between U1 and U2 small nuclear ribonucleoprotein particles at the 3' splice site. *Proc Natl Acad Sci USA* 89: 1725-1729
- Furia, M., Digilio, F. A., Artiaco, D., Giordano, E., Polito, L. C.**, 1990: A new gene nested within the dunce genetic unit of *Drosophila melanogaster*. *Nucleic Acids Res.* 18 (19): 5837-41
- Gailey, D. A., Jackson, F. R., Siegel, R. W.**, 1984: Conditioning Mutations in *DROSOPHILA MELANOGASTER* Affect an Experience-Dependent Behavioral Modification in Courting Males. 106 (4): 613-623
- Godenschwege, T. A., Reisch, D., Diegelmann, S., Eberle, K., Funk, N., Heisenberg, M., Happe, V., Hoppe, J., Klagges, B. R., Martin, J. R., Nikitina, E. A., Putz, G., Reifegerste, R., Reisch, N., Rister, J., Schaupp, M., Scholz, H., Schwärzel, M., Werner, U., Zars, T. D., Buchner, S., Buchner, E.**, 2004: Flies lacking all synapsins are unexpectedly healthy but are impaired in complex behaviour. *Eur. J. Neurosci.* 20 (3): 611-22
- Graveley, B. R.**, 2000: Sorting out the complexity of SR protein functions. *RNA* 6 (9): 1197-211
- Greeley, J., Le, D. A., Poulos, C. X., Cappell, H.**, 1984: Alcohol is an effective cue in the conditional control of tolerance to alcohol. *Psychopharmacology* 83: 159-162
- Guatala, R., Wang, J., Kadapakkam, S., Hwang, Y., Tickn, M., Li, M. D.**, 2004: Microarray analysis of ethanol-treated cortical neurons revealed disruption of genes related to the ubiquitin-proteasome pathway and protein synthesis. *Alcohol Clin. Exp. Res.* 28: 1779-1788
- Guerri, C., Pascual, M., Renau-Piqueras, J.**, 2001: Glia and fetal alcohol syndrome. *Neurotoxicology* 22 (5): 593-9
- Guerri, C., Renau-Piqueras, J.**, 1997: Alcohol, astroglia, and brain development. *Mol. Neurobiol.* 15 (1): 65-81
- Harris, R. A.**, 1999: Ethanol actions on multiple ion channels: which are important? *Alcohol Clin. Exp. Res.* 23 (10): 1563-70
- Haynes, S. R., Johnson, D., Raychandhurig, G., Beyer, A. L.**, 1991: The *Drosophila* Hrb87F gene encodes a new member of the A and B hnRNP protein group. *Nucleic Acids Res.* 19 (1): 25-31
- Heisenberg, M.**, 2003: Mushroom body memoir: from maps to models. *Nature Reviews* 4: 266-275
- Ho, D. T., Shayan, H., Murphy, T. H.**, 1997b: Okadaic acid induces hyperphosphorylation of tau independently of mitogen-activated protein kinase activation. *J. Neurochem.* 68 (1): 106-11

- Hoffmann, R., Abdel'Al, S., Engels, P.,** 1998: Differential distribution of rat PDE-7 mRNA in embryonic and adult rat brain. *Cell Biochem. Biophys.* 28 (2-3): 103-13
- Houslay, M. D., Sullivan, M., Bolger, G. B.,** 1998: The multienzyme PDE4 cyclic adenosine monophosphate-specific phosphodiesterase family: intracellular targeting, regulation, and selective inhibition by compounds exerting anti-inflammatory and antidepressant actions. *Adv. Pharmacol.* 44: 225-342
- Houslay, M. D., Adams, D. R.,** 2003: PDE4 cAMP phosphodiesterases: modular enzymes that orchestrate signalling cross-talk, desensitization and compartmentalization. *Biochem. J.* 370 (Pt 1): 1-18
- Houslay, M. D.,** 2001: PDE4 cAMP-specific phosphodiesterases. *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.* 69: 249-315
- Ikura M., Osawa M., Ames J. B.,** 2002: The role of calcium-binding proteins in the control of transcription: structure to function. *Bioessays* 24 (7): 625-36
- Iuchi, S.,** 2001: Three classes of C2H2 zinc finger proteins. *Cell Mol. Life Sci.* 58 (4): 625-35
- Jin, S. L., Swinnen, J. V., Conti, M.,** 1992: Characterization of the structure of a low Km, rolipram-sensitive cAMP phosphodiesterase. Mapping of the catalytic domain. *J. Biol. Chem.* 267 (26): 18929-39
- Joho, K. E., Darby, M. K., Crawford, E. T., Brown, D. D.,** 1990: A finger protein structurally similar to TFIIIA that binds exclusively to 5S RNA in *Xenopus*. *Cell* 61 (2): 293-300
- Jorgensen, H. A., Fasmer, O. B., Hole, K.,** 1986: Learned and pharmacologically-induced tolerance to ethanol and cross-tolerance to morphine and clonidine. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 24 (4): 1083-8
- Kalant, H., LeBlanc, A. E., Gibbins, R. J.,** 1971: Tolerance to and dependence on some non-opiate psychotropic drugs. *Pharmacol. Rev.* 23 (3): 135-91
- Kalant, H., Le, A. D.,** 1984: Effects of ethanol on thermoregulation. *Pharmacol. Ther.* 23: 313-364
- Keene, A. C., Waddell, S.,** 2007: *Drosophila* olfactory memory: single genes to complex neural circuits. *Nat. Rev. Neurosci.* 8 (5): 341-54
- Koch, O. R., Pani, G., Borrello, S., Colavitti, R., Cravero, A., Farre, S., Galeotti, T.,** 2004: Oxidative stress and antioxidant defenses in ethanol-induced cell injury. *Mol. Aspects Med.* 25 (1-2): 191-8
- Lamond, A. I., Earnshaw, W. C.,** 1998: Structure and function in the nucleus. *Science* 280 (5363): 547-53
- Lane, M. E., Kalderon, D.,** 1993: Genetic investigation of cAMP-dependent protein kinase function in *Drosophila* development. *Genes Dev.* 7 (7A): 1229-43

- Lannutti, B. J., Schneider, L. E.,** 2001: Gprk2 controls cAMP levels in *Drosophila* development. *Dev. Biol.* 233 (1): 174-85
- Le, A. D., Khanna, J. M., Kalant, H., Grossi, F.,** 1986: Tolerance to and cross-tolerance among ethanol, pentobarbital and chlordiazepoxide. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 24 (1): 93-8
- Le, A. D., Kalant, H., Khanna, J. M.,** 1987a: Effects of treatment dose and intoxicated practice on the development of tolerance to ethanol-induced motor impairment. *Alcohol Alcohol* 435-440
- LeBlanc, A. E., Gibbins, R. J., Kalant, H.,** 1975: Generalization of behaviorally augmented tolerance to ethanol, and its Relation to physical dependence. *Psychopharmacologia* 44: 211-246
- Lee, T., Lee, A., Luo, L.,** 1999: Development of the *Drosophila* mushroom bodies: sequential generation of three distinct types of neurons from a neuroblast. *Development* 126 (18): 4065-76
- Lewis, M. J.,** 1996: Alcohol reinforcement and neuropharmacological therapeutics. *Alcohol & Alcoholism* 31: 17-25
- Lewohl, J. M., Wang, L., Miles, M. F., Zhang, L., Dodd, P. R., Harris, R. A.,** 2000: Gene expression in human alcoholism: microarray analysis of frontal cortex. *Alcohol Clin. Exp. Res.* 24: 1873-1882
- Lindquist, S.,** 1986: The heat-shock response. *Annu. Rev. Biochem.* 55: 1151-91
- Littleton, J. T., Ganetzky, B.,** 2000: Ion channels and synaptic organization: analysis of the *Drosophila* genome. *Neuron* 26 (1): 35-43
- Livingstone, M. S., Sziber, P. P., Quinn, W. G.,** 1984: Loss of calcium/ calmodulin responsiveness in adenylate cyclase of rutabaga, a *Drosophila* learning mutant. *Cell* 37: 205-215
- MacKenzie, S. J., Baille, G. S., McPhee, I., Bolger, G. B., Houslay, M. D.** 2000: ERK2 mitogen-activated protein kinase binding, phosphorylation, and regulation of the PDE4D cAMP-specific phosphodiesterases. The involvement of COOH-terminal docking sites and NH2-terminal UCR regions. *J. Biol. Chem.* 275 (22): 16609-17
- Marlatt, G. A., Rohsenow, D. J.,** 1980: Cognitive processes in alcohol use: Expectancy and the balanced placebo design. Mello N. K. (ed) *Advances in substance abuse: Behavioral and Biological research.* JAJ Press. Greenwich, Connecticut 159-200
- McGuire, S. E., Le, P. T., Osborn, A. J., Matsumoto, K., Davis, R. L.,** 2003: Spatiotemporal rescue of memory dysfunction in *Drosophila*. *Science* 302 (5651): 1765-8
- Messmer, S., Franke, A., Paro, R.,** 1992: Analysis of the functional role of the Polycomb chromo domain in *Drosophila melanogaster*. *Genes Dev.* 6 (7): 1241-54

- Miller, J., McLachlan, A. D., Klug, A.,** 1985: Repetitive zinc-binding domains in the protein transcription factor IIIA from *Xenopus* oocytes. *EMBO J.* 4 (6): 1609-14
- Mintz, P. J., Patterson, S. D., Neuwald, A. F., Spahr, C. S., Spector, D. L.,** 1999: Purification and biochemical characterization of interchromatin granule clusters. *EMBO J.* 18 (15): 4308-20
- Monastirioti, M., Linn, C. E. Jr., White, K.,** 1996: Characterization of *Drosophila* tyramine beta-hydroxylase gene and isolation of mutant flies lacking octopamine. *J. Neurosci.* 16 (12): 3900-11
- Moore, M. S., Dezaazo, J., Luk, A. Y., Tully, T., Singh, C. M., Heberlein, U.,** 1998: Ethanol intoxication in *Drosophila*: Genetic and pharmacological evidence for regulation by the cAMP signalling pathway. *Cell* 93 (6): 997-1007
- Morrow, G., Tanguay, R. M.,** 2003: Heat shock proteins and aging in *Drosophila melanogaster*. *Semin. Cell Dev. Biol.* 14 (5): 291-9
- Mortillaro, M. J., Blencowe, B. J., Wei, X., Nakayasu, H., Du L., Warren, S. L., Sharp, P. A., Berezney, R.,** 1996: A hyperphosphorylated form of the large subunit of RNA polymerase II is associated with splicing complexes and the nuclear matrix. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93 (16): 8253-7
- Murray, R. P., Istvan, J. A., Daniels, K., Beaudoin, C. M.,** 1998: Alcohol and morbidity in the Lung Health Study. *J. Stud. Alcohol.* 59 (3): 250-7
- Neidhardt, F. C., VanBogelen, R. A., Vaughn, V.,** 1984: The genetics and regulation of heat-shock proteins. *Annu. Rev. Genet.* 18: 295-329
- Nelissen, R. L., Heinrichs, V., Habets, W. J., Simons, F., Lührmann, R., van Venrooij, W. J.,** 1991: Zinc finger-like structure in U1-specific protein C is essential for specific binding to U1 snRNP. *Nucleic Acids Res.* 19 (3): 449-54
- Nestler, E. J., Aghajanian, G. K.,** 1997: Molecular and cellular basis of addiction. *Science* 278 (5335): 58-63
- Ortiz, J., Fitzgerald, L. W., Charlton, M., Lane, S., Trevisan, L., Guitart, X., Shoemaker, W., Duman, R. S., Nestler, E. J.,** 1995: Biochemical Actions of Chronic Ethanol Exposure in the Mesolimbic Dopamine System. *Synapse* 21: 289-298
- Park, S. K., Sedore, S. A., Cronmitter, C., Hirsh, J.,** 2000: PKA-RII-deficient *Drosophila* are viable but show developmental, circadian and drug response phenotypes. *J. Biol. Chem.* 275: 20588-20596
- Parkes, T. L., Elia, A. J., Dickinson, D., Hilliker, A. J., Phillips, J. P., Boulianne, G. L.,** 1998: Extension of *Drosophila* lifespan by overexpression of human SOD1 in motorneurons. *Nat. Genet.* 19 (2): 171-4
- Paro, R., Hogness, D. S.,** 1991: The Polycomb protein shares a homologous domain with a heterochromatin-associated protein of *Drosophila*. *Proc Natl Acad Sci USA* 88 (1): 263-7

- Pavletich, N. P., Pabo, C. O.,** 1991: Zinc finger-DNA recognition: crystal structure of a Zif268-DNA complex at 2.1 Å. *Science* 252 (5007): 809-17
- Pelham, H. R., Brown, D. D.,** 1980: A specific transcription factor that can bind either the 5S RNA gene or 5S RNA. *Proc Natl Acad Sci USA* 77 (7): 4170-7
- Picard, B., Wegenez, M.,** 1979: Isolation of a 7S particle from *Xenopus laevis* oocytes: a 5S RNA protein complex. *Proc Natl Acad Sci USA* 76 (1): 241-5
- Piper, P. W.,** 1995: The heat shock and ethanol stress response of yeast exhibit extensive similarity and functional overlap. *FEMS Microbil. Lett.* 143 (2-3): 121-7
- Prasanth, K. V., Rajendra, T. K., Lal, A. K., Lakhotia, S. C.,** 2000: Omega speckles - a novel class of nuclear speckles containing hnRNPs associated with noncoding hsr-omega RNA in *Drosophila*. *J. Cell Sci.* 113 Pt 19: 3485-97
- Qiu, Y. H., Chen, C. N., Malone, T., Richter, L., Beckendorf, K. S., Davis, R. L.,** 1991: Characterization of the memory gene *dunce* of *Drosophila melanogaster*. *J. Mol. Biol.* 222: 553-565
- Qiu, Y., Davis, R. L.,** 1993: Genetic dissection of the learning/memory gene *dunce* of *Drosophila melanogaster*. *Genes Dev.* 7 (7B): 1447-58
- Rabin, R. A.,** 1990: Direct effects of chronic ethanol exposure on beta-adrenergic and adenosine-sensitive adenylate cyclase activities and cyclic AMP content in primary cerebellar cultures. *J. Neurochem.* 55 (1): 122-3
- Rajashekhar, K. P., Singh, R. N.,** 1994: Neuroarchitecture of the tritocerebrum of *Drosophila melanogaster*. *J. Comp. Neurol.* 349 (4): 633-45
- Rappsilber, J., Ryder, U., Lamond, A. I., Mann, M.,** 2002: Large-scale proteomic analysis of the human spliceosome. *Genome Res.* 12 (8): 1231-45
- Reuter, G., Giarre, M., Farah, J., Gausz, J., Spierer, A., Spierer, P.,** 1990: Dependence of position-effect variegation in *Drosophila* on dose of a gene encoding an unusual zinc-finger protein. *Nature* 344 (6263): 219-23
- Robinow, S., White, K.,** 1991: Characterization and spatial distribution of the ELAV protein during *Drosophila melanogaster* development. *J. Neurobiol.* 22 (5): 443-61
- Rodan, A. R., Kiger, J. A. Jr., Heberlein, U.,** 2002: Functional dissection of neuroanatomical loci regulating ethanol sensitivity in *Drosophila*. *J. Neurosci.* 22 (21): 9490-501
- Rosenberg, U.B., Schröder, C., Preiss, A., Kienlin, A., Côte, S., Riede, I. and Jäckle, H.,** 1986: Molecular genetics of *Krüppel*, a gene required for segmentation of the *Drosophila* embryo. *Nature* 313: 336-339.

- Rubin, G. M., Yandell, M. D., Wortman, J. R., Gabor Miklos, G. L., Nelson, C. R., Hariharan, I. K., Fortini, M. E., Li P. W., Apweiler, R., Fleischmann, W., Cherry, J. M., Henikoff, S., Skupski, M. P., Misra, S., Ashburner, M., Birney, E., Boquski, M. S., Brody, T., Brokstein, P., Celniker, S. E., Chervitz, S. A., Coates, D., Cravchik, A., Gabrielian, A., Galle, R. F., Gelbart, W. M., George, R. A., Goldstein, L. S., Gong, F., Guan, P., Harris, N. L., Hay, B. A., Hoskins, R. A., Li, J., Li, Z., Hynes, R. O., Jones, S. J., Kuehl, P. M., Lemaitre, B., Littleton, J. T., Morrison, D. K., Mungall, C., O'Farrell, P. H., Pickeral, O. K., Shue, C., Vossall, L. B., Zhang, J., Zhao, Q., Zheng, X. H., Lewis, S., 2000:** Comparative genomics of the eukaryotes. *Science* 287 (5461): 2204-15
- Salz, H. K., Kiger, J. A. Jr., 1984:** Genetic analysis of chromomere 3D4 in *Drosophila melanogaster*. II. Regulatory sites for the *dunce* gene. *Genetics* 108 (2): 377-92
- Saratsis, A., 2006:** Charakterisierung einer möglichen Interaktion zwischen HANGOVER und *dunce*. Diplomarbeit, Bayerische Julius-Maximilians Universität Würzburg
- Schneider A., 2008:** Untersuchungen der neuronalen Plastizität in verschiedenen Verhaltensparadigmen und zum Beitrag des Ethanolstoffwechsels zur Alkoholpräferenz in *Drosophila melanogaster*. Diplomarbeit, Bayerische Julius-Maximilians Universität Würzburg
- Scholz, H., Ramond, J., Singh, C. M, Heberlein, U., 2000:** Functional ethanol tolerance in *Drosophila*. *Neuron* 28: 261-271
- Scholz, H., Franz, M., Heberlein, U., 2005:** The *hangover* gene defines a stress pathway required for ethanol tolerance development. *Nature* 436 /7052): 845-7
- Schuckit, M. A., 1994:** Low level of response to alcohol as a predictor of future alcoholism. *Am. J. Psychiatry* 151: 184-189
- Schwärzel, M., Heisenberg, M., Zars, T., 2002:** Extinction antagonizes olfactory memory at the subcellular level. *Neuron* 35 (5): 951-60
- Schwenkert, I., Eltrop, R., Funk, N., Steinert, J. R., Schuster, C. M., Scholz, H., 2008:** The *hangover* gene negatively regulates bouton addition at the *Drosophila* neuromuscular junction. *Mech. Dev.* 125 (8): 700-11
- Sette, C., Vicini, E., Conti, M., 1994:** The ratPDE3/IVd phosphodiesterase gene codes for multiple proteins differentially activated by cAMP-dependent protein kinase. *J. Biol. Chem.* 269 (28): 18271-4
- Sette, C., Conti, M., 1996:** Phosphorylation and activation of a cAMP-specific phosphodiesterase by the cAMP-dependent protein kinase. Involvement of serine 54 in the enzyme activation. *J. Biol. Chem.* 271 (28): 16526-34
- Soerensen, J. G., Kristensen, T. N., Loeschcke, V., 2003:** The evolutionary and ecological role of heat shock proteins. *Ecol. Lett.* 6: 1025-1037
- Soller, M., White, K., 2003:** ELAV inhibits 3'-end processing to promote neural splicing of ewg pre-mRNA. *Genes Dev.* 17 (20): 2526-38

- Souness, J. E., Aldous, D., Sargent, C.,** 2000: Immunosuppressive and anti-inflammatory effects of cyclic AMP phosphodiesterase (PDE) type 4 inhibitors. *Immunopharmacology* 47 (2-3): 127-62
- Spector, D. L., Fu, X. D., Maniatis, T.,** 1991: Associations between distinct pre-mRNA splicing components and the cell nucleus. *EMBO J.* 10 (11): 3467-81
- Ho, R., Sutherland, E. W.,** 1957: cAMP-mediated feedback regulation in target cells. *Adv. Cyclic Nucleotide Res.* 5: 533-48
- Tabak, C., Smith, H. A., Räsänen, L., Fidanza, F., Menotti, A., Nissinen, A., Feskens, E. J., Heederik, D., Kromhout, D.,** 2001: Alcohol consumption in relation to 20-year COPD mortality and pulmonary function in middle-aged men from three European countries. *Epidemiology* 12 (2): 239-45
- Tabakoff, B., Melchior, C. L., Hoffman, P. L.,** 1982: Commentary on ethanol tolerance. *Alcohol Clin. Exp. Res.* 6: 252-259
- Tabakoff, B., Cornell, N., Hoffman, P. L.,** 1986: Alcohol tolerance. *Ann. Emerg. Med.* 15 (9): 1005-12
- Thiele, E., Willis, B., Stadler, J., Reynolds, J. G., Bernstein, I. L., McKnight, G. S.,** 2000: High ethanol consumption and low sensitivity to ethanol-induced sedation in protein kinase A- mutant mice. *J. of Neuroscience* 20: 1-6
- Torroja, L., Chu, H., Kotovsky, I., White, K.,** 1999: Neuronal overexpression of APPL, the *Drosophila* homologue of the amyloid precursor protein (APP), disrupts axonal transport. *Curr. Biol.* 9 (9): 489-92
- Tully, T., Quinn, W. G.,** 1985: Classical conditioning and retention in normal and mutant *Drosophila melanogaster*. *J. Comp. Physiol.* 157 (2): 263-77
- Tully, T., Preat, T., Boynton, S. C., DelVecchio, M.,** 1994: Genetic dissection of consolidated memory in *Drosophila*. *Cell* 79: 35-47
- Urizar, N. L., Yang, Z., Edenberg, H. J., Davis, R. L.,** 2007: *Drosophila* Homer is Required in a Small Set of Neurons including the Ellipsoid Body for Normal Ethanol Sensitivity and Tolerance. *J. of Neuroscience* 27: 4541-4551
- Valles, A. M., White, K.,** 1988: Serotonin-containing neurons in *Drosophila melanogaster*: development and distribution. *J. Comp. Neurol.* 268 (3): 414-28
- Wen, T., Parrish, C. A., Xu, D., Wu, Q., Shen, P.,** 2005: *Drosophila* neuropeptide F and its receptor, NPFR1, define a signaling pathway that acutely modulates alcohol sensitivity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 102 (6): 2141-6
- Wenger, J. R., Tiffany, T. M., Bombardier, C., Nicholls, K., Woods, S. C.,** 1981: Ethanol tolerance in rats is learned. *Science* 213: 575-577
- Williams, D. W., Tyrer, M., Shepherd, D.,** 2000: Tau and tau reporters disrupt central projections of sensory neurons in *Drosophila*. *J. Comp. Neurol.* 428 (4): 630-40

Worst, T. J., Vrana, K. E., 2005: Alcohol and gene expression in the central nervous system. *Alcohol* 40: 63-75

Wright, J. M., Peoples, R. W., Weight, F. F., 1996: Single-channel and whole-cell analysis of ethanol inhibition of NMDA-activated currents in cultured mouse cortical and hippocampal neurons. *Brain Res.* 738 (2): 249-56

Yannoni, Y. M., White, K., 1997: Association of the neuron-specific RNA binding domain-containing protein ELAV with the coiled body in *Drosophila* neurons. *Chromosoma* 105 (6): 332-41

Zaleski, M. J., Nunes, Filho, J., R., Lemos, T., Morato, G. S., 2001: GABA(B) receptors play a role in the development of tolerance to ethanol in mice. *Psychopharmacology* 153 (4): 415-24

Zhang, X. M., Yan, S. Q., 1997: The research progress on 5-hydroxytryptamine transporter. *Sheng Li Xue Jin Zhan* 28 (4): 345-8

Zima, T., Fialova, L., Mikulikova, L., Malbohan, I. M., Popov, P., Nespov, K., 1998: Antibodies against phospholipids and oxidized LDL in alcoholic patients. *Physiol. Res.* 47 (5): 351-5

Zink, D., Paro, R., 1995: *Drosophila* Polycomb-group regulated chromatin inhibits the accessibility of a trans-activator to its target DNA. *EMBO J.* 14 (22): 5660-71

8. Abkürzungen

AA	Aminosäure
Abb	Abbildung
ADH	Alkoholdehydrogenase
ALDH	Aldehyddehydrogenase
ARM	anaesthesia-resistant memory
ATP	Adenosintriphosphat
bp	Basenpaare
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
cDNA	komplementäre DNA
cGMP	zyklisches Guaninmonophosphat
Da	Dalton
dH ₂ O	destilliertes Wasser
DNA	Deoxyribonukleinsäure
dnc	dunce
E.coli	<i>Escherichia coli</i>
EST	expressed sequence tag
EtOH	Ethanol
Fas II	Fasciclin II
GAL4	Transkriptionsfaktor der Hefe
GFP	Green Fluoreszenzprotein
GTP	Guanintriphosphat
h	Stunde
hnRNP	<i>Heterogeneous nuclear ribonucleoproteins</i>
His	Histidin
HSP	Hitze-Schock Protein
ICG	Interchromatin Granule
Kb	Kilobasen
l	Liter
LTM	long-term memory
max.	Maximum
MCH	Methylcyclohexanol
MET	Mean Elution Time

min	Minute
ml	Milliliter
mM	Millimol
mg	Milligramm
mRNA	messenger RNA
MTM	mid-term memory
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer
NLS	Nukleäre Lokalisierungssequenz
nm	Nanometer
NMJ	Neuromuscular junction
OCT	Octanol
pAbp	PolyA binding protein
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PDE	Phosphodiesterase
PI	Performance Index
PKA	Proteinkinase
RNA	Ribonukleinsäure
ROS	reaktive oxigene Substanz
sec	Sekunde
snRNP	small nuclear ribonucleoprotein
SOG	subösophageales Ganglion
STM	short-term memory
TAT	twin-arginine translocation
Tβh	Tyramin-β-hydroxylase
UAS	upstream activator sequenz
UCR	upstream conserved region
WT	Wildtyp
ZNS	Zentrales Nervensystem

9. Anhang

9.1. Vektoren

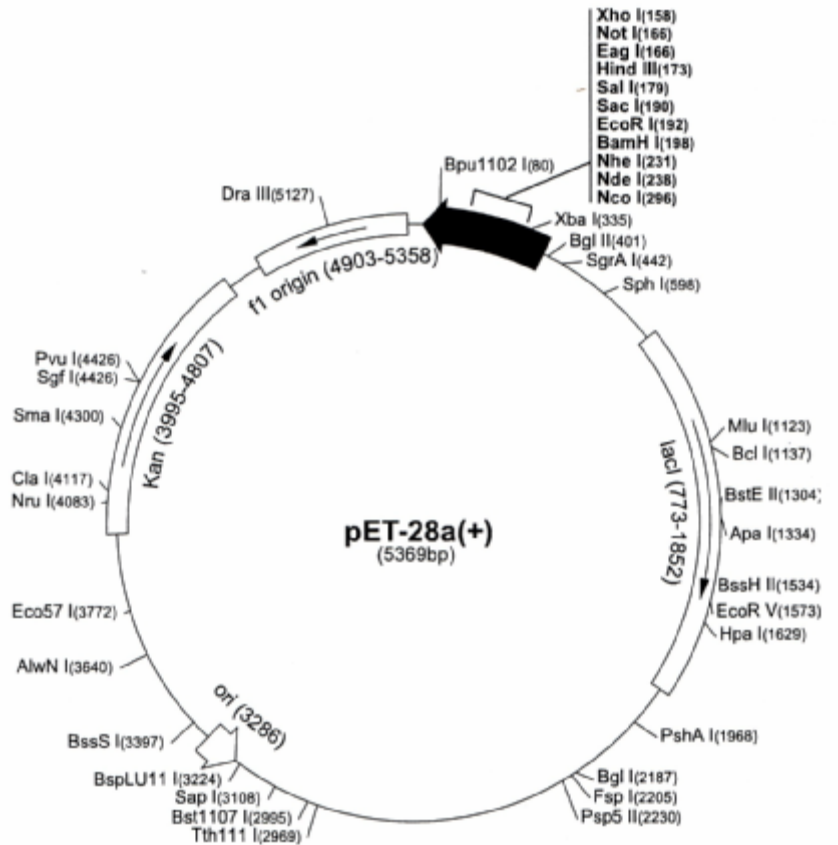
9.1.1. Der pET28 Vektor

Firma: Novagen

pET-28a(+) sequence landmarks

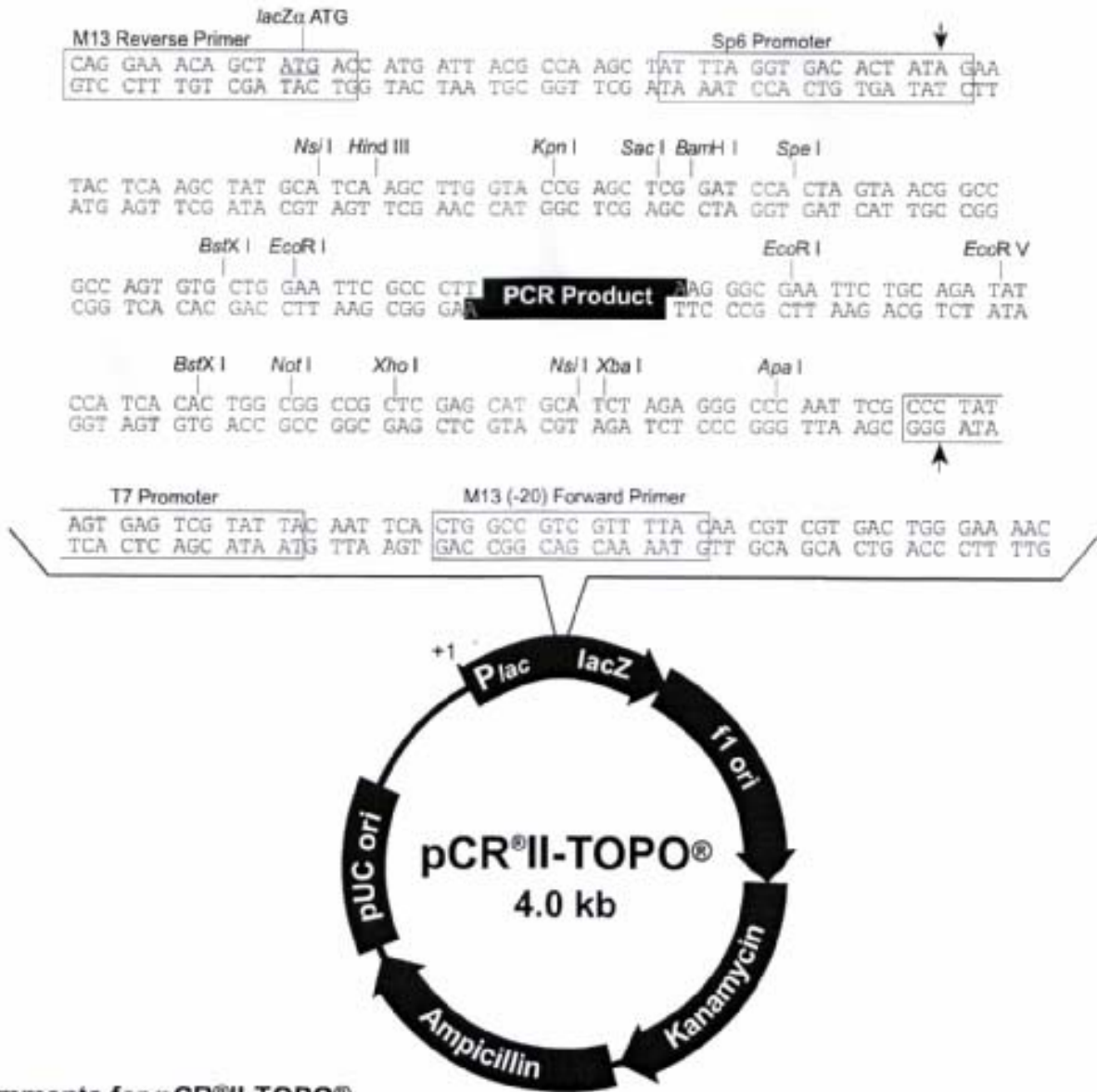
T7 promoter	370-386
T7 transcription start	369
His•Tag coding sequence	270-287
T7•Tag coding sequence	207-239
Multiple cloning sites (<i>Bam</i> H I - <i>Xho</i> I)	158-203
His•Tag coding sequence	140-157
T7 terminator	26-72
<i>lacI</i> coding sequence	773-1852
pBR322 origin	3286
Kan coding sequence	3995-4807
<i>f1</i> origin	4903-5358

The maps for pET-28b(+) and pET-28c(+) are the same as pET-28a(+) (shown) with the following exceptions: pET-28b(+) is a 5368bp plasmid; subtract 1bp from each site beyond *Bam*H I at 198. pET-28c(+) is a 5367bp plasmid; subtract 2bp from each site beyond *Bam*H I at 198.



9.1.2. Der pCR II TOPO Vektor

Firma: Invitrogen



**Comments for pCR[®]II-TOPO[®]
3973 nucleotides**

- LacZ α gene: bases 1-589
- M13 Reverse priming site: bases 205-221
- Sp6 promoter: bases 239-256
- Multiple Cloning Site: bases 269-383
- T7 promoter: bases 406-425
- M13 (-20) Forward priming site: bases 433-448
- f1 origin: bases 590-1027
- Kanamycin resistance ORF: bases 1361-2155
- Ampicillin resistance ORF: bases 2173-3033
- pUC origin: bases 3178-3851

9.2. Die Hangover Aminosäuresequenz

Die Sequenz wurde von Flybase (<http://flybase.indiana.edu>) entnommen. Die Proteindomänen wurden mithilfe von ScanProsite (<http://www.expasy.ch/tools/scanprosite/>) identifiziert.

```

cccgtttacagtcgcagatacggccacggcaattcgcagtcaggtagcgggtcatttttt
P F T V A D T P R Q F A V P V - R S F F
ttccagtgcgactcctccaaacaaaagcgaagtggaaaaataggcgaagataaaggaaac
F Q C D S S K Q K R S G K I G E D K G N
ccaagagcgaactccaaattgcgaatcagcaaaggatcaatggcaacgaaataagtaaa
P R A K L Q I A N Q Q R I N G N E I S K
agaaccagtgcgacaatgtgcgaaaagtgggaaacgcgagcggcggtcgtttccgtc
R T S A N N V R K V G N A S G V V V S V
ggagagcggataatatagcacatagtagtatattgtagtagtggtggtggtggtgga
G E R I I - H I V V Y C S S G C G W C G
acgattgcgaacggcagcagaccgaaacaaaagtgaaaacgtgcaaaaaaccaaacccaa
T I A N G R R R P K Q K - K R A K N Q T Q
aaacaaattcaaccgagaagttagaagcaagcggcgaagaagagagcagagggcgacca
K Q I Q P R S R S K R Q R R E R E G D Q
tacaagcgcacaaaatgtgcgacgctgcgggcgaacagcgcacaacaacaacagca
Y K S D K M C D A A A A T A T T T T T A
gcagtagcagcagccgctgcgaacaacaacagcatcggtagcattggaggccacagcgaca
A V A A A V A T T T A S V A L E A T A T
cagcctggaacgacaacgacgacggtagccactgcgtcagcgggaaccacatcccctgaa
Q P G T T T T T V A T A S A G T T S P E
gcgccattccaacagcagcaacagcaacatcggcgagaaacagcaacagcgaacggctg
A A I P T A A T A T S A R N S N S E R S
gcgcgacaaaactgctgtgcgctgtgcatcgcaccacaaccgaatgcatctcgatcatc
A R Q N C C R L C I A P Q T E C I S I I
aatagctatgcggccgacaaggagccgctgtccaccaagatccacaactgcgtcggcatc
N S Y A A D K E P L S T K I H N C V G I
aaggttacaccgaggatcggctgtcgcagcaaatttgccacgcctgcatcagttacctg
K V T P Q D R L S Q Q I C H A C I S Y L
aactatggcagcttcaagaaccgggtcctcagctcgaagcgaagcagcgcagctgg
N S W Q S F K N R C F S S Q A K Q R Q W
ctggataccaacaagagcaagctcctcaactacctggacctgaacagtgccgagaatggg
L D T N K S K L L N Y L D L N S A E N G
ggaggaggcttcttcgatcagcatctgcatcaacaacagcaacaccaccagcacttggag
G G G F F D Q H L H Q Q Q Q H H Q H L E
aatgagctcgaagcggagaaggagaaggcgcgccaacggccgcatcgacagccgccaac
N E L E A E K E K A T P T A A S T A A N
atattggacggcatacactcgtgaagaaacgcaaattccctaacagctctatccactgcct
I L D G I H S L K K R K S L T V Y P L P
gcgatgcccataaagatgagccgattgatacggatgacgactatcagatgaagtccata
A M P I K D E P I D T D D D Y Q M K S I
gacgagtcgatgacatggctgatcccaaatgttcctagagcgtcccagcagcaggggt
D E S D D M V D P T M F L E R S E H E G
gatgtcccgctgacggcctcggattacgactacactgcgagcagatggcgtgaatgcttcg
D V P L T A S D Y D Y T A Q H G V N A S
tccgtggctgcctcgtcggcggcaatgcgggtggccaatgtggcagccgcccgggactcc
S V A A S L P P N A V A N V A A A G D S
aagggtggcagctgcagggcctgcagcctgcagtttctaccggggccaacgcccgtcgc 1
K V A S C R A C S L Q F S T R A N A R R
cacgaaaggaatctacacccaaacctgttccagttgtccacagactccccccacaacaca
H E R N L H P N L F Q L S T D S P H N T
cccatcacaagccaacgcccgtttggctgcccgttggaaatgcaacgggcagcggct
P I T K P T P A L A A A L E M Q R A A A
gcgccggccaccgctgaggcaaactcgggcagcgggcggcgtggcgggaatatctccag
A A A T A E A N R A A G A A G G N I S T
caaaagtaccgcccaggtggtgatgaacgcgttcattaagtgcgagggcggcggctacgac
Q K Y R Q V V M N A F I K C E G G G Y D

```

Zinkfinger-
domänen:

tacgataatcccgaacagtaccgaccattgctcaccgacgacaaagtggagttcattgag
 Y D N P E Q Y R P L L T R D K V E F I E
 cagaacgatgagttcctcaggaataccagacgatgacctgccgatggtgcaacaaatac
 Q N D E F L E Q Y Q T M T C R C C N K Y
 ttcagcacgtacaagaacttcatggcgcacggttcgcaagaagtatccgcagctgccgcgc
 F S T Y K N F M A H V R K K Y P Q L P R
 aacctatgcttcaattgcctcaagatgaacgactccaaggcgctggtcatctcgcacatctg
 N L C F N C L K M N D S K A L F I S H L
 aagaagcgggaattgcataaatctcttttagagtcttgaatgcggtgctgggaaaacaacg
 K K R N C I N L F R V L N A L R G K T T
 acagtgggttgccccattgcagatgatgtggcagacgatggagcaacaggatctattcca
 T V V V P I A D D V A D D G A T G S I P
 gttgccgatgccggagcaggagtggtggccatgaatagttcccacagtgcagaccagcggga
 V A D A G A G V V A M N S P T V T A S G
 gaagttgttacaccggcgggcggtccgagcgcccagagaaactgcgcgccaaggaactt
 E V V T P G G G S E R P E K L R A K E L
 ctggtcaacaaactgtacgagtgaagctctgtcccaagggattccgcactaagcagcag 2
 L V N K L Y E C K L C P K G F R T K H E
 ttccgaacgcgatgtctacgacaagcagcagatgtccaacgcaaggataacaactcgata
 F R T H V Y D K H A D V Q R K D N N S I
 cagtgcagcttttgccgactggactttgccgatcccgttgacagacggcgctcactacaac
 Q C S F C G L D F A D P V D R R R H Y N
 aacatggactgcattgtccggctgcgctgcatgacgtgcatgccaagctggaaacgcac 3
 N M D C I V R L R C M T C D A K L E T H
 cagcgttccctcgatcatgtctaccaggatcacttggcggtgtgggtggtggcgcggtc
 Q R F L D H V Y Q D H L G G V G G G A V
 agcgacaacgcctcaccactggcagcggcggcaggagcaacagcatggaacactcg
 S D N A C S T T G S G M A R S N S M E H S
 ccgggcaaaaggagcctgctcggcgcttaggcggttggttccctcggcgaggagtcgcca
 P G K R S L L G A L G V G S S A E E S R
 agcagcagtgccgctccgcccgtgacctctacacaaaactggcgggcggtaatcaggtg
 S S S A A P P L T S T P K L A G G N Q V
 ggtggcggtggatcgaccagcgttctgcccgcgagccgctcagagctcggcgaatcgg
 G G G G S T S A S A A A A A Q S S A N R
 gatgcatccgcacccaaatcccagctacttctcccgtatgccgcaggtttgtcccatttgc 4
 D A S A P K S Q Y F S R M P Q V C P I C
 ggccagcagtagacaacaaactacaacaatgtgctgcccacatggaatcgaagcatccgaac
 G Q Q Y N N Y N N V L R H M E S K H P N
 aaactgccagagacatacaagtgcggtgcgctgcccactgggctatccccggatctcctac 5 AK1-Fragment
 K L P E T Y K C V R C G L G Y P R I S Y
 ctacgggagcacatgatcaatgtgcacggagtggaagaaccgctcactctggcggttcc
 L R E H M I N V H G V D K N R H S G G F
 gaatacactcgtgaatgcggatgcccgtgaagttggcggacggaagcagccgaacgtctac
 E Y I V N A D A V K L A D G S T P N V Y
 acgggtcgctacgattacgtgatgaaggacctgatgtcgataacaaatgatgatgaagag
 T G R Y D Y V M K D L M S I T N D D E E
 gaggagcctggcagcgtggccaagaagatgcgcctggatgacagtagcaacaacagcagc
 E E P G S V A K K M R L D D S S N N S S
 ctggtggcggtggctagccagcagaaggagtgcoccatctgcaatgcgggtgttcagcaac 6
 L V G V A S Q Q K E C P I C N A V F S N
 aacattggcctgtccaatcatatgcggttcccactatacggcctcgaatgcagtgaatgca
 N I G L S N H M R S H Y T A S N A V N A
 gccttggcggtgccaatcgaatgacacccaaatcgctaacgataaccgcaacgccagca
 A L A A A N R M T P K S L T I T A T P A
 acggattcggagttgggagttggaggaacaatgtccgagtcggctccagcaacgcctgcc
 T D S E L G V G G T M S E S A P A T P A
 aatgtgccaccggcaatggctaaccaaacgccccaggagcaggcagtttttcgcccggagc
 N V P P A M A N Q T P Q E Q A V F R R S
 cttgaccaggcagccgatcgccgcttccggcgaatgcgatgcccagatctgccagcgtcgc 7
 L D Q A A D R R F R R M R C R I C Q R R
 ttcagttcgaagaagtctctatcgctaccacatgctcaccgatcatcaggtgcagaatgtg
 F S S K K S Y R Y H M L T D H Q V Q N V
 cagttcatcaaatgcaagctgtgcaacgcagagtttgccctacgagaagggcctgaaggtg 8

Q F I K C K L C N A E F A Y E K G L K V
 catctgtttaaggtgcacggaaaggccatcaaggatgaaatgattatcaagcagttcgag
 H L F K V H G K A I K D E M I I K Q F E
 tgtgacgtttgctcgattgtctatagttcagagtcggagctgcagcagcacaacgcgagc 9
 C D V C S I V Y S S E S E L Q Q H K R S
 gttcacaagctgacatccgcctccgcttccacttcggcgtccacgtcctccaagattgac
 V H K L T S A S A S T S A S T S S K I D
 gacgactctctaattggatgatggcaagccgacatcatcggatctagctgatctctctacc
 D D S L M D D G K P T S S D L A D L S T
 ctgcgagcgggtgatcaactgcatctgctccactgtactggtaccagtgcgaagtactgt 10
 L A A G G S T A S A P L Y W Y Q C K Y C
 ccatcaaaccttaacaccaacaagaagctggccatccacatcaactcgcagtgacgagttt
 P S N F N T N K K L A I H I N S H D E F
 gactcgaacgattattcctgcaagattgcggaatgtctacagcggacgcaagagtcta 11
 D S N D Y S C K D C G N V Y S G R K S L
 tgggttcacgcgtataagaagcatccgcaagtgcccaaccagctgagtgctcgctgtgc
 W V H R Y K K H P Q V P N P A E C S L C
 cgcaaggtcttttcgaccgccagatgcacgacaaccacacaccacctgcaaccgcaag
 R K V F F D R Q M H D N H T P T C N R K
 ccgatcacctcgacaggtgccaccagcagcaggatggacaactgcattcgcaccacacg
 P I T S T G A H Q Q Q D G Q L H S H H T
 gccaaaagaacaattttccggcataagaccggcgatgacgatgacgaggaggatgacgat
 A K R T I F R H K T G D D D D E E D D D
 gagcagcagcaactggaggagagggcaaatagcgatggcaatggcaccactgtgggagtg
 E Q Q Q L E E R A N S D G N G T T V G V
 gcgtcggcagtagtgcagctgcgggcacgtcactaaagatccgcattccggaggtggcg AK3-Fragment
 A S G S T A A A G T S L K I R I P E V A
 tgcactatlttgcgggtgctcgcttcaccgaccaggagcacttttagcaagcacatccagaag 12
 C T I C G A R F T D Q E H F S K H I Q K
 cacgagcaagagctgtacgtggacaatccgctggcggcgatggtcagatgatgggcccggcg
 H E Q E L Y V D N P L A A M F D D G P A
 gatgccggtcagttccaggtggagcggcagaacgagaacggggaatacgcgtgcgatttg 13
 D A G Q F Q V E R Q N E N G E Y A C D L
 tgcgccaagacggttccccaggtgatcgcactcaaggtgcatcgcaagtggcatttcaga
 C A K T F P Q V I A L K V H R K W H F R
 ggtgatagcaagcagaaccccatcgacggcgaagcgacacagttgaccaacaacaatcac
 G D S K Q N P I D G E A T Q L T N N N H
 acaaccaacaacaacaacaactcgatgcacctccgcgagctgcatgcccgtgggctcg
 T T N N N N N N S M H L R E L H A V G L
 atgcccaaccagcagcagcagagcctcaacaactcgtgcaacagcagcatgaaccacaac
 M P N Q Q Q Q S L N N S C N S S M N H N
 aacaacagcagcagcaaccgcagcaagtcgatgaagcggaaacgtgagctgaaatgcgaa 14
 N N S S S N R S K S M K R K R E L K C E
 tactgcgctccacttcagcagcaataacaatctgcgtcgccacatgtacgagctgcac
 Y C A S T F I S N N N L R R H M Y E L H
 aaacacgaggtgaagcaatctgcccagcctccgggtgattgtggtggacgatcacctcacc
 K H E V S N L P E P P V I V V D D H L T
 tgccgtcgctgtcagttgaagttcgacacaaaggagctgtggatcgagcacaagctggcc
 C R R C Q L K F D T K E L W I E H K L A
 gatgcaaaggtggtgagcctttctgccccttccagtggggtgtgatctgtgcccggag 15
 D A K V V R P F C P F Q W G C D L C G E
 ttttgcgccaaggagaagctaatgaatcacattaacaaccatttgaaggaggagggtc Ak3-Fragment :
 Y L S R K E K L M N H I N N H L K E E V Stop
 atagtgccagtagccactaaagcggccatagagagaacagcggccatggaatcagcggca AK2-Fragment :
 I V P V A T K A A I E R T A A M E S A A Start
 gcagatgccaatgcagcggcgacactatcagcattggggcgaaggagccgaaactgaagat
 A D A N A A A T L S A L G E G A E T E D
 cagtttgacagagaaggttgaggctgcaggggcaacaacaacagataagttgacgaatccc
 Q F A A E K V E A A G A T T T D K L T N P
 gacgaggaggatagcagatgatttggatgagatagctcgggcgacgacgatgatagttcg
 D E E D S D D L D E D S S G D D D D S S
 gggacgggagatgatgacgatgacgacgacgacgatgatgaggatggcgagggtgaa
 G T G D D D D D S D D D D E D G E G E

460 470 480 490 500 510 520 530 540

dncPB TQNSSSVSVAHHRLTSSASALATSHPSNSQLLPTSKMQAEOGSGIDLQYHSRYLKNRRHTLANVRFDVENGQGARSPLEGGSPSAGLVL

dncPO TQNSSSVSVAHHRLTSSASALATSHPSNSQLLPTSKMQAEOGSGIDLQYHSRYLKNRRHTLANVRFDVENGQGARSPLEGGSPSAGLVL

dncPI PPGNRKTIILSPIHAPPGLHDMKRAQGRS...PLSPRISFPFGSDSDL...FGFDVENGQGARSPLEGGSPSAGLVL

dncPJ PPGNRKTIILSPIHAPPGLHDMKRAQGRS...PLSPRISFPFGSDSDL...FGFDVENGQGARSPLEGGSPSAGLVL

dncPK PPGNRKTIILSPIHAPPGLHDMKRAQGRS...PLSPRISFPFGSDSDL...FGFDVENGQGARSPLEGGSPSAGLVL

dncPD PPGNRKTIILSPIHAPPGLHDMKRAQGRS...PLSPRISFPFGSDSDL...FGFDVENGQGARSPLEGGSPSAGLVL

dncPC PPGNRKTIILSPIHAPPGLHDMKRAQGRS...PLSPRISFPFGSDSDL...FGFDVENGQGARSPLEGGSPSAGLVL

dncPM NNSSSCAATASEEQNSGTLTGSNGTSTSTWCGSINFLVMVCSFCCCC...YNFRNSPFDVENGQGARSPLEGGSPSAGLVL

dncPN DRRSSTATEYSVKSVTTGNTSQRRSSSGIRRYVSRMTIAGARRRTTGS...MVCFSFCCCC...YNFRNSPFDVENGQGARSPLEGGSPSAGLVL

dncPG DRRSSTATEYSVKSVTTGNTSQRRSSSGIRRYVSRMTIAGARRRTTGS...MVCFSFCCCC...YNFRNSPFDVENGQGARSPLEGGSPSAGLVL

dncPE

dncPF

dncPL

consensus>70 fdvengqgarspleggspaglvl

UCR1

Start der UAS-dnc Sequenz

550 560 570 580 590 600 610 620 630 640

dncPB QNLPQRRESFLYRSDSDFEMSPKMSRNSIASERFKQEASLIVDRSHGEDLIVTFFAQILASLRSVRNLLSLTNVPASNKSRFPNQSSS

dncPO QNLPQRRESFLYRSDSDFEMSPKMSRNSIASERFKQEASLIVDRSHGEDLIVTFFAQILASLRSVRNLLSLTNVPASNKSRFPNQSSS

dncPI QNLPQRRESFLYRSDSDFEMSPKMSRNSIASERFKQEASLIVDRSHGEDLIVTFFAQILASLRSVRNLLSLTNVPASNKSRFPNQSSS

dncPJ QNLPQRRESFLYRSDSDFEMSPKMSRNSIASERFKQEASLIVDRSHGEDLIVTFFAQILASLRSVRNLLSLTNVPASNKSRFPNQSSS

dncPK QNLPQRRESFLYRSDSDFEMSPKMSRNSIASERFKQEASLIVDRSHGEDLIVTFFAQILASLRSVRNLLSLTNVPASNKSRFPNQSSS

dncPD QNLPQRRESFLYRSDSDFEMSPKMSRNSIASERFKQEASLIVDRSHGEDLIVTFFAQILASLRSVRNLLSLTNVPASNKSRFPNQSSS

dncPC QNLPQRRESFLYRSDSDFEMSPKMSRNSIASERFKQEASLIVDRSHGEDLIVTFFAQILASLRSVRNLLSLTNVPASNKSRFPNQSSS

dncPM QNLPQRRESFLYRSDSDFEMSPKMSRNSIASERFKQEASLIVDRSHGEDLIVTFFAQILASLRSVRNLLSLTNVPASNKSRFPNQSSS

dncPN QNLPQRRESFLYRSDSDFEMSPKMSRNSIASERFKQEASLIVDRSHGEDLIVTFFAQILASLRSVRNLLSLTNVPASNKSRFPNQSSS

dncPG QNLPQRRESFLYRSDSDFEMSPKMSRNSIASERFKQEASLIVDRSHGEDLIVTFFAQILASLRSVRNLLSLTNVPASNKSRFPNQSSS

dncPE QNLPQRRESFLYRSDSDFEMSPKMSRNSIASERFKQEASLIVDRSHGEDLIVTFFAQILASLRSVRNLLSLTNVPASNKSRFPNQSSS

dncPF LNKNSASQSLPRVHVSFFNMIPSIQDDLALITLNDNRNMFSLKQSRSHGEDLIVTFFAQILASLRSVRNLLSLTNVPASNKSRFPNQSSS

dncPL

consensus>70 qnlppqrresflyrdsdfemspkmsrnsiase...eq...sl...drshgedlivtffaquilaslrsvrnllsltnvpasnksrrfpnqsss

UCR2

650 660 670 680 690 700 710 720 730

dncPB ASRSGNPPGAPLSQGEAYTRLATDTTIEELDWCLDQLETIOTHRVSVDMASLKFKRMLNKLKSHFSESSRSGNOISEYICSTFLDKQOEFDL

dncPO ASRSGNPPGAPLSQGEAYTRLATDTTIEELDWCLDQLETIOTHRVSVDMASLKFKRMLNKLKSHFSESSRSGNOISEYICSTFLDKQOEFDL

dncPI ASRSGNPPGAPLSQGEAYTRLATDTTIEELDWCLDQLETIOTHRVSVDMASLKFKRMLNKLKSHFSESSRSGNOISEYICSTFLDKQOEFDL

dncPJ ASRSGNPPGAPLSQGEAYTRLATDTTIEELDWCLDQLETIOTHRVSVDMASLKFKRMLNKLKSHFSESSRSGNOISEYICSTFLDKQOEFDL

dncPK ASRSGNPPGAPLSQGEAYTRLATDTTIEELDWCLDQLETIOTHRVSVDMASLKFKRMLNKLKSHFSESSRSGNOISEYICSTFLDKQOEFDL

dncPD ASRSGNPPGAPLSQGEAYTRLATDTTIEELDWCLDQLETIOTHRVSVDMASLKFKRMLNKLKSHFSESSRSGNOISEYICSTFLDKQOEFDL

dncPC ASRSGNPPGAPLSQGEAYTRLATDTTIEELDWCLDQLETIOTHRVSVDMASLKFKRMLNKLKSHFSESSRSGNOISEYICSTFLDKQOEFDL

dncPM ASRSGNPPGAPLSQGEAYTRLATDTTIEELDWCLDQLETIOTHRVSVDMASLKFKRMLNKLKSHFSESSRSGNOISEYICSTFLDKQOEFDL

dncPN ASRSGNPPGAPLSQGEAYTRLATDTTIEELDWCLDQLETIOTHRVSVDMASLKFKRMLNKLKSHFSESSRSGNOISEYICSTFLDKQOEFDL

dncPG ASRSGNPPGAPLSQGEAYTRLATDTTIEELDWCLDQLETIOTHRVSVDMASLKFKRMLNKLKSHFSESSRSGNOISEYICSTFLDKQOEFDL

dncPE ASRSGNPPGAPLSQGEAYTRLATDTTIEELDWCLDQLETIOTHRVSVDMASLKFKRMLNKLKSHFSESSRSGNOISEYICSTFLDKQOEFDL

dncPF ASRSGNPPGAPLSQGEAYTRLATDTTIEELDWCLDQLETIOTHRVSVDMASLKFKRMLNKLKSHFSESSRSGNOISEYICSTFLDKQOEFDL

dncPL ASRSGNPPGAPLSQGEAYTRLATDTTIEELDWCLDQLETIOTHRVSVDMASLKFKRMLNKLKSHFSESSRSGNOISEYICSTFLDKQOEFDL

consensus>70 asrsgnppgaplsqgeeytrlatdtieeldwcldqletiothrsvsdmaslkkfkrmlnkelshfseSSRSGNOISEYICSTFLDKQOEFDL

740 750 760 770 780 790 800 810 820

dncPB PSLRVEDNPPELVAAANAAGQSSAGQYARSRSRPRGPPMSQISGVKRPISHTNSFTGERLPTFGVETPRENELGTLGELDTWGIQIFSIGEFS

dncPO PSLRVEDNPPELVAAANAAGQSSAGQYARSRSRPRGPPMSQISGVKRPISHTNSFTGERLPTFGVETPRENELGTLGELDTWGIQIFSIGEFS

dncPI PSLRVEDNPPELVAAANAAGQSSAGQYARSRSRPRGPPMSQISGVKRPISHTNSFTGERLPTFGVETPRENELGTLGELDTWGIQIFSIGEFS

dncPJ PSLRVEDNPPELVAAANAAGQSSAGQYARSRSRPRGPPMSQISGVKRPISHTNSFTGERLPTFGVETPRENELGTLGELDTWGIQIFSIGEFS

dncPK PSLRVEDNPPELVAAANAAGQSSAGQYARSRSRPRGPPMSQISGVKRPISHTNSFTGERLPTFGVETPRENELGTLGELDTWGIQIFSIGEFS

dncPD PSLRVEDNPPELVAAANAAGQSSAGQYARSRSRPRGPPMSQISGVKRPISHTNSFTGERLPTFGVETPRENELGTLGELDTWGIQIFSIGEFS

dncPC PSLRVEDNPPELVAAANAAGQSSAGQYARSRSRPRGPPMSQISGVKRPISHTNSFTGERLPTFGVETPRENELGTLGELDTWGIQIFSIGEFS

dncPM PSLRVEDNPPELVAAANAAGQSSAGQYARSRSRPRGPPMSQISGVKRPISHTNSFTGERLPTFGVETPRENELGTLGELDTWGIQIFSIGEFS

dncPN PSLRVEDNPPELVAAANAAGQSSAGQYARSRSRPRGPPMSQISGVKRPISHTNSFTGERLPTFGVETPRENELGTLGELDTWGIQIFSIGEFS

dncPG PSLRVEDNPPELVAAANAAGQSSAGQYARSRSRPRGPPMSQISGVKRPISHTNSFTGERLPTFGVETPRENELGTLGELDTWGIQIFSIGEFS

dncPE PSLRVEDNPPELVAAANAAGQSSAGQYARSRSRPRGPPMSQISGVKRPISHTNSFTGERLPTFGVETPRENELGTLGELDTWGIQIFSIGEFS

dncPF PSLRVEDNPPELVAAANAAGQSSAGQYARSRSRPRGPPMSQISGVKRPISHTNSFTGERLPTFGVETPRENELGTLGELDTWGIQIFSIGEFS

dncPL PSLRVEDNPPELVAAANAAGQSSAGQYARSRSRPRGPPMSQISGVKRPISHTNSFTGERLPTFGVETPRENELGTLGELDTWGIQIFSIGEFS

consensus>70 PSLRVEDNPPELVAAANAAGQSSAGQYARSRSRPRGPPMSQISGVKRPISHTNSFTGERLPTFGVETPRENELGTLGELDTWGIQIFSIGEFS

PDEASE 1

830 840 850 860 870 880 890 900 910

dncPB VNRLTCVAYTIFQSRELLTSLMIPPKTFLNFMSTLEDHYVKDNPFHNSLHAADVTOSTNVLLNTPALEGVPTPLEVGGALFAACIHDVDFP

dncPO VNRLTCVAYTIFQSRELLTSLMIPPKTFLNFMSTLEDHYVKDNPFHNSLHAADVTOSTNVLLNTPALEGVPTPLEVGGALFAACIHDVDFP

dncPI VNRLTCVAYTIFQSRELLTSLMIPPKTFLNFMSTLEDHYVKDNPFHNSLHAADVTOSTNVLLNTPALEGVPTPLEVGGALFAACIHDVDFP

dncPJ VNRLTCVAYTIFQSRELLTSLMIPPKTFLNFMSTLEDHYVKDNPFHNSLHAADVTOSTNVLLNTPALEGVPTPLEVGGALFAACIHDVDFP

dncPK VNRLTCVAYTIFQSRELLTSLMIPPKTFLNFMSTLEDHYVKDNPFHNSLHAADVTOSTNVLLNTPALEGVPTPLEVGGALFAACIHDVDFP

dncPD VNRLTCVAYTIFQSRELLTSLMIPPKTFLNFMSTLEDHYVKDNPFHNSLHAADVTOSTNVLLNTPALEGVPTPLEVGGALFAACIHDVDFP

dncPC VNRLTCVAYTIFQSRELLTSLMIPPKTFLNFMSTLEDHYVKDNPFHNSLHAADVTOSTNVLLNTPALEGVPTPLEVGGALFAACIHDVDFP

dncPM VNRLTCVAYTIFQSRELLTSLMIPPKTFLNFMSTLEDHYVKDNPFHNSLHAADVTOSTNVLLNTPALEGVPTPLEVGGALFAACIHDVDFP

dncPN VNRLTCVAYTIFQSRELLTSLMIPPKTFLNFMSTLEDHYVKDNPFHNSLHAADVTOSTNVLLNTPALEGVPTPLEVGGALFAACIHDVDFP

dncPG VNRLTCVAYTIFQSRELLTSLMIPPKTFLNFMSTLEDHYVKDNPFHNSLHAADVTOSTNVLLNTPALEGVPTPLEVGGALFAACIHDVDFP

dncPE VNRLTCVAYTIFQSRELLTSLMIPPKTFLNFMSTLEDHYVKDNPFHNSLHAADVTOSTNVLLNTPALEGVPTPLEVGGALFAACIHDVDFP

dncPF VNRLTCVAYTIFQSRELLTSLMIPPKTFLNFMSTLEDHYVKDNPFHNSLHAADVTOSTNVLLNTPALEGVPTPLEVGGALFAACIHDVDFP

dncPL VNRLTCVAYTIFQSRELLTSLMIPPKTFLNFMSTLEDHYVKDNPFHNSLHAADVTOSTNVLLNTPALEGVPTPLEVGGALFAACIHDVDFP

consensus>70 VNRLTCVAYTIFQSRELLTSLMIPPKTFLNFMSTLEDHYVKDNPFHNSLHAADVTOSTNVLLNTPALEGVPTPLEVGGALFAACIHDVDFP

9.4. Tabellen

Tab.9.1: Relative Expressionsstärke von $dnc^{RMRA} / G6PD$ in PZ [+] und $hang^{AE10}$ Fliegen

	Mittelwert	SEM	Versuchszahl N
Relative Expression von $dnc^{RMRA} / G6PD$ in PZ[+] Fliegen	0,24	0,07	9
Relative Expression von $dnc^{RMRA} / G6PD$ in $hang^{AE10}$ Fliegen	0,28	0,07	9
$p^* \leq 0,05$; $p^{**} \leq 0,01$; $p^{***} \leq 0,001$	0,69		
Art der RNA Isolation	Gesamt-RNA aus ganzen Fliegen mit RNeasy Mini-Kit		
	Mittelwert	SEM	Versuchszahl N
Relative Expression von $dnc^{RMRA} / G6PD$ in PZ[+] Fliegen	0,41	0,09	4
Relative Expression von $dnc^{RMRA} / G6PD$ in $hang^{AE10}$ Fliegen	0,39	0,1	4
$p^* \leq 0,05$; $p^{**} \leq 0,01$; $p^{***} \leq 0,001$	0,9		
Art der RNA Isolation	mRNA aus Fliegenköpfen mit mRNA Minipräp-Kit		
	Mittelwert	SEM	Versuchszahl N
Relative Expression von $dnc^{RMRA} / G6PD$ in PZ[+] Fliegen	0,49	0,09	4
Relative Expression von $dnc^{RMRA} / G6PD$ in $hang^{AE10}$ Fliegen	0,19	0,07	4
$p^* \leq 0,05$; $p^{**} \leq 0,01$; $p^{***} \leq 0,001$	0,005		
Art der RNA Isolation	Gesamt-RNA aus Fliegenköpfen mit Trizol		

In den folgenden Tabellen sind immer die Mittelwerte und der Standardfehler (SEM) angegeben. Die Signifikanz für alle Daten wurde mithilfe des zweiseitigen Student's *t*-test ermittelt.

Tab.9.2: Werte der MET1, MET2 und Ethanol toleranz für die Fliegenlinien *Canton S*, dnc^I , w^{1118} und dnc^{A143}

	MET1±SEM [min]	<i>p</i> -Wert	MET2±SEM [min]	<i>p</i> -Wert	Toleranz±SEM [%]	<i>p</i> -Wert	N
<i>Canton S</i>	23,3 ± 0,7	0,4	29,1 ± 0,6	0,05	25,7 ± 3,3	0,04	7
dnc^I	22,3 ± 0,8		26,2 ± 1,3		17,0 ± 1,8		7
w^{1118}	21,5 ± 0,7	0,2	27,4 ± 0,7	0,6	28,1 ± 2,7	0,02	7
dnc^{A143}	22,9 ± 0,6		27,0 ± 0,3		17,9 ± 2,4		7

Tab.9.3: Ergebnisse des Hitze-Ethanol Crosstoleranz Experiments der Fliegenstämme *Canton S*, *dnc¹*, *w¹¹¹⁸* und *dnc^{A143}*

	MET1±SEM [min]	<i>p</i> -Wert	MET2±SEM [min]	<i>p</i> -Wert	Toleranz±SEM [%]	<i>p</i> -Wert	N
<i>Canton S</i>	23,3± 0,7	0,4	29,1 ± 0,6	0,05	25,7 ± 3,6	0,04	7
<i>dnc¹</i>	22,3 ± 0,9		26,2 ± 1,4		17,0 ± 1,9		7
<i>w¹¹¹⁸</i>	21,5 ± 0,7	0,2	27,4 ± 0,7	0,6	28,1 ± 2,7	0,02	7
<i>dnc^{A143}</i>	22,9 ± 0,6		27,0 ± 0,3		17,9 ± 2,4		7
	MET2±SEM HS [min]	<i>p</i> -Wert	Toleranz±SEM HS [%]	<i>p</i> -Wert			N
<i>Canton S</i>	32,7 ± 1,3	0,01	39,4 ± 4,8	0,003			7
<i>dnc¹</i>	26,6 ± 1,6		16,6 ± 3,7			7	
<i>w¹¹¹⁸</i>	29,1 ± 0,7	0,2	36,6 ± 5,8	0,02			7
<i>dnc^{A143}</i>	27,3 ± 5,7		18,7 ± 3,5			7	

Tab.9.4: Werte der MET1, MET2 und der Toleranz für den Rettungsversuch der reduzierten Toleranz in *dnc^{A143}* Mutanten

	MET1±SEM [min]	<i>p</i> -Wert 1)	<i>p</i> -Wert 2)	<i>p</i> -Wert 3)	<i>p</i> -Wert 4)	N
1) <i>w¹¹¹⁸</i> ;+; <i>dnc^{RMRA}</i> -GAL4	23,6 ± 0,5	-	0,1	0,0007	0,006	8
2) <i>w¹¹¹⁸</i> , <i>dnc^{A143}</i> ;+; <i>dnc^{RMRA}</i> -GAL4	24,7 ± 0,4	0,1	-	0,005	0,5	8
3) <i>w¹¹¹⁸</i> , <i>UAS-dnc,dnc^{A143}</i> ;+;+	27,6 ± 0,8	0,0007	0,005	-	0,03	8
4) <i>w¹¹¹⁸</i> , <i>UAS-dnc,dnc^{A143}</i> ;+; <i>dnc^{RMRA}</i> -GAL4	25,2 ± 0,6	0,006	0,5	0,03	-	8
	MET2±SEM [min]	<i>p</i> -Wert 1)	<i>p</i> -Wert 2)	<i>p</i> -Wert 3)	<i>p</i> -Wert 4)	N
1) <i>w¹¹¹⁸</i> ;+; <i>dnc^{RMRA}</i> -GAL4	30,8 ± 0,7	-	0,2	0,1	0,08	8
2) <i>w¹¹¹⁸</i> , <i>dnc^{A143}</i> ;+; <i>dnc^{RMRA}</i> -GAL4	29,4 ± 0,6	0,2	-	0,004	0,008	8
3) <i>w¹¹¹⁸</i> , <i>UAS-dnc,dnc^{A143}</i> ;+;+	32,2 ± 0,5	0,1	0,004	-	0,4	8
4) <i>w¹¹¹⁸</i> , <i>UAS-dnc,dnc^{A143}</i> ;+; <i>dnc^{RMRA}</i> -GAL4	33,3 ± 1,1	0,08	0,009	0,4	-	8
	Toleranz± SEM [%]	<i>p</i> -Wert 1)	<i>p</i> -Wert 2)	<i>p</i> -Wert 3)	<i>p</i> -Wert 4)	N
1) <i>w¹¹¹⁸</i> ;+; <i>dnc^{RMRA}</i> -GAL4	30,8 ± 1,5	-	0,003	0,0001	0,7	8
2) <i>w¹¹¹⁸</i> , <i>dnc^{A143}</i> ;+; <i>dnc^{RMRA}</i> -GAL4	19,2 ± 2,8	0,003	-	0,5	0,005	8
3) <i>w¹¹¹⁸</i> , <i>UAS-dnc,dnc^{A143}</i> ;+;+	17,3 ± 2,0	0,0001	0,5	-	0,0007	8
4) <i>w¹¹¹⁸</i> , <i>UAS-dnc,dnc^{A143}</i> ;+; <i>dnc^{RMRA}</i> -GAL4	31,9 ± 2,7	0,7	0,005	0,0007	-	8

Tab.9.5: MET2 Werte der Fliegenlinien aus Tab.9.4 nach 20 Minuten Begasung mit Ethanol in Falcon-Röhrchen (3,0/1,0)

20 min	MET2±SEM [min]	<i>p</i> -Wert 1)	<i>p</i> -Wert 2)	<i>p</i> -Wert 3)	<i>p</i> -Wert 4)	N
1) <i>w¹¹¹⁸</i> ;+; <i>dnc^{RMRA}</i> -GAL4	28,6 ± 0,6	-	0,6	0,03	1,5*10 ⁻⁵	8
2) <i>w¹¹¹⁸</i> , <i>dnc^{A143}</i> ;+; <i>dnc^{RMRA}</i> -GAL4	29,0 ± 0,7	0,6	-	0,06	5,8*10 ⁻⁵	8
3) <i>w¹¹¹⁸</i> , <i>UAS-dnc,dnc^{A143}</i> ;+;+	31,7± 1,1	0,03	0,06	-	0,05	8
4) <i>w¹¹¹⁸</i> , <i>UAS-dnc,dnc^{A143}</i> ;+; <i>dnc^{RMRA}</i> -GAL4	34,5± 0,7	1,5*10 ⁻⁵	5,8*10 ⁻⁵	0,05	-	8

Tab.9.6: Werte der MET1, MET2/ MET2HS und Toleranz/ ToleranzHS für den Rettungsversuch der reduzierten Crosstoleranz in dnc^{A143} Mutanten

	MET1±SEM [min]	p-Wert 1)	p-Wert 2)	p-Wert 3)	p-Wert 4)	N
1) $w^{1118};+;dnc^{RMRA}-GAL4$	21,9 ± 0,7	-	0,002	9,7*10 ⁻⁶	6,5*10 ⁻⁵	7
2) $w^{1118},dnc^{A143};+;dnc^{RMRA}-GAL4$	25,5 ± 0,6	0,002	-	0,003	0,05	7
3) $w^{1118},UAS-dnc,dnc^{A143};+;+$	28,0 ± 0,4	9,7*10 ⁻⁶	0,003	-	0,2	7
4) $w^{1118},UAS-dnc,dnc^{A143};+;dnc^{RMRA}-GAL4$	27,0 ± 0,5	6,5*10 ⁻⁵	0,05	0,2	-	7
	MET2±SEM [min]	p-Wert 1)	p-Wert 2)	p-Wert 3)	p-Wert 4)	N
1) $w^{1118};+;dnc^{RMRA}-GAL4$	28,7 ± 0,7	-	0,4	5,2*10 ⁻⁵	9,0*10 ⁻⁷	7
2) $w^{1118},dnc^{A143};+;dnc^{RMRA}-GAL4$	29,5 ± 0,6	0,4	-	0,0001	1,4*10 ⁻⁶	7
3) $w^{1118},UAS-dnc,dnc^{A143};+;+$	35,0 ± 0,8	5,2*10 ⁻⁵	0,0001	-	0,3	7
4) $w^{1118},UAS-dnc,dnc^{A143};+;dnc^{RMRA}-GAL4$	36,1 ± 0,4	9,0*10 ⁻⁷	1,4*10 ⁻⁶	0,3	-	7
	Toleranz±SEM [%]	p-Wert 1)	p-Wert 2)	p-Wert 3)	p-Wert 4)	N
1) $w^{1118};+;dnc^{RMRA}-GAL4$	31,9 ± 4,1	-	0,004	0,1	0,7	7
2) $w^{1118},dnc^{A143};+;dnc^{RMRA}-GAL4$	16,1 ± 1,9	0,004	-	0,006	0,0001	7
3) $w^{1118},UAS-dnc,dnc^{A143};+;+$	24,9 ± 1,9	0,1	0,006	-	0,02	7
4) $w^{1118},UAS-dnc,dnc^{A143};+;dnc^{RMRA}-GAL4$	33,5 ± 2,5	0,7	0,0001	0,02	-	7
	MET2±SEM HS [min]	p-Wert 1)	p-Wert 2)	p-Wert 3)	p-Wert 4)	N
1) $w^{1118};+;dnc^{RMRA}-GAL4$	29,3 ± 1,1		≤ 0,0004	≤ 6,1*10 ⁻⁴	≤ 2,6*10 ⁻⁵	7
2) $w^{1118},dnc^{A143};+;dnc^{RMRA}-GAL4$	35,7 ± 0,7	≤ 0,0004		≤ 0,1	≤ 0,07	7
3) $w^{1118},UAS-dnc,dnc^{A143};+;+$	37,2 ± 0,7	≤ 6,1*10 ⁻⁴	≤ 0,1		≤ 0,08	7
4) $w^{1118},UAS-dnc,dnc^{A143};+;dnc^{RMRA}-GAL4$	37,3 ± 0,5	≤ 2,6*10 ⁻⁵	≤ 0,07	≤ 0,08		7
	Toleranz±SEM HS [%]	p-Wert 1)	p-Wert 2)	p-Wert 3)	p-Wert 4)	N
1) $w^{1118};+;dnc^{RMRA}-GAL4$	33,8 ± 3,6	-	0,2	0,9	0,3	7
2) $w^{1118},dnc^{A143};+;dnc^{RMRA}-GAL4$	40,4 ± 3,3	0,2	-	0,1	0,6	7
3) $w^{1118},UAS-dnc,dnc^{A143};+;+$	32,9 ± 2,7	0,9	0,1	-	0,1	7
4) $w^{1118},UAS-dnc,dnc^{A143};+;dnc^{RMRA}-GAL4$	38,0 ± 2,4	0,3	0,6	0,1	-	7

Tab.9.7: MET1, MET2/ MET2HS und Toleranz/ ToleranzHS Werte der Überexpression von *dnc* (X. Chromosom) mit *dnc^{RMRA}-GAL4*

	MET1±SEM [min]	p-Wert 1)	p-Wert 2)	p-Wert 3)	p-Wert 4)	N
1) <i>w¹¹¹⁸</i>	18,2 ± 0,6	-	0,02	0,004	6,9*10 ⁻⁷	5
2) <i>w¹¹¹⁸;+;dnc^{RMRA}-GAL4</i>	20,2 ± 0,5	0,02	-	0,02	2,2*10 ⁻⁶	5
3) <i>w¹¹¹⁸, UAS-dnc;+;+</i>	26,2 ± 2,1	0,004	0,02	-	1,0	5
4) <i>w¹¹¹⁸, UAS-dnc;+; dnc^{RMRA}-GAL4</i>	27,2 ± 0,6	6,9*10 ⁻⁷	2,2*10 ⁻⁶	1,0	-	5
	MET2±SEM [min]	p-Wert 1)	p-Wert 2)	p-Wert 3)	p-Wert 4)	N
1) <i>w¹¹¹⁸</i>	23,2 ± 0,9	-	0,1	0,003	0,0002	5
2) <i>w¹¹¹⁸;+;dnc^{RMRA}-GAL4</i>	25,0 ± 0,7	0,1	-	0,07	0,0008	5
3) <i>w¹¹¹⁸, UAS-dnc;+;+</i>	30,1 ± 2,4	0,003	0,07	-	0,7	5
4) <i>w¹¹¹⁸, UAS-dnc;+; dnc^{RMRA}-GAL4</i>	31,2 ± 1,1	0,0002	0,0008	0,7	-	5
	Toleranz±SEM [%]	p-Wert 1)	p-Wert 2)	p-Wert 3)	p-Wert 4)	N
1) <i>w¹¹¹⁸</i>	27,8 ± 3,1	-	0,4	0,006	0,03	5
2) <i>w¹¹¹⁸;+;dnc^{RMRA}-GAL4</i>	23,6 ± 3,1	0,4	-	0,04	0,1	5
3) <i>w¹¹¹⁸, UAS-dnc;+;+</i>	14,8 ± 2,0	0,006	0,04	-	0,1	5
4) <i>w¹¹¹⁸, UAS-dnc;+; dnc^{RMRA}-GAL4</i>	14,8 ± 4,0	0,03	0,1	0,1	-	5
	MET2±SEM HS [min]	p-Wert 1)	p-Wert 2)	p-Wert 3)	p-Wert 4)	N
1) <i>w¹¹¹⁸</i>	25,5 ± 0,8	-	0,04	3,6*10 ⁻⁵	0,0003	5
2) <i>w¹¹¹⁸;+;dnc^{RMRA}-GAL4</i>	28,1 ± 0,6	0,04	-	7,8*10 ⁻⁵	0,0008	5
3) <i>w¹¹¹⁸, UAS-dnc;+;+</i>	39,5 ± 1,3	3,6*10 ⁻⁵	7,8*10 ⁻⁵	-	0,3	5
4) <i>w¹¹¹⁸, UAS-dnc;+; dnc^{RMRA}-GAL4</i>	36,8 ± 1,6	0,0003	0,0008	0,3	-	5
	Toleranz±SEM HS [%]	p-Wert 1)	p-Wert 2)	p-Wert 3)	p-Wert 4)	N
1) <i>w¹¹¹⁸</i>	41 ± 5,2	-	0,7	0,1	0,6	5
2) <i>w¹¹¹⁸;+;dnc^{RMRA}-GAL4</i>	39,2 ± 1,6	0,7	-	0,07	0,7	5
3) <i>w¹¹¹⁸, UAS-dnc;+;+</i>	66,4 ± 8,6	0,1	0,07	-	0,09	5
4) <i>w¹¹¹⁸, UAS-dnc;+; dnc^{RMRA}-GAL4</i>	36,7 ± 7,0	0,6	0,7	0,09	-	5

Tab.9.8: Werte der MET1, der MET2 und der Toleranz für die Überexpression von *dnc* (*UAS-dnc*: 3. Chromosom) mit *dnc^{RMRA}-GAL4*

	MET1±SEM [min]	p-Wert 1)	p-Wert 2)	p-Wert 3)	p-Wert 4)	N
1) <i>w¹¹¹⁸</i>	20,6 ± 0,6	-	0,02	0,3	0,01	6
2) <i>w¹¹¹⁸;+;dnc^{RMRA}-GAL4</i>	23,3 ± 0,8	0,02	-	0,3	0,1	6
3) <i>w¹¹¹⁸,UAS-dnc;+;+</i>	22,0 ± 1,0	0,3	0,3	-	0,04	6
4) <i>w¹¹¹⁸,UAS-dnc;+; dnc^{RMRA}-GAL4</i>	27,2 ± 2,1	0,01	0,1	0,04	-	6
	MET2±SEM [min]	p-Wert 1)	p-Wert 2)	p-Wert 3)	p-Wert 4)	N
1) <i>w¹¹¹⁸</i>	24,5 ± 0,7	-	0,003	0,03	0,002	6
2) <i>w¹¹¹⁸;+;dnc^{RMRA}-GAL4</i>	28,8 ± 0,8	0,003	-	0,3	0,1	6
3) <i>w¹¹¹⁸,UAS-dnc;+;+</i>	27,5 ± 0,9	0,03	0,3	-	0,4	6
4) <i>w¹¹¹⁸,UAS-dnc;+; dnc^{RMRA}-GAL4</i>	31,7 ± 1,5	0,002	0,1	0,04	-	6
	Toleranz± SEM [%]	p-Wert 1)	p-Wert 2)	p-Wert 3)	p-Wert 4)	N
1) <i>w¹¹¹⁸</i>	19,1 ± 1,6	-	0,1	0,06	0,8	6
2) <i>w¹¹¹⁸;+;dnc^{RMRA}-GAL4</i>	23,9 ± 2,5	0,1	-	0,6	0,3	6
3) <i>w¹¹¹⁸,UAS-dnc;+;+</i>	25,6 ± 2,6	0,06	0,6	-	0,2	6
4) <i>w¹¹¹⁸,UAS-dnc;+; dnc^{RMRA}-GAL4</i>	17,9 ± 4,6	0,8	0,3	0,2	-	6

Tab.9.9: MET1, MET2 und Toleranz Werte der Überexpression von *rutabaga* mit *dnc^{RMRA}-GAL4*

	MET1±SEM [min]	p-Wert 1)	p-Wert 2)	p-Wert 3)	p-Wert 4)	N
1) <i>w¹¹¹⁸</i>	22,4 ± 0,6	-	0,03	0,9	0,07	22
2) <i>w¹¹¹⁸;+;dnc^{RMRA}-GAL4</i>	24,3 ± 0,6	0,03	-	0,05	0,6	22
3) <i>w¹¹¹⁸,UAS-rutabaga;+;+</i>	22,3 ± 0,8	0,9	0,05	-	0,04	22
4) <i>w¹¹¹⁸,UAS-rutabaga;+; dnc^{RMRA}-GAL4</i>	23,9 ± 0,6	0,07	0,6	0,1	-	22
	MET2±SEM [min]	p-Wert 1)	p-Wert 2)	p-Wert 3)	p-Wert 4)	N
1) <i>w¹¹¹⁸</i>	28,0 ± 0,6	-	0,003	0,6	0,0008	22
2) <i>w¹¹¹⁸;+;dnc^{RMRA}-GAL4</i>	30,9 ± 0,7	0,003	-	0,02	0,8	22
3) <i>w¹¹¹⁸,UAS-rutabaga;+;+</i>	28,4 ± 0,7	0,6	0,02	-	0,008	22
4) <i>w¹¹¹⁸,UAS-rutabaga;+; dnc^{RMRA}-GAL4</i>	31,2 ± 0,7	0,0008	0,8	0,008	-	22
	Toleranz± SEM [%]	p-Wert 1)	p-Wert 2)	p-Wert 3)	p-Wert 4)	N
1) <i>w¹¹¹⁸</i>	25,5 ± 1,7	-	0,4	0,2	0,03	22
2) <i>w¹¹¹⁸;+;dnc^{RMRA}-GAL4</i>	27,8 ± 2,2	0,4	-	0,8	0,3	22
3) <i>w¹¹¹⁸,UAS-rutabaga;+;+</i>	28,7 ± 1,9	0,2	0,8	-	0,4	22
4) <i>w¹¹¹⁸,UAS-rutabaga;+; dnc^{RMRA}-GAL4</i>	30,7 ± 1,6	0,03	0,3	0,4	-	22

Tab.9.10: Werte der MET1, MET2 und der Toleranz für die Überexpression von *pka-c* mit *dnc^{RMRA}-GAL4*

	MET1±SEM [min]	p-Wert 1)	p-Wert 2)	p-Wert 3)	p-Wert 4)	N
1) <i>w¹¹¹⁸</i>	20,5 ± 0,7	-	0,03	0,6	3,2*10 ⁻⁵	10
2) <i>w¹¹¹⁸;+;dnc^{RMRA}-GAL4</i>	22,6 ± 0,6	0,03	-	0,2	0,001	10
3) <i>w¹¹¹⁸,UAS-pka-c;+;+</i>	21,2 ± 1,0	0,6	0,2	-	0,0008	10
4) <i>w¹¹¹⁸,UAS-pka-c;+; dnc^{RMRA}-GAL4</i>	26,7 ± 0,9	3,2*10 ⁻⁵	0,001	0,0008	-	10
	MET2±SEM [min]	p-Wert 1)	p-Wert 2)	p-Wert 3)	p-Wert 4)	N
1) <i>w¹¹¹⁸</i>	25,4 ± 0,8	-	0,3	0,04	9,7*10 ⁻⁶	10
2) <i>w¹¹¹⁸;+;dnc^{RMRA}-GAL4</i>	26,6 ± 0,9	0,3	-	0,4	0,002	10
3) <i>w¹¹¹⁸,UAS-pka-c;+;+</i>	27,8 ± 0,8	0,04	0,4	-	0,0007	10
4) <i>w¹¹¹⁸,UAS-pka-c;+; dnc^{RMRA}-GAL4</i>	33,1 ± 1,0	9,7*10 ⁻⁶	0,0002	0,0007	-	10
	Toleranz± SEM [%]	p-Wert 1)	p-Wert 2)	p-Wert 3)	p-Wert 4)	N
1) <i>w¹¹¹⁸</i>	24,4 ± 4,2	-	0,2	0,2	1,0	10
2) <i>w¹¹¹⁸;+;dnc^{RMRA}-GAL4</i>	17,7 ± 3,4	0,2	-	0,01	0,2	10
3) <i>w¹¹¹⁸,UAS-pka-c;+;+</i>	32,6 ± 4,1	0,2	0,01	-	0,2	10
4) <i>w¹¹¹⁸,UAS-pka-c;+; dnc^{RMRA}-GAL4</i>	24,5 ± 3,7	1,0	0,2	0,2	-	10

Tab.9.11: Ergebnisse der Expression von *hang* mit *dnc^{RMRA}-GAL4*, *tub-GAL80* im *hang^{AE10}* mutanten Hintergrund

	MET1±SEM [min]	p-Wert	MET2±SEM [min]	p-Wert	Toleranz±SEM [%]	p-Wert	N
<i>w¹¹¹⁸,UAS-hang,hang^{AE10}; +;dnc^{RMRA}-GAL4,tub- GAL80 HS</i>	21,4 ± 0,5	0,6	24,0 ± 0,8	0,1	11,7 ± 2,1	0,03	7
<i>w¹¹¹⁸,UAS-hang,hang^{AE10}; +;dnc^{RMRA}-GAL4,tub- GAL80 HS+</i>	21,9 ± 0,6		25,8 ± 0,8		18,1 ± 1,6		7
<i>w¹¹¹⁸,hang^{AE10};+;dnc^{RMRA}- GAL4,tub-GAL80 HS-</i>	24,6 ± 1,5	-	27,0 ± 0,8	-	10,1 ± 4,0	-	3
<i>w¹¹¹⁸,hang^{AE10};+;dnc^{RMRA}- GAL4,tub-GAL80 HS+</i>	31,2 ± 0,6		31,4 ± 1,3		0,6 ± 2,9		3

Tab.9.12: Werte für den Rettungsversuch der reduzierten Toleranz in *hang^{AE10}* Fliegen durch Expression von *UAS-dnc* mit *dnc^{RMRA}-GAL4*

	MET1±SEM [min]	p-Wert 1)	p-Wert 2)	p-Wert 3)	p-Wert 4)	N
1) <i>w¹¹¹⁸;+;dnc^{RMRA}-GAL4</i>	22,2 ± 1,3	-	0,1	0,2	0,1	4
2) <i>w¹¹¹⁸,hang^{AE10};+;dnc^{RMRA}-GAL4</i>	18,4 ± 1,6	0,1	-	0,6	0,7	4
3) <i>w¹¹¹⁸,UAS-dnc,hang^{AE10};+;+</i>	19,4 ± 1,3	0,2	0,6	-	0,9	4
4) <i>w¹¹¹⁸,UAS-dnc,hang^{AE10};+; dnc^{RMRA}-GAL4</i>	19,2 ± 0,7	0,1	0,7	0,9	-	4
	MET2±SEM [min]	p-Wert 1)	p-Wert 2)	p-Wert 3)	p-Wert 4)	N
1) <i>w¹¹¹⁸;+;dnc^{RMRA}-GAL4</i>	30,9 ± 1,3	-	0,001	0,004	0,003	4
2) <i>w¹¹¹⁸,hang^{AE10};+;dnc^{RMRA}-GAL4</i>	21,7 ± 0,9	0,001	-	0,5	0,3	4
3) <i>w¹¹¹⁸,UAS-dnc,hang^{AE10};+;+</i>	22,8 ± 1,2	0,004	0,5	-	0,9	4
4) <i>w¹¹¹⁸,UAS-dnc,hang^{AE10};+; dnc^{RMRA}-GAL4</i>	23,1 ± 0,9	0,003	0,3	0,9	-	4
	Toleranz± SEM [%]	p-Wert 1)	p-Wert 2)	p-Wert 3)	p-Wert 4)	N
1) <i>w¹¹¹⁸;+;dnc^{RMRA}-GAL4</i>	39,6 ± 2,9	-	0,01	0,0009	0,0008	4
2) <i>w¹¹¹⁸,hang^{AE10};+;dnc^{RMRA}-GAL4</i>	19,4 ± 5,1	0,01	-	0,8	0,9	4
3) <i>w¹¹¹⁸,UAS-dnc,hang^{AE10};+;+</i>	17,7 ± 2,1	0,0009	0,8	-	0,4	4
4) <i>w¹¹¹⁸,UAS-dnc,hang^{AE10};+; dnc^{RMRA}-GAL4</i>	20,0 ± 1,1	0,0008	0,9	0,4	-	4

Tab.9.13: MET1, MET2 und Toleranzwerte des Komplementationstestes von heterozygoten *hang^{AE10}* und *dnc^{A143}* Weibchen

	MET1±SEM [min]	p-Wert 1)	p-Wert 2)	p-Wert 3)	p-Wert 4)	N
1) <i>w¹¹¹⁸,hang^{AE10}/+</i>	18,4 ± 0,6	-	0,0004	0,03	-	9
2) <i>w¹¹¹⁸,dnc^{A143}/+</i>	21,9 ± 0,5	0,0004	-	0,08	-	9
3) <i>w¹¹¹⁸,hang^{AE10}/w¹¹¹⁸,dnc^{A143}</i>	20,4 ± 0,6	0,03	0,08	-	-	9
4) <i>w¹¹¹⁸</i>	22,3 ± 0,7	-	-	-	-	9
	MET2±SEM [min]	p-Wert 1)	p-Wert 2)	p-Wert 3)	p-Wert 4)	N
1) <i>w¹¹¹⁸,hang^{AE10}/+</i>	24,6 ± 0,7	-	0,0003	0,006	-	9
2) <i>w¹¹¹⁸,dnc^{A143}/+</i>	29,2 ± 0,7	0,0003	-	0,6	-	9
3) <i>w¹¹¹⁸,hang^{AE10}/w¹¹¹⁸,dnc^{A143}</i>	28,5 ± 1,0	0,006	0,6	-	-	9
4) <i>w¹¹¹⁸</i>	28,1 ± 0,7	-	-	-	-	9
	Toleranz± SEM [%]	p-Wert 1)	p-Wert 2)	p-Wert 3)	p-Wert 4)	N
1) <i>w¹¹¹⁸,hang^{AE10}/+</i>	33,8 ± 1,5	-	0,9	0,025	-	9
2) <i>w¹¹¹⁸,dnc^{A143}/+</i>	33,5 ± 2,0	0,9	-	0,04	-	9
3) <i>w¹¹¹⁸,hang^{AE10}/w¹¹¹⁸,dnc^{A143}</i>	39,4 ± 1,7	0,025	0,04	-	-	9
4) <i>w¹¹¹⁸</i>	26,4 ± 2,1	-	-	-	-	9

Tab.9.14: Werte für die Kinetik der Toleranzentwicklung von dnc^{A143} und $hang^{AE10}$

		MET1±SEM [min]	p-Wert	MET2±SEM [min]	p-Wert	Toleranz±SEM [%]	p-Wert	N
w^{1118}	2 h	20,7 ± 0,5	0,002	26,9 ± 0,4	0,9	28,8 ± 1,8	0,0002	13
dnc^{A143}	2 h	22,6 ± 0,3		27,0 ± 0,5		18,8 ± 1,5		13
w^{1118}	4 h	21,5 ± 0,7	0,007	27,4 ± 0,7	0,07	28,1 ± 2,7	0,03	7
dnc^{A143}	4 h	22,9 ± 0,6		27,0 ± 0,3		17,9 ± 2,4		7
w^{1118}	16 h	20,7 ± 0,5	0,1	24,1 ± 0,9	0,3	16,5 ± 3,1	0,9	12
dnc^{A143}	16 h	22,2 ± 0,8		25,7 ± 1,4		15,8 ± 4,2		12
PZ [+]	2 h	20,1 ± 0,4	7,1*10 ⁻⁹	26,4 ± 0,5	3,1*10 ⁻¹²	32,1 ± 1,5	4,1*10 ⁻⁷	12
$hang^{AE10}$	2 h	15,4 ± 0,3		17,8 ± 0,4		15,5 ± 1,8		12
PZ [+]	4 h	22,0 ± 0,9	9,3*10 ⁻⁵	29,3 ± 1,6	9,8*10 ⁻⁵	33,2 ± 2,7	0,0004	5
$hang^{AE10}$	4 h	15,5 ± 0,2		17,9 ± 0,3		15,8 ± 1,5		5
PZ [+]	16 h	20,7 ± 0,6	0,0001	25,6 ± 0,5	7,7*10 ⁻¹⁰	24,1 ± 3,5	8,2*10 ⁻⁵	8
$hang^{AE10}$	16 h	16,6 ± 0,5		16,8 ± 0,4		1,5 ± 2,2		8

Tab.9.15: PI-Werte für 2 min, 30 min und 180 min Gedächtnis von *Canton S*, dnc^1 , w^{1118} und dnc^{A143}

	2 min PI±SEM [%]	p-Wert	N	30 min PI±SEM [%]	p-Wert	N	180 min PI±SEM [%]	p-Wert	N
<i>Canton S</i>	0,61 ± 0,05	0,01	9	0,51 ± 0,03	0,003	12	0,34 ± 0,05	0,05	15
dnc^1	0,43 ± 0,05		9	0,36 ± 0,03		12	0,20 ± 0,04		15
w^{1118}	0,48 ± 0,06	0,009	9	0,48 ± 0,03	0,00000	12	0,18 ± 0,04	0,6	15
dnc^{A143}	0,29 ± 0,03		9	0,22 ± 0,30		5	12		0,21 ± 0,4

Tab.9.16: Schock- und Duftwahrnehmung von *Canton S*, dnc^1 , w^{1118} und dnc^{A143}

	Schock PI±SEM [%]	p-Wert	N	MCH-Duft PI±SEM [%]	p-Wert	N	OCT-Duft PI±SEM [%]	p-Wert	N
<i>Canton S</i>	-0,67 ± 0,07	0,6	9	-0,36 ± 0,07	0,6	11	-0,38 ± 0,05	0,9	11
dnc^1	-0,62 ± 0,06		9	-0,32 ± 0,06		11	-0,36 ± 0,07		11
w^{1118}	-0,65 ± 0,05	0,6	9	-0,26 ± 0,06	0,4	11	-0,22 ± 0,05	0,6	11
dnc^{A143}	-0,59 ± 0,08		9	-0,18 ± 0,05		11	-0,18 ± 0,05		11

Tab.9.17: PI-Werte für 2 min Gedächtnis von w^{1118} und $w^{1118}, hang^{AE10}$

	2 min PI±SEM [%]	p-Wert	N
w^{1118}	0,39 ± 0,05	0,5	10
$w^{1118}, hang^{AE10}$	0,34 ± 0,04		10

Tab.9.18: Schock- und Duftwahrnehmung von w^{1118} und $w^{1118}, hang^{AE10}$

	Schock PI±SEM [%]	p-Wert	N	MCH-Duft PI±SEM [%]	p-Wert	N	OCT-Duft PI±SEM [%]	p-Wert	N
w^{1118}	-0,52 ± 0,05	0,1	8	-0,29 ± 0,08	0,8	12	-0,37 ± 0,07	0,6	12
$w^{1118}, hang^{AE10}$	-0,41 ± 0,04		8	-0,33 ± 0,08		12	-0,32 ± 0,08		12

Tab.9.19: PI-Werte für den Rettungsversuch des reduzierten Kurzzeitgedächtnisses in *dnc^{A143}* Fliegen

	2 min PI±SEM [%]	p-Wert 1)	p-Wert 2)	p-Wert 3)	p-Wert 4)	N
1) <i>w¹¹¹⁸;+;dnc^{RMRA}-GAL4</i>	0,45 ± 0,03	-	0,00006	0,1	0,008	12
2) <i>w¹¹¹⁸,dnc^{A143};+;dnc^{RMRA}-GAL4</i>	0,25 ± 0,03	0,00006	-	-	0,4	12
3) <i>w¹¹¹⁸,UAS-dnc,dnc^{A143};+;+</i>	0,30 ± 0,04	0,1	-	-	0,4	12
4) <i>w¹¹¹⁸,UAS-dnc,dnc^{A143};+; dnc^{RMRA}-GAL4</i>	0,35 ± 0,05	0,008	0,4	0,4	-	12

Tab.9.20: Schock- und Duftwahrnehmung der verwendeten Fliegenstöcke für den Rettungsversuch des reduzierten Kurzzeitgedächtnisses in *dnc^{A143}* Mutanten

	Schock PI±SEM [%]	p-Wert 1)	p-Wert 2)	p-Wert 3)	p-Wert 4)	N
1) <i>w¹¹¹⁸;+;dnc^{RMRA}-GAL4</i>	-0,60 ± 0,05	-	0,6	0,8	0,04	12
2) <i>w¹¹¹⁸,dnc^{A143};+;dnc^{RMRA}-GAL4</i>	-0,57 ± 0,03	0,6	-	0,5	0,05	12
3) <i>w¹¹¹⁸,UAS-dnc,dnc^{A143};+;+</i>	-0,43 ± 0,06	0,8	0,5	-	0,03	12
4) <i>w¹¹¹⁸,UAS-dnc,dnc^{A143};+; dnc^{RMRA}-GAL4</i>	-0,62 ± 0,05	0,04	0,05	0,03	-	12
	MCH-Duft PI±SEM [%]	p-Wert 1)	p-Wert 2)	p-Wert 3)	p-Wert 4)	N
1) <i>w¹¹¹⁸;+;dnc^{RMRA}-GAL4</i>	-0,26 ± 0,06	-	0,1	0,1	0,04	12
2) <i>w¹¹¹⁸,dnc^{A143};+;dnc^{RMRA}-GAL4</i>	-0,38 ± 0,05	0,1	-	0,0009	0,0005	12
3) <i>w¹¹¹⁸,UAS-dnc,dnc^{A143};+;+</i>	-0,07 ± 0,06	0,1	0,0009	-	0,5	12
4) <i>w¹¹¹⁸,UAS-dnc,dnc^{A143};+; dnc^{RMRA}-GAL4</i>	-0,12 ± 0,05	0,04	0,0005	0,5	-	12
	OCT-Duft PI±SEM [%]	p-Wert 1)	p-Wert 2)	p-Wert 3)	p-Wert 4)	N
1) <i>w¹¹¹⁸;+;dnc^{RMRA}-GAL4</i>	-0,30 ± 0,04	-	0,3	0,2	1,0	12
2) <i>w¹¹¹⁸,dnc^{A143};+;dnc^{RMRA}-GAL4</i>	-0,23 ± 0,05	0,3	-	0,4	0,4	12
3) <i>w¹¹¹⁸,UAS-dnc,dnc^{A143};+;+</i>	-0,23 ± 0,05	0,2	0,4	-	0,3	12
4) <i>w¹¹¹⁸,UAS-dnc,dnc^{A143};+; dnc^{RMRA}-GAL4</i>	-0,30 ± 0,06	1,0	0,4	0,3	-	12

10. Danksagung

Danke an...

- ein ganz großes Dankeschön geht an Henrike Scholz für die Betreuung und Korrektur meiner Doktorarbeit
- Vielen Dank an Herrn Prof. Georg Krohne für die Übernahme des Zweitgutachtens
- Erich und Herrn Prof. Heisenberg für ihre Unterstützung und Hilfsbereitschaft
- Hiromu Tanimoto und Stephan Knappek für die Hilfe bei den Lernversuchen an der Tully Maschine, Anastasios Saratsis für seine Mitarbeit am *dunce* Projekt, speziell für die Herstellung der *dnc*^{A143} Mutante und der *dnc*^{RMRA}-GAL4 Linie
- Martin Schwärzel, Herrn Prof. Saumweber und Herrn Prof. Zars für die Bereitstellung von Fliegenlinien bzw. Antikörpern
- Ein ganz besonderer Dank geht an Andrea und Andrea ohne deren Hilfe ich meinen Abgabetermin vielleicht nicht hätte einhalten können und an Gertrud, die mir vor allem bei den in-situ Hybridisierungen viel Arbeit abgenommen hat
- Dieter für die tollen Gefrierschnitte und Tulip für die Korrektur des Summary
- Steffi, Vanessa, Yvonne, Suse, Tom, Tom, Stefan, Alice, Dan, Mareike, Benjamin, Dennis, Birgit, und Tilman für lustige Arbeitstage, noch bessere Nächte im Zauberberg und sehr beruhigende Lachanfänge in Cold Spring Harbor...
- Alle anderen im unteren Gang und der oberen Etage des Lehrstuhls (vor allem dem Sekretariat), für eine super Arbeitsatmosphäre und eine immerwährende Hilfsbereitschaft

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Mirjam Daniela Franz
 Anschrift: Korngasse 10
 97070 Würzburg
 Geburtsdatum/ -ort: 16.09.1976 in Weiden
 Nationalität: deutsch
 Familienstand: ledig

Schulbildung:

09/ 1983-07/ 1987 Grundsule Ketschendorf, Coburg
 09/ 1987-06/ 1996 Gymnasium Alexandrinum, Coburg

Hochschulstudium

11/ 1996-08/ 1998 Studium der Betriebswirtschaftslehre an der Otto-Friedrich-Universität Bamberg
 09/ 1998-10/ 2001 Studium der Biologie an der Universität Bayreuth (Grundstudium)
 10/ 2001-10/ 2004 Studium der Biologie an der Julius-Maximilians-Universität Würzburg (Hauptstudium)
Schwerpunkte: Genetik, Virologie und Immunologie, Pflanzenphysiologie und Biophysik
Diplomarbeit:
 Identifizierung des zellulären Prozesses in dem *hangover* eine Funktion hat.
 11/ 2004-12/ 2008 Promotionsarbeit an der Julius-Maximilians-Universität Würzburg, Lehrstuhl für Genetik und Neurobiologie, Theodor-Boveri-Institut. Titel:

Würzburg, den 19.12.2008

Publikationen:

Scholz, H., Franz, M., Heberlein, U., (2005): The *hangover* gene defines a stress pathway required for ethanol tolerance development. *Nature* 436, 845 - 7

Franz, M., Klebes, A., Saratsis, A., Scholz, H., (2008): Transcript specific regulation of the phosphodiesterase *dunce* is required for ethanol tolerance in *Drosophila*.

Konferenzbeiträge:

Franz, M., Klebes, A., Scholz, H.: Verhalten sich betrunkene Fruchtfliegen ähnlich wie Alkohol trinkende Menschen – Ein neurogenetisches Tiermodell. *Vortrag auf der 16. wissenschaftlichen Tagung der DG – Sucht, Regensburg, Deutschland, 2006.*

Franz, M., Klebes, A., Saratsis, A., Scholz, H.: Functional analysis of Hangover, a protein required for ethanol tolerance. *Posterpräsentation auf 11th European Drosophila Neurobiology meeting, Leuven, Belgien, 2006.*

Franz, M., Klebes, A., Saratsis, A., Scholz, H.: The learning mutant *dunce* is impaired in ethanol tolerance. *Posterpräsentation auf 31th Göttingen Neurobiology Conference, Göttingen, Deutschland, 2007.*

Franz, M., Klebes, A., Saratsis, A., Scholz, H.: A specific *dunce* transcript is a target of the RNA modifying protein Hangover. *Vortrag auf Cold Spring Harbor Conference on Neurobiology of Drosophila, Cold Spring Harbor, USA, 2007.*

Franz, M., Klebes, A., Saratsis, A., Scholz, H.: A specific *dunce* transcript is a target of the RNA modifying protein Hangover. *Posterpräsentation auf der Kleinst – Hirn – Konferenz, Tutzingen, Deutschland, 2007*

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, dass ich die vorliegende Dissertation selbständig verfasst habe und keine anderen Hilfsmittel als die angegebenen angewandt wurden. Alle aus der Literatur entnommenen Stellen und Abbildungen sind als solche kenntlich gemacht. Die Dissertation wurde weder in gleicher noch in ähnlicher Form bereits in einem anderen Prüfungsverfahren vorgelegt. Zuvor habe ich keine akademischen Grade erworben oder zu erwerben versucht.

Würzburg, den 19.12.2008

Mirjam Franz