

Zellautonome, homöostatische Regulation der
elektrischen Erregbarkeit von Körperwandmuskelzellen
der Taufliege *Drosophila melanogaster*

Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades

Dr. rer. nat.

der Fakultät für Naturwissenschaften
der Universität Ulm

vorgelegt von

Mario Wanischeck

aus Wesel

4. Juni 2008

Amtierender Dekan: Prof. Dr. Klaus-Dieter Spindler

Erstgutachter: Prof. Dr. Harald Wolf

Zweitgutachter: Prof Dr. Günter Kämper

Tag der Abgabe: 31.03.2008

Tag der Prüfung: 30.05.2008

Widmung

Andreja
und
meinen Großeltern

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	xi
1 Zusammenfassung	1
2 Einleitung	3
2.1 Homöostatische Regulation	3
2.1.1 Variabilität der elektrischen Erregbarkeit	4
2.1.1.1 Wachstum	4
2.1.1.2 Lernen	5
2.1.2 Mechanismen der neuronalen Homöostase	8
2.1.2.1 Synaptische Plastizität	8
2.1.2.2 Regulation der intrinsischen Eigenschaften	11
2.2 Problemstellung und Konzeption dieser Arbeit	13
2.2.1 Methodisches Konzept	13
3 Material und Methoden	19
3.1 Zucht und Haltung der Versuchstiere	19
3.2 Kreuzung von genetisch veränderten Tieren	20
3.3 Allgemeine Präparation	20
3.4 Elektrophysiologie	21
3.4.1 Kraftmessung an einzelnen Körperwandmuskeln	21
3.4.2 Charakterisierung der motoneuronalen Aktivität	23
3.4.3 Charakterisierung der Ionenströme	25
3.4.3.1 Charakterisierung der Gesamtkalziumströme	28
3.5 Molekularbiologie	29
3.5.1 Primerdesign	30
3.5.2 Probenaufbereitung	30
3.5.3 RNA-Isolation	30
3.5.4 Reverse Transkription	31
3.5.5 Polymerase Kettenreaktion	31
3.5.6 Bestimmung der Expressionsrate	32
3.5.7 Gelelution	33

3.5.8	Transformierung und Klonierung	34
3.5.9	Mini-Prep, Sequenzierung und Datenbankabgleich	34
3.6	Verhaltensbiologie	35
3.6.1	Bewegungsanalyse	36
3.6.2	Erregungs-Kontraktionskopplung unter kontrollierten Bedingungen . . .	37
3.6.3	Lokalisation der Kalziumkanäle	39
3.7	Statistik	40
4	Ergebnisse	41
4.1	Kreuzung von genetisch veränderten Tieren	41
4.2	Elektrophysiologie	44
4.2.1	Kraftmessung an einzelnen Körperwandmuskeln	44
4.2.2	Charakterisierung der motoneuronalen Aktivität	48
4.2.3	Charakterisierung der Ionenströme	51
4.3	Molekularbiologie	57
4.3.1	Probenaufbereitung	57
4.3.2	Polymerase Kettenreaktion	57
4.3.2.1	Zyklenoptimierung	57
4.3.3	Bestimmung der Expressionsrate	58
4.3.4	Sequenzierung und Datenbankabgleich	62
4.4	Verhaltensbiologie	68
4.4.1	Bewegungsanalyse	68
4.4.2	Erregungs-Kontraktionskopplung unter kontrollierten Bedingungen . . .	72
4.4.3	Lokalisation der Kalziumkanäle	77
5	Diskussion	81
5.1	Kreuzung von genetisch veränderten Tieren	81
5.2	Elektrophysiologie	82
5.2.1	Kraftmessung an einzelnen Körperwandmuskeln	82
5.2.2	Charakterisierung der motoneuronalen Aktivität	84
5.2.3	Charakterisierung der Ionenströme	85
5.2.3.1	Homöostase auf Ebene der zellulären Erregbarkeit	88
5.3	Molekularbiologie	90
5.3.1	Probenaufbereitung	90
5.3.2	Polymerase Kettenreaktion	91
5.3.2.1	Zyklenoptimierung	92
5.3.3	Die Wahl der zu untersuchenden Gene	92
5.3.4	Bestimmung der Expressionsrate	94
5.3.5	Sequenzierung und Datenbankabgleich	95
5.3.6	Regulation der Expressionsrate	97

5.4	Verhaltensbiologie	98
5.4.1	Bewegungsanalyse	98
5.4.2	Erregungs-Kontraktionskopplung unter kontrollierten Bedingungen . . .	101
5.4.3	Lokalisation der Kalziumkanäle	105
6	Literaturverzeichnis	107
7	Abstract	121
A	Anhang	123
A.1	Physiologische Salzlösung	123
A.2	Medien	124
A.2.1	NZY - Medium	124
A.2.2	LB - Agarplatten	124
A.2.3	LB - Medium	124
A.3	Programme zur Auswertung	125
A.3.1	Auswertung des Rampenprotokolls	125
A.3.2	Korrektur des linearen Stroms und Darstellung der Messung	126
A.3.3	Multiple Bestimmung der Regressionskoeffizienten	127
A.3.4	Berechnung der Daten aus der Bewegungsanalyse	127
A.4	Verwendete Chemikalien, Geräte, etc.	128
A.4.1	Chemikalien	128
A.4.2	Herstellernachweise	128
A.4.3	Primer	129
A.4.3.1	L - Typ Calciumkanäle	129
A.4.3.2	T - Typ Calciumkanäle	129
A.4.3.3	rp49	129
A.4.3.4	β -Untereinheit	129
A.4.4	Antikörper	129
A.4.4.1	Primärantikörper	129
A.4.4.2	Sekundärantikörper	129

Abkürzungsverzeichnis

bp	Basenpaare
ca.	circa
cAMP	cyclic Adenosinemonophosphate, zyklisches Adenosinmonophosphat
cDNA	complementary DNA, komplementäre DNA
CREB	cAMP response element-binding protein
DNA	deoxyribonucleic acid, Desoxyribonukleinsäure
EKO	electrical knock out
EPSP	excitatorisches postsynaptisches Potenzial
g	Erdbeschleunigung
GFP	grün fluoreszierendes Protein
KCl	Kaliumchlorid
LTD	long-term depression, Langzeitdepression
LTP	long-term potentiation, Langzeitpotenzierung
MHC	myosin heavy chain
mRNA	messenger-RNA
PB	phosphate buffer, Phosphatpuffer
PCR	polymerase chain reaction, Polymerase Kettenreaktion
RNA	ribonucleic acid, Ribonukleinsäure
rp49	ribosomales Protein 49
RT-PCR	Reverse-Transkriptase-PCR
U/min	Umdrehungen pro Minute
UAS	Upstream Activating Sequence
v/v	Volumenprozent
w/v	weight per volume, Gewicht pro Volumen

Abbildungsverzeichnis

2.1	Muskelwachstum	5
2.2	LTP und LTD in konsekutiven, neuronalen Schichten	7
2.3	Synaptische Veränderungen	10
2.4	Gal4 UAS-System	14
2.5	Methodischer Ansatz	17
3.1	Allgemeine Präparation	22
3.2	Kontraktionskraft	22
3.3	Muskelpotenziale	24
3.4	Rampenprotokoll	27
3.5	Messprotokoll -70 mV	29
3.6	Erregungs-Kontraktionskopplung	38
4.1	Fluoreszenzaufnahme, Übersichtsdarstellung	42
4.2	Fluoreszenzaufnahmen; Detaillierte Darstellung	43
4.3	Originaldaten Kontraktionsmessungen	45
4.4	Ergebnisse der Kontraktionsmessung	47
4.5	Kontraktionskinetik	47
4.6	Originaldaten Motorische Aktivierung	49
4.7	Motorische Aktivierung	50
4.8	Rundown von Kalziumströmen	52
4.9	Originaldaten Spannungsklemme	54
4.10	I-V Kurve	55
4.11	Relative Veränderung der Maximalamplitude	56
4.12	Originaldaten Zyklusoptimierung	58
4.13	Zyklusoptimierung	59
4.14	Originaldaten Expressionsanalyse	60
4.15	Quantifizierung des Expressionslevels	60
4.16	Originaldaten Expressionsanalyse	61
4.17	Quantifizierung des Expressionslevels	62
4.18	Alignment PCR-Produkt: L-Typ-Kalziumkanal	64
4.19	Alignment PCR-Produkt: T-Typ-Kalziumkanal	65

4.20 Alignment PCR-Produkt: rp49	66
4.21 Alignment PCR-Produkt: β -Untereinheit	67
4.22 Originaldaten Bewegungsanalyse	68
4.23 Bewegungsanalyse	69
4.24 Bewegungsanalyse Distanz	70
4.25 Bewegungsanalys mittlere Geschwindigkeit	70
4.26 Bewegungsanalyse maximale Geschwindigkeit	71
4.27 Originaldaten Kontraktionsschwelle	72
4.28 Kraftentwicklung unter kontrollierten Bedingungen	73
4.29 Kontraktionsparameter	73
4.30 Kontraktionsschwelle	75
4.31 Maximalstrom bei +20 mV	76
4.32 Ströme	77
4.33 Fluoreszenzaufnahmen; Antikörperfärbung	78
4.34 Fluoreszenzaufnahmen; Antikörperfärbung	79

Tabellenverzeichnis

4.1	Kalziumströme	55
4.2	Expressionsanalyse	61
4.3	Erregungs-Kontraktionskopplung	76
A.1	Physiologische Salzlösung: Standard	123
A.2	Physiologische Salzlösung: Kontraktionsmessungen	123
A.3	Physiologische Salzlösung: Spannungsklemme	124
A.4	Herstellernachweise	128

1 Zusammenfassung

Obwohl es während der Entwicklung eines Organismus – während Phasen des Wachstums und/oder des Lernens zu dramatischen Veränderungen der synaptischen Eingänge und der Erregbarkeit von Neuronen und Muskeln kommt, ist es für einen Organismus von essenzieller Bedeutung die Funktion dieser Zellen in physiologisch akzeptablen Bereichen zu halten. Erst vor kurzem konnte erstmals gezeigt werden, dass diese Zelltypen in der Lage sind ihre Aktivität selbst zu regulieren. Während die meisten Ergebnisse eine Veränderung der synaptischen Effizienz durch verschiedene Mechanismen zeigen konnten, sind Studien, die eine regulatorische Veränderung der zellulären Erregbarkeit durch Veränderung der ionalen Leitfähigkeiten zum Thema hatten, bislang weniger gut untersucht und daher auch weniger gut verstanden.

In dieser Arbeit wurden Larven einer *Drosophila*-Mutante benutzt, die über eine eingeschränkte zelluläre Erregbarkeit der Muskelfasern verfügten, da in diesen ein genetisch veränderter Kaliumkanal exprimiert wurde, um letztlich zu untersuchen, ob, und gegebenenfalls wie, eine Kompensation der eingebrachten Störung auftritt.

Zunächst konnten Kraftmessungen zeigen, dass die kontraktile Parameter dieser Muskeln (Kraft und Kinetik) denen der wildtypischen Larven entsprachen und man davon ausgehen konnte, dass eine Kompensation der eingebrachten Störung vorlag. Weitere Experimente zeigten, dass diese Kompensation weder auf einer Änderung der synaptischen Effizienz noch auf einer Veränderung des motoneuronalen Ausgangs beruhte. Vielmehr konnte gezeigt werden, dass eine Erhöhung der Amplitude des Kalziumstroms um circa 30% für eine Kompensation sorgte. Diese Erhöhung konnte auch molekularbiologisch durch eine Erhöhung der Expressionsrate der korrespondierenden β -Untereinheit nachgewiesen werden.

Ein direkter Vergleich dieser Mutanten mit Larven, in denen die Mutation erst spät induziert wurde, zeigte, dass letztere dramatische Einschränkungen der kontraktile Fähigkeiten aufwiesen. Dies zeigte letztlich, dass die Expression des EKO-Kanals zu deutlichen Einschränkungen in der Kontraktilität der Muskulatur führte, wenn dessen Wirkung nicht durch einen gesteigerten Kalziumeinstrom kompensiert wurde.

2 Einleitung

2.1 Homöostatische Regulation

Der Begriff **Homöostase** steht, seit der Prägung dieses Begriffs durch Cannon (1929), für die Fähigkeit eines biologischen Systems sich durch eine Autoregulation, unabhängig von äußeren Störgrößen, in einem dynamisch-funktionellem Zustand zu halten. Diese Fähigkeit setzt eine permanente Überwachung des aktuellen Ist-Zustandes, die Erkenntnis einer Abweichung vom Soll-Zustand und eine Möglichkeit zur Korrektur voraus. Unter einer derartigen Kontrolle stehen neben komplexen Körperfunktionen wie zum Beispiel der Temperaturregulation und der Sauerstoffversorgung auch einzelne Organsysteme (Eckert et al., 2000).

Während einige Organsysteme toleranter gegenüber Veränderungen des äußeren Milieus sind, reagieren beispielsweise hochspezialisierte Zellen wie die Neurone des zentralen Nervensystems sehr frühzeitig auf derartige Veränderungen. Die Auswirkungen einer Veränderung des extrazellulären pH-Wertes wurden bereits in vielen Systemen untersucht (Begenisich, 1983; Iijima et al., 1986; Klockner, 1994). Eine Variation der extrazellulären Ionenkonzentrationen und der damit verbundenen Änderung des Ruhepotenzials mit allen seinen Folgen kann ebenso leicht nachvollzogen werden.

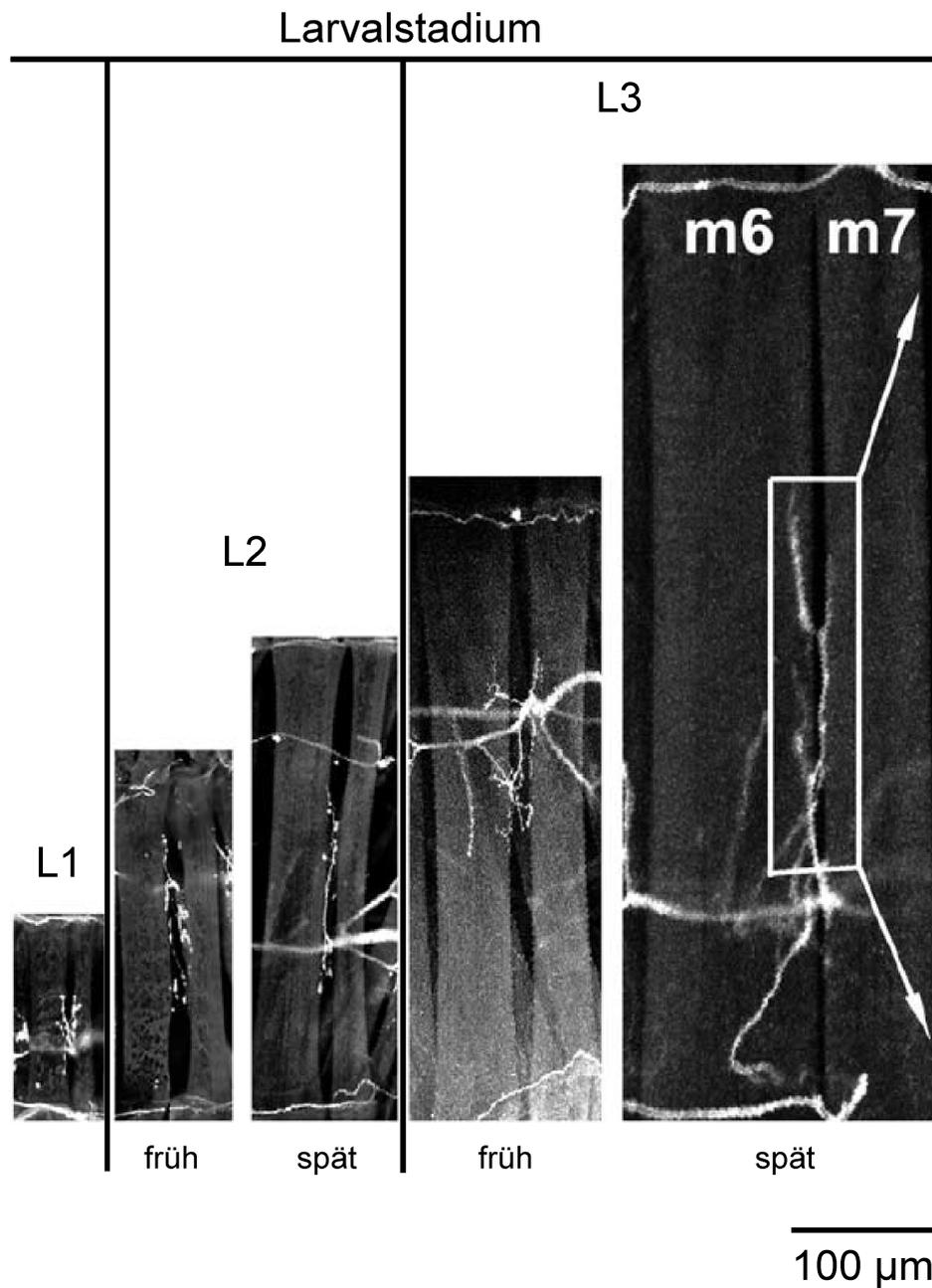
Obgleich gerade die hier genannten Beispiele zeigen, dass die elektrisch erregbaren Zellen des Nervensystems stark von der Konstanz äußerer Bedingungen abhängen und diese somit einer homöostischen Regulation unterworfen sein müssen, hat sich in den letzten Jahren gezeigt, dass auch Nervenzellen selbst in der Lage sein müssen, ihre Aktivität anpassen und regulieren zu können (Davis und Bezprozvanny, 2001; Turrigiano und Nelson, 2004).

Diese Fähigkeit ist so essenziell, da es die Entwicklung jedes Lebewesens bei Vorgängen des Wachsens und/oder Lernens mit sich bringt, dass neuronale Ein- und Ausgänge und Aktivitäten an die sich geänderten Umstände angepasst werden müssen, um weiterhin funktionell zu bleiben.

2.1.1 Variabilität der elektrischen Erregbarkeit

2.1.1.1 Wachstum

Die elektrische Erregbarkeit von dazu befähigten Zellen hängt unter anderem von deren Ruheleitfähigkeit beziehungsweise deren Eingangswiderstand R_M ab. So konnten Katz und Thesleff (1957) einen linearen Zusammenhang des Widerstandes R_M einer Muskelfaser mit der Amplitude von Miniatur-Endplattenpotentialen (als Maß für die Erregbarkeit) nachweisen. Wenn sich dieser Widerstand drastisch verkleinert, wie es beispielsweise durch eine Größenzunahme der Oberfläche und somit auch der Zellmembranfläche beim Wachstum geschieht, hat dies zur Folge, dass diese Zelle weniger erregbar ist (Lnenicka und Mellon, 1983). Zur Verdeutlichung des Faktors einer solchen Größenzunahme, sind in Abbildung 2.1 (entnommen und verändert aus: Li et al., 2002) die ventralen Longitudinalmuskeln aus einer *Drosophilalarve* als Beispiel gezeigt. Neben dem Widerstand verändert sich aber auch die Kapazität der Zellmembran. Insgesamt führt das Wachstum, das während jeder Entwicklung stattfindet zu einer Veränderung von zwei, für die elektrische Identität einer Zelle entscheidenden, Parametern. Die Erregung der Zelle muss zu jeder Zeit an die sich entwickelnden Unterschiede der gerade angesprochenen passiven Membraneigenschaften angepasst werden. Welche Mechanismen hier zugrunde liegen, wird in Abschnitt 2.1.2 erläutert.



verändert nach: Li, H. et al., (2002), Neuroscience

Abbildung 2.1: Vergleichende Darstellung der ventralen Longitudinalmuskeln M6 und M7 aus verschiedenen Larvalstadien der Fruchtfliege *Drosophila melanogaster* zur Veranschaulichung der Größenzunahme während der Entwicklung. (entnommen und verändert nach: Li et al., 2002)

2.1.1.2 Lernen

Die genauen Mechanismen des Lernens, sind nach wie vor lediglich unzureichend bekannt. Seit Mitte des letzten Jahrhunderts wurden durch Hebb (1949) die gleichnamigen Hebb'schen Lernregeln formuliert. Diese sprechen von einer neuronalen Plastizität auf Ebene der Synapsen, bei

der es zur Stärkung einer Synapse bei gleichzeitiger Aktivität von prä- und postsynaptischem Neuron (sowie zur Schwächung einer synaptischen Verbindung bei unkorrelierter Aktivität von prä- und postsynaptischer Nervenzelle) kommt. Bei permanenter aber unzureichender Aktivierung durch eine Synapse wird diese Verbindung nachhaltig geschwächt. Die zugrunde liegenden Mechanismen werden heutzutage mit Effekten der Langzeitpotenzierung (LTP) und Langzeitdepression (LTD) beschrieben (Turrigiano und Nelson, 2000).

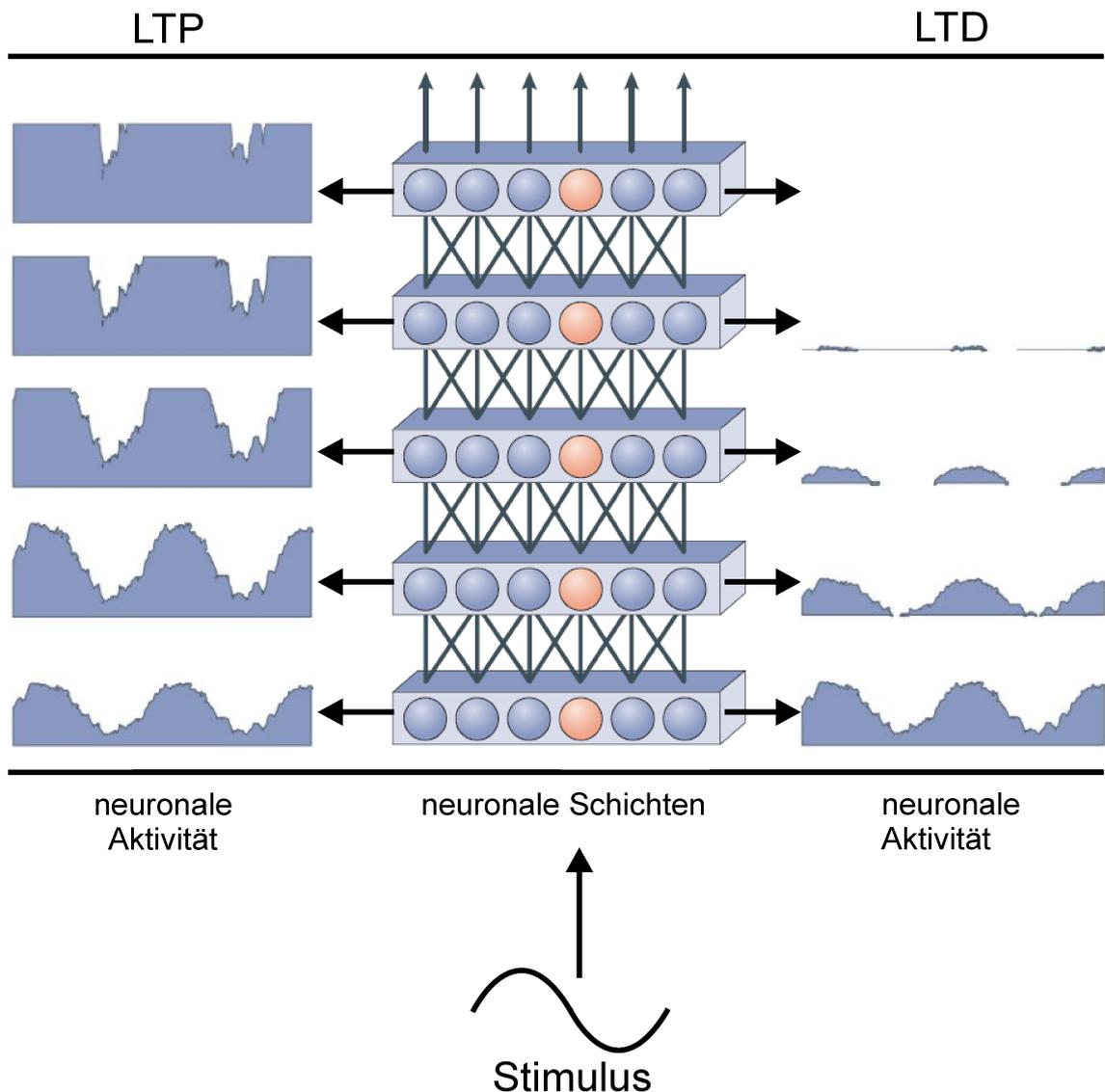
Bei der Langzeitpotenzierung handelt es sich um ein lang anhaltende Form der Stärkung einer synaptischen Verbindung aufgrund von prä- und postsynaptischen Mechanismen, die erst durch die korrelierte Aktivität in Gang gesetzt werden. Die Rolle der Langzeitpotenzierung beim Vorgang des Lernens konnte kürzlich erstmals direkt gezeigt (Whitlock et al., 2006) und von einer unabhängigen Forschergruppe indirekt bestätigt werden (Pastalkova et al., 2006).

Unter Langzeitdepression versteht man eine lang anhaltende Abschwächung eines synaptischen Eingangs. Welcher der beiden Vorgänge ausgelöst wird, hängt vom Zeitpunkt und der Frequenz des Stimulus und der Aktivität im postsynaptischen Neuron ab (Dudek und Bear, 1992).

Wendete man die Mechanismen der LTP und der LTD konsequent an, würde dies unweigerlich zu Problemen bei der weiteren Informationsverarbeitung führen. Abbildung 2.2 (entnommen und verändert nach: Turrigiano und Nelson, 2004) soll das Problem graphisch veranschaulichen:

Die Mitte der Abbildung stellt ein, aus fünf Schichten bestehendes, neuronales Netzwerk dar, welches in der ersten Schicht einen sinusförmigen Stimulus bekommt. Links und rechts von diesen fünf Schichten wird das jeweilige Antwortverhalten des rot hervorgehobenen Neurons dargestellt. Unter Bedingungen, die eine LTP fördern (linkes Drittel der Abbildung), kann es passieren, dass in der letzten Schicht keine Information mehr über den Stimulus enthalten ist, weil das Antwortverhalten des (roten) Neurons bis zum Maximum gesteigert wurde. Unter Bedingungen, in denen LTD vorherrscht (rechtes Drittel der Abbildung) kann es hingegen passieren, dass durch die konsequente Abschwächung der synaptischen Eingänge durch alle Schichten hindurch, kein Signal mehr bis in die letzte Schicht gelangt. Eine selektive, den Reiz widerspiegelnde Antwort, wäre in beiden Fällen nicht mehr gegeben.

Daher wurde gefordert, dass neben der synaptischen Plastizität, auch eine Plastizität der in-



verändert nach: Turrigino, G.G. and Nelson, S.B. (2004), Nature Reviews Neuroscience

Abbildung 2.2: **Mitte:** Schematische Darstellung von fünf aufeinanderfolgenden, neuronalen Schichten; Hervorgehoben wurde ein Neuron (rot), welches einen sinusförmigen Stimulus erhält
links: Antwortverhalten des rot hervorgehobenen Neurons unter LTP fördernden Bedingungen;
rechts: Antwortverhalten des rot hervorgehobenen Neurons unter LTD fördernden Bedingungen;
 (entnommen und verändert nach: Turrigiano und Nelson, 2004)

trinsischen Eigenschaften von Neuronen vorliegen muss, die die reizkorrelierte Aktivität eines Neurons über lange Zeit hinweg in funktionellen Grenzen hält (Turrigiano, 1999; Turrigiano und Nelson, 2000).

2.1.2 Mechanismen der neuronalen Homöostase

Die Mechanismen, die zur Aufrechterhaltung der neuronalen Homöostase beitragen, lassen sich grob in zwei Gruppen unterteilen. Die eine Gruppe wird von allen Mechanismen gebildet, die auf Ebene einer prä- und/oder postsynaptischen Veränderung stattfinden, die andere Gruppe wiederum von Mechanismen, die direkt an der Regulation der Erregbarkeit der Zelle, also den intrinsischen Eigenschaften, beteiligt sind.

2.1.2.1 Synaptische Plastizität

Ein zwischenzeitlich sehr gut untersuchtes Objekt zum Studium der Mechanismen der synaptischen Plastizität ist die Neuromuskuläre Synapse auf Muskel 6 und 7 bei Larven der Fruchtfliege *Drosophila melanogaster*. Eine ähnliche wie die von Lnenicka und Mellon (1983) vorgestellte Arbeit existiert auch bei *Drosophila* (Li et al., 2002). So konnte in der letztgenannten Studie auch für *Drosophila* gezeigt werden, dass das Wachstum der neuromuskulären Synapse mit dem Muskelwachstum korreliert ist und so, der bereits angesprochenen, erniedrigten Erregbarkeit aufgrund der Größenzunahme entgegengewirkt wurde. In der Arbeit von Lnenicka und Mellon (1983) konnte zudem zusätzlich gezeigt werden, dass zusammen mit der Morphologie nicht nur mehr präsynaptische Vesikel ausgeschüttet wurden, sondern auch die postsynaptische Antwort durch eine Steigerung der Rezeptorzahl, und somit auch deren Dichte im subsynaptischen Raum, zugenommen hatte. Zusammengefasst werden die basalen Mechanismen in Abbildung 2.3.

Andere Studien konnten zeigen, dass retrograde Signale die Veränderungen der Prä- und Postsynapse an das Wachstum der Muskelfasern koppeln (Haghighi et al., 2003; McCabe et al., 2003; Petersen et al., 1997). Dabei sind die Aktivierung der postsynaptischen Transmitterrezeptoren und die nachgeschaltete Aktivierung von spannungsabhängigen Ionenkanälen wichtige Signale, die zur Auslösung der Signalkaskaden dieser homöostatischen Regulation führen.

Von kortikalen Neuronen ist ebenfalls bekannt, dass eine lang anhaltende Unterdrückung der Aktivität zu postsynaptischen Veränderungen führten, die zu einer, im Vergleich zur Kontrollsi-

tuation gesteigerten, neuronalen Antwort führen (Turrigiano et al., 1998). In weiteren Studien konnte belegt werden, dass dieser Effekt durch AMPA-Rezeptoren (α -**A**mino-3-hydroxy-5-**M**ethyl-4-isoxazole **P**ropionic **A**cid) vermittelt wurde (O'Brien et al., 1998).

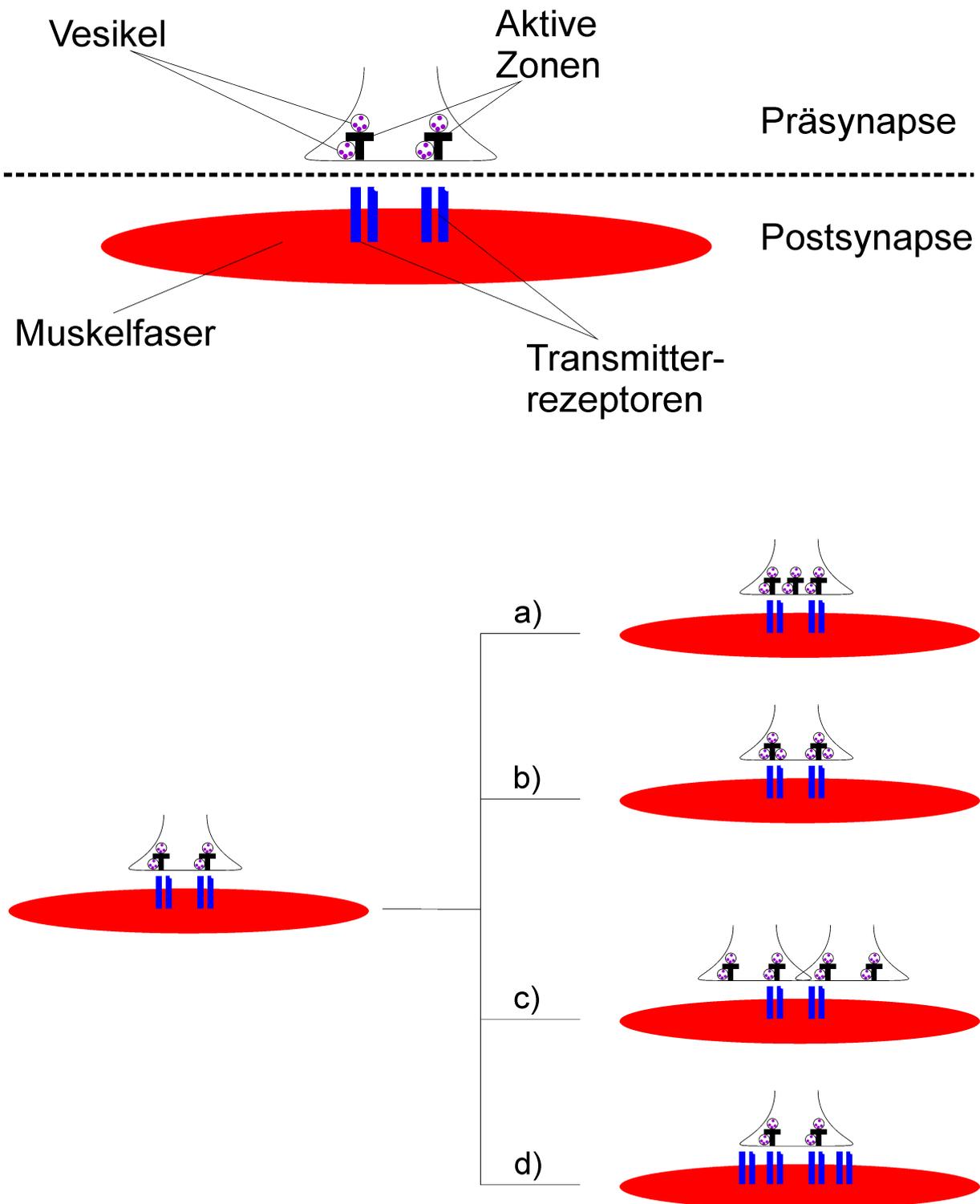


Abbildung 2.3: **oben:** Schematische Darstellung einer einfach innervierten Muskelfaser mit synaptischer Endigung in der aktiven Zonen und mit Transmittermolekülen gefüllte Vesikel zu sehen sind;

unten: Schematische Darstellung von Kompensationsmechanismen auf prä- und postsynaptischer Seite: Dargestellt ist eine Erhöhung der Zahl der ...

- a) ... aktiven Zonen.
- b) ... Vesikel in der Präsynapse.
- c) ... synaptischen Endigungen.
- d) ... postsynaptischen Transmitterrezeptoren.

2.1.2.2 Regulation der intrinsischen Eigenschaften

Die zelluläre Erregbarkeit einer Zelle hängt neben den passiven Membraneigenschaften (Membranwiderstand und -kapazität) von der Fähigkeit ab, auf Signaleingänge in adäquater Weise aktiv zu reagieren. Diese Fähigkeit wird durch die liganden- und spannungsgesteuerten Ionenkanäle der Zellen vermittelt. Die aktive Antwort hängt ganz entscheidend von der Art und der Anzahl der Ionenkanäle ab. Diese unterlaufen in einem permanenten Zyklus eine stetige Erneuerung, bei dem alte Proteine ab- und neue aufgebaut und wieder in die Membran integriert werden. Insgesamt besitzen Ionenkanäle eine Halbwertszeit in der Größenordnung von Minuten bis hin zu Wochen (zum Beispiel Hanwell et al., 2002; Jugloff et al., 2000), Diese Zeitspanne ist im Vergleich zu der Lebensdauer eines Neurons aus einem Tier mit langer Lebensdauer aber eher gering (Marder und Goaillard, 2006). Daher muss ein Mechanismus existieren, der die Erregbarkeit der Zelle erkennt und die Expression der Ionenkanäle dynamisch reguliert, damit sichergestellt wird, dass sich die elektrische Identität der Zelle nicht unabsichtlich durch leichte Schwankungen in der Expressionsrate verändert. Wäre dies nicht der Fall, dann wäre eine Anpassung an sich verändernde Umstände ebenso unmöglich.

Es konnte bislang sowohl in computersimulierten Studien (Foster et al., 1993; Golowasch et al., 2002; Prinz et al., 2004) als auch experimentell (Goldman et al., 2001; Schulz et al., 2006; Swensen und Bean, 2003) gezeigt werden, dass keine eindeutige Festlegung der einzelnen, ionalen Leitfähigkeiten, sondern ein breites Kontinuum an verschiedenen Möglichkeiten existiert, die gleichberechtigt nebeneinander stehen.

Während die gerade genannten Studien zeigen, dass elektrisch erregbare Zellen wie Neurone und Muskeln die Voraussetzung für eine homöostatische Regulation erfüllen, sollen die nachfolgenden Arbeiten konkrete Beispiele dafür liefern. So konnten MacLean et al. (2003) zeigen, dass die Injektion von *shal*-RNA, welche für einen Kaliumionenkanal codiert, zu einer drastischen Steigerung des einwärtsgerichteten Kaliumstroms I_A führte. Obwohl erwartet wurde, dass dieser Strom die rhythmische Aktivität signifikant verändert, waren die Unterschiede im Vergleich zur akuten Kontrolle und zum unbehandelten Schwesterneuron nur marginal. Weiterhin wurde gezeigt, dass sich linear mit der Amplitude des I_A -Stromes auch die Amplitude

des I_H -Stromes geändert hatte, und dieser den zu erwartenden Effekt kompensierte. Zudem konnte auch gezeigt werden, dass es sich hierbei um eine aktivitätsunabhängige Form der Kompensation handelte, da eine nichtfunktionale *shal*-RNA zwar keinen Effekt auf die Amplitude des I_A -Kaliumstromes jedoch auf die des I_H -Stromes hatte. Zhang et al. (2003) zeigten im Gegenzug, dass eine Überexpression des für den I_H -Strom verantwortlichen Gens *PAIH* keinerlei Effekt auf die Amplitude des I_A -Stromes hatte.

In einer Studie bei der Taufliege *Drosophila melanogaster* (Mee et al., 2004) wurde gezeigt, dass Neurone in der Lage sind, ihre Erregbarkeit an die jeweils vorherrschenden Bedingungen der Erregung anzupassen. Bei einer Übererregung durch verstärkte synaptische Eingänge wurde die Expression des spannungsabhängigen Natriumkanals, der durch das *para*-Gen codiert wird, herabgesetzt. Eine Blockierung des synaptischen Eingangs führte hingegen zu einer Überexpression dieses Natriumkanals.

Ein ähnlicher Sachverhalt konnte für kultivierte, kortikale Neurone gezeigt werden. Hier führte eine Blockade der Aktivität über mehrere Tage zu einer deutlichen Steigerung der zellulären Antwort auf einen Stromimpuls. Diese gesteigerte Aktivität nach der Blockade war ebenfalls durch eine Steigerung eines spannungsabhängigen Natriumionenkanals verursacht (Desai et al., 1999).

Obgleich die ebenfalls elektrisch erregbaren Muskelzellen (im Hinblick auf ihre Fähigkeiten zur homöostatischen Regulation) weniger gut untersucht sind, gibt es auch hier erste Hinweise darauf, dass Kompensationsmechanismen eine wichtige Rolle spielen:

In einer "Knock-out"-Mutante einer Maus, wurde die Expression des ligandengesteuerten Kaliumionenkanals, der eine entscheidende Rolle bei der vagalen Regulation der Herzfrequenz spielt, unterdrückt. Überraschenderweise fand man jedoch keinerlei Unterschiede in der Herzfrequenz der Mutanten im Vergleich zu den wildtypischen Mäusen, was auf eine kompensatorische Veränderung der intrinsischen Eigenschaften hindeutete (Wickman et al., 1998).

2.2 Problemstellung und Konzeption dieser Arbeit

Die wesentlichen Erkenntnisse zur Homöostase in elektrisch erregbaren Zellen liegen bislang auf Ebene der Regulation der synaptischen Effizienz vor. Hier sind die Mechanismen von der Induktion bis zum Kompensationsmechanismus weitestgehend besser untersucht, als eine homöostatische Plastizität der Erregbarkeit beziehungsweise deren intrinsischer Eigenschaften. Hier reichen die publizierten Ergebnisse oftmals nicht über eine Beschreibung des Effekts an sich hinaus, ohne dass dabei auf den Signalweg oder die beteiligten Moleküle eingegangen wird. Ebenso wenig liegen Hinweise auf die, für eine erfolgreiche Kompensation notwendigen und hinreichenden Bedingungen vor.

In dieser Arbeit sollen die Mechanismen der zellautonomen, homöostatischen Regulation im Hinblick auf eine drastisch verminderte Erregbarkeit von Muskelzellen untersucht werden.

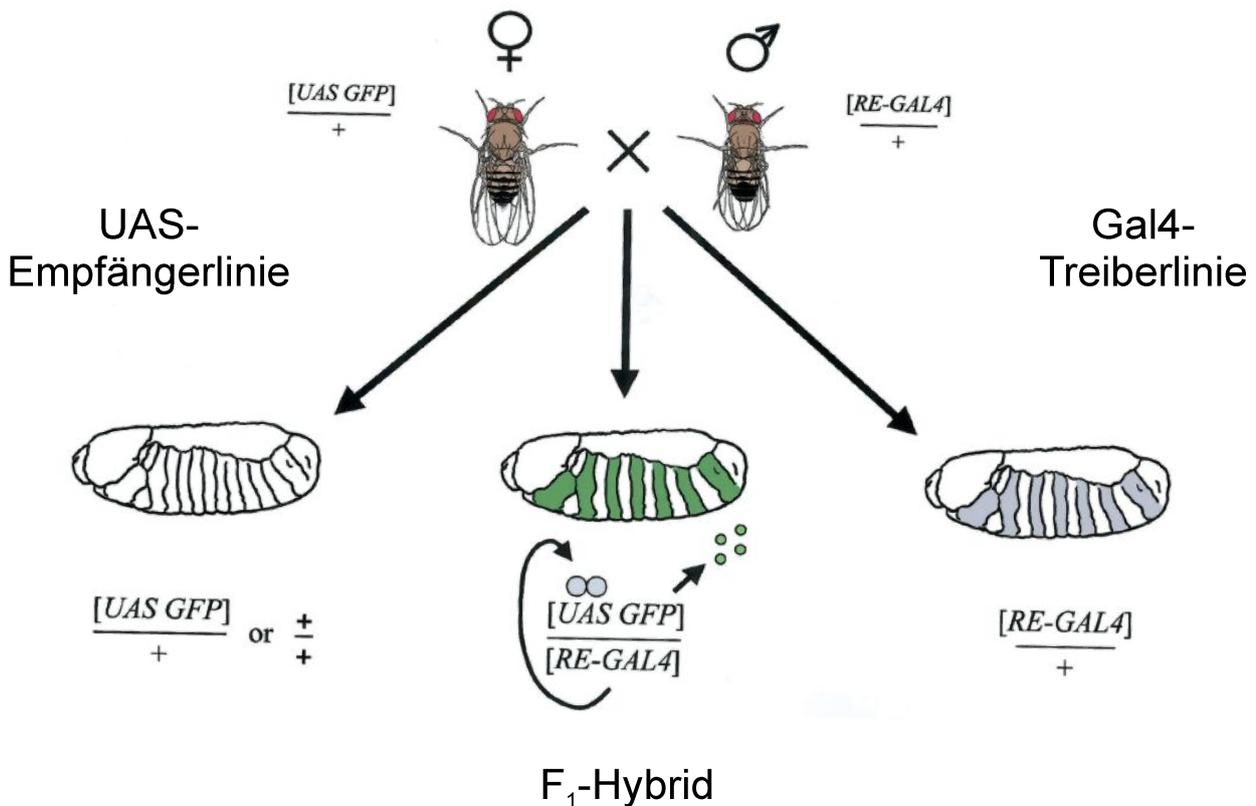
2.2.1 Methodisches Konzept

Für die Untersuchung der Mechanismen, die zur zellautonomen, homöostatischen Regulation beitragen, wurde die Taufliege *Drosophila melanogaster* als Modell ausgesucht, weil es eine Reihe von Vorzügen bietet, die im Folgenden kurz dargelegt werden sollen:

- **Simplizität:** Die Muskeln der Larvalstadien der Taufliege bestehen aus nur einer Zelle mit simpler Morphologie, was sie zudem elektrisch kompakt macht (Jan und Jan, 1976b). Hinzu kommt ein sehr einfaches Innervierungsschema der Muskulatur, das im Falle der Muskeln 6 und 7 aus nur zwei Motoneuronen besteht (Hoang und Chiba, 2001).
- **Charakterisierung:** Mit der Entschlüsselung des Genoms (Adams et al., 2000) und der Kenntnis aller wichtigen in den Muskelfasern vorkommenden Ionenströme (Gielow et al., 1995; Rose et al., 2007; Singh und Wu, 1989; Wu et al., 1983), sind wichtige Voraussetzungen für ein geeignetes Modell bereits geschaffen.
- **Methodischer Zugang:** Aufgrund der vorher genannten Gründe, ergibt sich eine breite Palette an methodischen Zugängen, von Verhaltensanalysen (Wang et al., 1997) über

elektrophysiologische Experimente bis hin zu induzierbaren Mutanten (Osterwalder et al., 2001).

- Manipulierbarkeit: Zum einen gibt es eine Vielzahl klassischer Mutanten. Zum anderen gibt es Werkzeuge um eine nahezu unerschöpfliche Anzahl neuer Mutanten zu generieren (Brand und Perrimon, 1993). Viele Stämme sind kommerziell erhältlich und können genutzt werden.



verändert nach: Duffy, J.B. (2002), Genesis

Abbildung 2.4: Schematische Darstellung des Gal4/UAS-Systems;

Die Gal4-Treiberlinie exprimiert das Gal4-Protein in einem bestimmten Muster, während in der ungekreuzten UAS-Empfängerlinie keine Expression des GFP erfolgt. Die gekreuzte F₁-Generation zeigt die Expression des GFP im selben Muster wie das Gal4 in der Treiberlinie

Durch das bereits angesprochene, von Brand und Perrimon (1993) etablierte Gal4/UAS-System besteht bei *Drosophila* die nahezu einzigartige Möglichkeit Mutanten zu erzeugen. Dieses zweiseitige Expressionssystem besteht aus einer Treiberlinie, die das Gal4-Protein in einem gewebs-

und/oder zeitlich festgelegten Muster exprimiert. Das Gal4-Protein selbst hat keinen Effekt auf die Fliegen. In einem zweiten Stamm, der sogenannten Empfängerlinie, wurde ein beliebiges Konstrukt integriert, das unter der Kontrolle der UAS (**U**pstream**A**ctivating**S**equence) steht. Die Expression kann erst erfolgen, wenn Gal4 an diese Sequenz gebunden wird. Dies geschieht jedoch nur in den, aus der Kreuzung beider Linien erhaltenen, Nachkommen. Dort wird das gewünschte Gen in dem Muster exprimiert, das durch die Gal4-Linie vorgegeben wurde. Dieser Sachverhalt wurde schematisch in Abbildung 2.4 (entnommen und verändert nach: Duffy, 2002) dargestellt.

In den kommerziellen *Drosophila*-Banken sind viele verschiedene Gal4- und UAS-Linien erhältlich die, wie bereits gesagt, eine nahezu unerschöpfliche Kombinationsmöglichkeit bieten. Des Weiteren existieren zahlreiche modulierbare Formen dieses Systems, was die Expression noch präziser steuerbar macht (für einen Überblick siehe: Duffy, 2002).

Bei Verwendung von rein muskulären Treiberlinien (24B-Gal4, MHC-Gal4, Mef-2,...) können demnach sehr gezielt Mutationen in muskulärem Gewebe hervorgerufen werden und durch die Verwendung einer induzierbaren Linie (MHC-Gal4 "Gene-Switch") auch zeitlich gesteuert werden.

Das Gen, das in den Muskelzellen exprimiert werden sollte, ist die **E**lectrical-**K**nock-**O**ut Variante eines Kaliumkanals. Dabei handelt es sich um ein von White et al. (2001) hergestelltes Konstrukt, das auf dem nativen Shaker-Kaliumkanal basiert. Durch zwei Punktmutationen und Substitution des Inaktivierungstores mit einem grünfluoreszierenden Protein (GFP) erhielt man einen Ionenkanal, dessen Expression leicht visualisiert werden konnte und dessen Eigenschaften sich grundlegend vom nativen Kanal unterscheiden (erniedrigte Aktivierungsschwelle, keine Inaktivierung). Dieser mutierte Kanal verdrängt den nativen Kanal, da er mit diesem um die gleiche Insertionsstelle konkurriert, aber viel stärker exprimiert wird (White et al., 2001). Zudem wurde bereits mehrfach gezeigt, dass die Expression dieses EKO-Kanals zu einer deutlich verminderten Erregbarkeit der Muskelfasern führt (Osterwalder et al., 2001; White et al., 2001).

Ich habe dieses System nun benutzt, um folgende Fragen zu klären:

- Sind die gewählten Bedingungen hinreichend für die Induktion einer zellautonomen, homöostatischen Regulation?
- Treten kompensatorische Veränderungen der zellulären Erregbarkeit in Form von veränderten ionalen Leitfähigkeiten auf?
- Welche intrazellulären Signalwege sind an einer Regulation beteiligt?

Das methodische Vorgehen zur Klärung dieser Fragen ist in einem Verlaufsdiagramm in Abbildung 2.5 gezeigt. Dabei sollten zunächst Kontraktionsmessungen zeigen, ob eine Kompensation der eingebrachten Störung vorliegt, was sich an den kontraktilen Parametern erkennen ließ.

Sollte eine Kompensation vorliegen, sollten auch Veränderungen im Rahmen der homöostatischen Plastizität auf einer, der in Abbildung 2.5 dargestellten Ebenen (motorischer Ausgang, synaptische Übertragung oder zelluläre Erregbarkeit), zu finden sein. Daher sollten diese Parameter nacheinander untersucht werden.

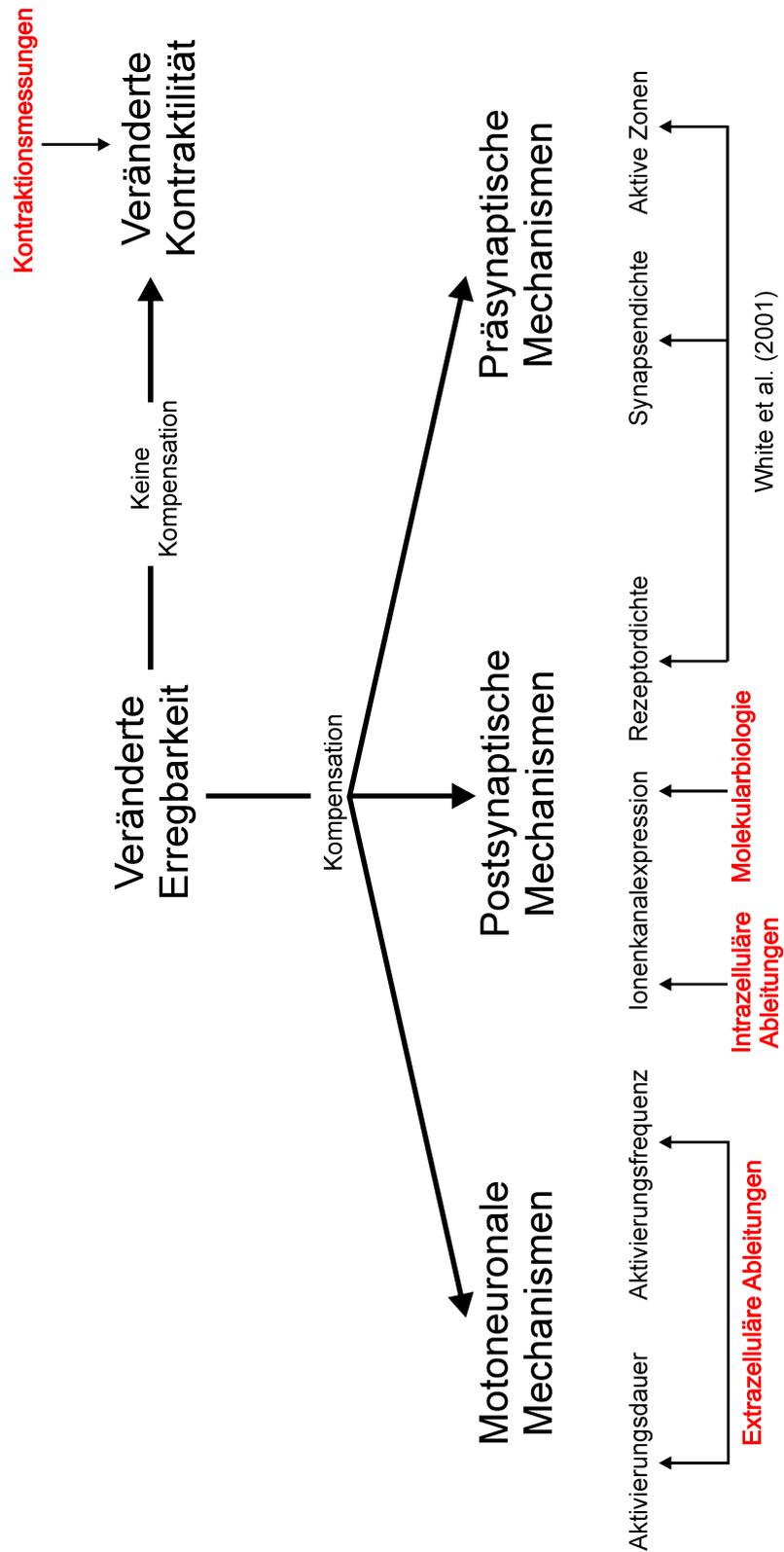


Abbildung 2.5: Methodischer Ansatz für die Bearbeitung der Fragestellung der Doktorarbeit

3 Material und Methoden

3.1 Zucht und Haltung der Versuchstiere

Für die Beantwortung der dieser Arbeit zugrunde liegenden Fragestellung, wurde der Modellorganismus *Drosophila melanogaster* gewählt.

Sämtliche Versuche wurden an Larven im dritten Stadium der Taufliege *Drosophila melanogaster* vorgenommen. Die Fliegen wurden bei 22 - 23° C in einem 12:12 h hell:dunkel-Rhythmus gehalten. Als Nährmedium diente das Instant-Medium für die Zucht von *Drosophila* der Firma Carolina. Dieses musste mit einem der Futtermenge entsprechendem, Volumen Wasser (1:1) gemischt werden und war nach der Zugabe von einigen Körnern Trockenhefe gebrauchsfertig. In einem Zuchtgefäß mit einem Durchmesser von 30 mm und einer Höhe von 10 cm, wurde das untere Drittel mit Medium gefüllt und am oberen Ende mit einem Schaumgummi-Stopfen verschlossen. Dieser Stopfen besaß eine so geringe Porengröße, dass er zugleich einen wirksamen Schutz gegen schädliche Milben darstellte. In jedem Zuchtgefäß befanden sich circa 70 - 100 adulte Tiere beiderlei Geschlechts. Das Medium wurde jede Woche gewechselt, indem die adulten Tiere in ein neues Zuchtgefäß überführt wurden.

Die genetisch veränderten Stämme wurden zum einen vom *Flystock Center Bloomington* (24B-Gal4) und zum anderen aus dem Labor von Professor Haig Keshishian von der *Yale University* (EKO-222, MHC-Gal4 Gene-Switch) bezogen. Zur wildtypischen Kontrolle dienten zum einen der Stamm **Canton S**, der ebenfalls aus dem *FlyStock Center* stammte und zum anderen die ungekreuzten, also ebenfalls phänotypisch dem Wildtyp entsprechenden **UAS-EKO**.

Die auch im Phänotyp veränderten Mutanten entstanden durch Kreuzung der entsprechenden

Treiberlinie (24B-Gal und MHC-Gal4 Gene-Switch) mit dem UAS-EKO Stamm.

3.2 Kreuzung von genetisch veränderten Tieren

Um das Merkmal der genetisch veränderten UAS-EKO Linie zur Expression zu bringen und so die EKO-222 Tiere zu erhalten, mussten die Männchen dieses Stammes mit den Weibchen des 24B-Gal4 Stammes gekreuzt werden. Um nur unbefruchtete Weibchen für die Kreuzung einsetzen zu können, wurden die weiblichen Versuchstiere spätestens alle sechs Stunden (bei 25° C) abgesammelt und in ein eigenes Zuchtgefäß überführt. Sobald zehn bis fünfzehn Weibchen gesammelt worden waren, wurden diese mit fünf bis zehn Männchen verpaart. Die so entstehende F_1 -Generation trug die von White et al. (2001) beschriebene Mutation und wurde von mir **EKO-222** genannt.

Die mit der MHC-Gal4 Gene-Switch Treiberlinie erzeugten Mutanten mussten für eine erfolgreiche Expression zudem induziert werden. Dazu wurden 0,3 mg/ml RU468 in 66%igem Ethanol gelöst. Die zu indizierenden Larven wurden zwei Minuten in dieser Lösung gebadet und anschließend bei 25 °C für 24h (unter den ansonsten oben beschriebenen Bedingungen) inkubiert. Die so erhaltenen Tiere wurden im weiteren Verlauf als **MHC-Gal4** bezeichnet.

Die Versuchstiere der anderen Kontrollgruppen wurden dem gleichen Prozedere unterzogen, um etwaige Effekte durch die Behandlung auszuschließen.

3.3 Allgemeine Präparation

Allen Versuchen ging eine allgemeine Präparation voraus, die als Basis für die weiteren Schritte diente. Diese erfolgte unter einem Binokular mit 160facher Vergrößerung in einer mit Sylgard gefüllten Petrischale (Durchmesser: 35mm). Zunächst wurde die Larve am anterioren und am posterioren Ende mit feinen Insektennadeln (50 - 100 μm) festgesteckt. Dann wurde die Petrischale mit physiologischer Salzlösung (siehe Anhang A.1) gefüllt. Die Eröffnung des Körpers erfolgte durch einen Querschnitt am posterioren Ende und einem darauf folgenden Schnitt entlang der dorsalen Mittellinie bis hin zum anterioren Ende. Daraufhin wurde die Körper-

wand flach ausgebreitet und auf dem Boden der Präparierschale festgelegt. Nach Entfernung des Fettkörpers, des Darmes und eines Großteils der Tracheen war die Präparation, die als Basis für die weiteren Versuche diente, abgeschlossen. Schematisch ist dies in Abbildung 3.1 dargestellt.

3.4 Elektrophysiologie

3.4.1 Kraftmessung an einzelnen Körperwandmuskeln

Damit festgelegt werden konnte, ob die Muskeln der mutierten Versuchstiere eine adäquate oder eventuell veränderte Kontraktionsfähigkeit aufwiesen, wurden Kraftmessungen an einzelnen Muskelfasern durchgeführt. Dem, unter Kapitel 3.3 beschriebenen, vorbereiteten Versuchstier wurde zunächst das Nervensystem entnommen. Dabei wurde der Nerv eines Hemisegments (Abdominalsegment 3) am Ganglion und die restlichen Nerven direkt vor dem Eintritt in das Segment durchtrennt. Das Segment A3 konnte somit zur Kraftmessung der Muskelfasern 6, 7, 12 und 13 benutzt werden. In den beiden Segmenten, die posterior lagen (A4 und A5) ebenso wie die in dem Anterioren (A2) wurden die Muskeln durch mechanische Verletzung zerstört. Anschließend wurden in Segment A3 alle Muskeln bis auf 6, 7, 12 und 13 (und den darunter liegenden) auf gleiche Weise zerstört. Nun wurde die Kutikula des Segments 3 lateral und medial der oben erwähnten Muskeln eingeschnitten und der Schnitt nach posterior bis zum Segment 5 weitergeführt. Das Segment A2 wurde mit einer Insektennadel zusätzlich festgelegt, um elastische Verformungen während der Kontraktion zu verhindern. An der Grenze zwischen Segment A5 und A6 wurde ein Querschnitt durchgeführt, so dass die Segmente A3, A4 und A5 nun frei waren (Schnittführung: siehe gestrichelte Linien in Abbildung 3.2). Daraufhin wurden die freigelegten Teile der Segmente A4 und A5 in den Kraftmesser eingespannt. Nachdem der Nerv in eine mit physiologischer Salzlösung gefüllte Reiz-Elektrode durch Applikation eines Unterdrucks eingesogen wurde, war die Messkonfiguration hergestellt.

Mit der Software Spike2 Version 5.11 wurden Reize mit einer Dauer von 1 ms, und einer Frequenz von 0,5 sowie 2 und 20 Hz generiert. Über das CED 1401plus wurden diese über eine Rei-

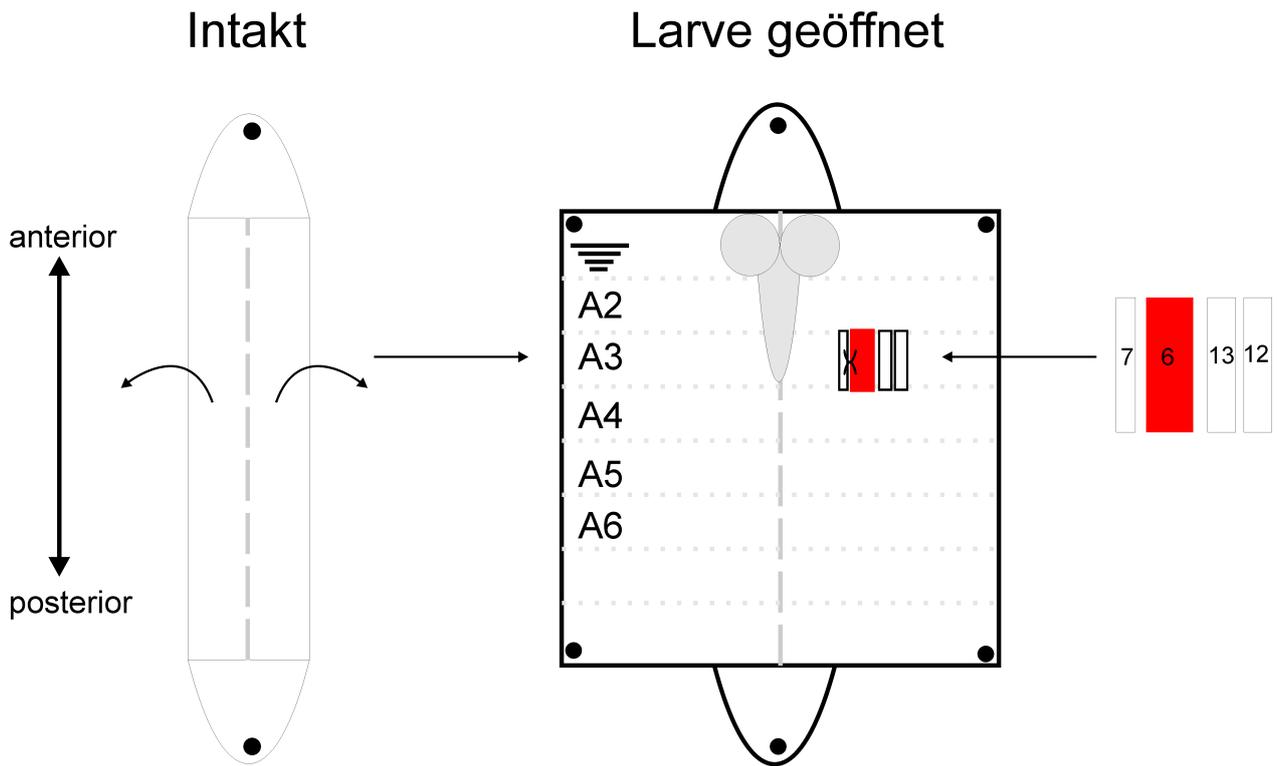


Abbildung 3.1: Schematische Darstellung der Standard-Präparation

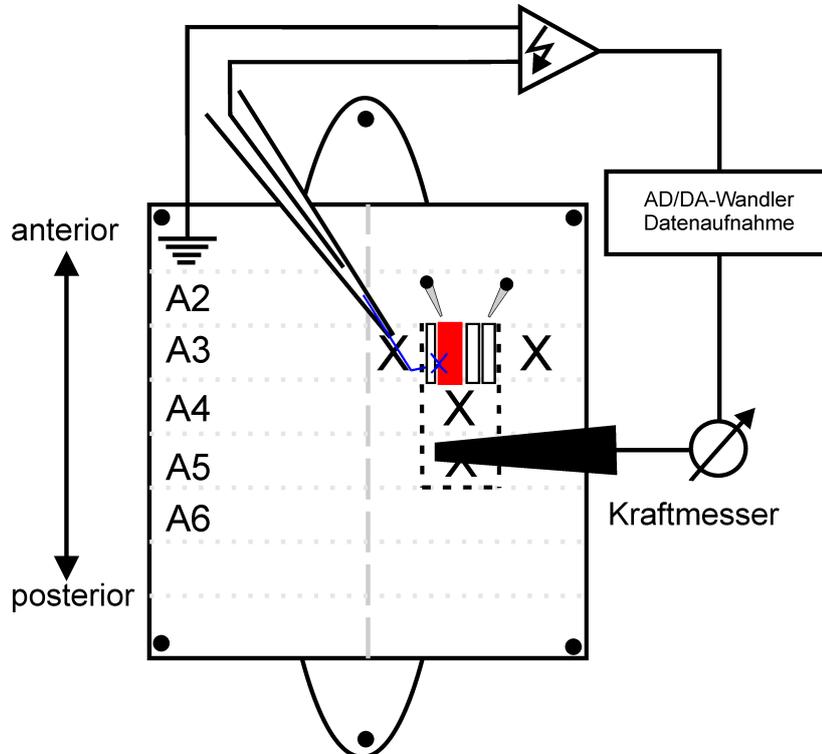


Abbildung 3.2: Schematische Darstellung des Versuchsaufbaus zur Messung der Kontraktionskraft der Muskeln 6, 7, 12 und 13.

A2-A6: Segmentbezeichnungen

X: Durch Scherenschnitte zerstörte Muskulatur

zisationseinheit (ISOFlex) der Firma A.M.P.I an die Reizelektrode weitergegeben. Die Kräfte wurden über einen isometrischen Kraftmesser (KG4, SI-Scientific Instruments) registriert und mit einem Brückenverstärker (BAM 4C, SI-Scientific Instruments) zunächst verstärkt, dann mit dem 1401plus aufgenommen und mit einer Bit-Rate von 5 kHz A/D gewandelt. Die Auswertung erfolgte ebenfalls mit der Software Spike2. Bei den Reizungen mit einer Frequenz von 0,5 und 2 Hz wurden die Amplituden von Einzelzuckungen ausgewertet. Bei der Reizung mit 20 Hz wurde die maximale Amplitude bestimmt. Diese Messungen wurden an Wildtyp (Canton S), der Kontrollgruppe (UAS-EKO) und den Merkmalsträgern (EKO-222) durchgeführt. Pro Gruppe wurden die Kräfte von zehn Tieren gemessen. Pro Tier wurden jeweils drei Messungen vorgenommen. Alle Ergebnisse einer Reizfrequenz wurden für eine Versuchstiergruppe gemittelt und mit Standardabweichung dargestellt. Bei einer Reizfrequenz von 0,5 Hz wurden pro Messung zusätzlich die Halbanstiegs- und Halbabfallszeiten der maximalen Kraft bei vier Einzelzuckungen ausgewertet und pro Tier gemittelt. Die so erhaltenen Werte wurden wiederum als Mittelwerte mit Standardabweichung in einem Diagramm dargestellt.

3.4.2 Charakterisierung der motoneuronalen Aktivität

Anschließend wurde nun das motorische Aktivierungsmuster untersucht, um etwaige Veränderungen der motoneuronalen Aktivierung der Muskeln zu entdecken. Dazu wurden Muskelpotenziale von Muskel 6 im dritten Abdominalsegment extrazellulär abgeleitet. Das, wie in Kapitel 3.3 beschrieben, vorbereitete Versuchstier (Nervensystem intakt) wurde auf einem inversen Mikroskop (Axiovert 35M, Zeiss) positioniert. Unter 100facher Vergrößerung wurde eine mit physiologischer Salzlösung gefüllte Saugelektrode an die Innervationsstelle des Muskels 6 herangefahren (siehe Abbildung: 3.3). Unter 400facher Vergrößerung wurde die Elektrode leicht auf den Muskel aufgesetzt und gegebenenfalls ein leichter Unterdruck appliziert.

Der spontanaktive Rhythmus, der im intakten Tier für die Lokomotion sorgt, konnte auf diese Weise aufgezeichnet werden. Die Signale wurden zunächst über einen Vorverstärker (Eigenbau Universität Ulm) an einen Differenzverstärker mit Möglichkeit zur Filterung geleitet (Eigenbau Universität Ulm) wo sie dann noch 20fach verstärkt und gefiltert (Tiefpass: 45 Hz; Hochpass:

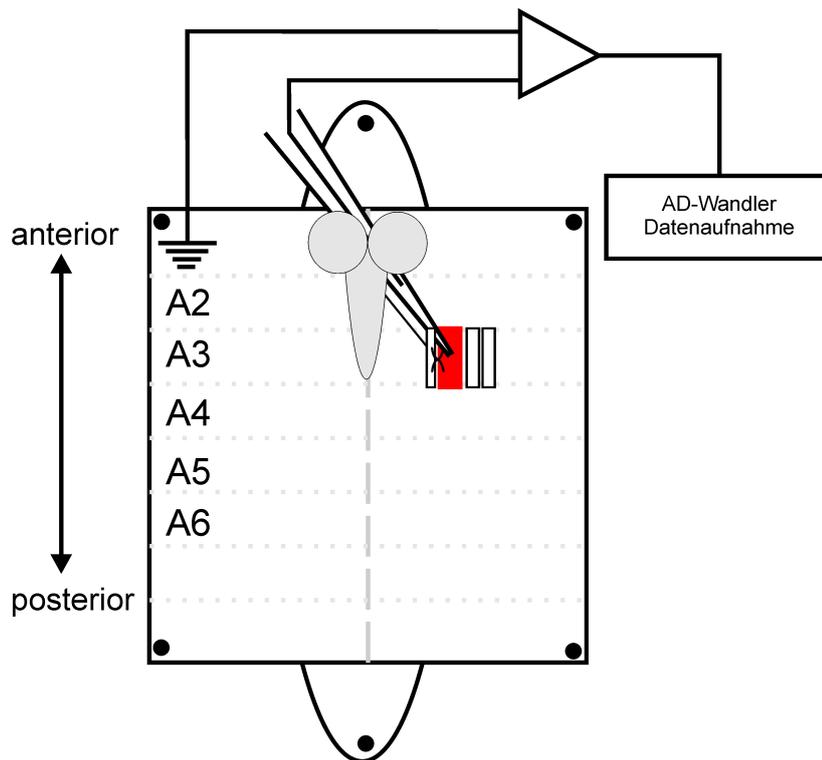


Abbildung 3.3: Schematische Darstellung der Messkonfiguration bei der Ableitung von Muskelpotenzialen zur Charakterisierung der motorischen Erregung von M6

50Hz) wurden. Anschließend wurden die Potenziale mit dem 1401plus von CED AD-gewandelt und mit der Software Spike2 betrachtet und ausgewertet.

Bei dem rhythmischen Aktivitätsmuster wurden jeweils drei Phasen erhöhter Aktivität ("Bursts") ausgewertet. Dabei wurde sowohl die Frequenz innerhalb eines solchen Bursts als auch dessen Dauer bestimmt. Für die Canton S- und EKO-222-Stämme wurden jeweils zehn Tiere untersucht. Für die zweite Kontrollgruppe (UAS-EKO) nur fünf, weil der spontanaktive Rhythmus in der semi-intakten Präparation ohnehin nur selten zu beobachten war. Dargestellt wurden die Mittelwerte der Frequenz innerhalb einer Aktivitätsphase in Hertz, sowie die Dauer einer Phase in Sekunden, jeweils mit Standardabweichung. Die statistische Überprüfung auf signifikante Unterscheidung erfolgte mit dem H-Test nach Kruskal-Wallis.

3.4.3 Charakterisierung der Ionenströme

Für die Charakterisierung der spannungsgesteuerten Ionenströme in der Körperwandmuskulatur, genauer gesagt Muskel 6, wurde die Technik der Zweielektroden-Spannungsklemme angewendet. Dem, wie in Kapitel 3.3 beschrieben, präparierten Tier wurde zusätzlich noch das Nervensystem entnommen. Die Präparation erfolgte nicht wie oben angegeben in einer Standard-35-mm Petrischale, sondern in einer speziell an die Bedürfnisse der Spannungsklemme angepassten Schale. Nach der Präparation des Versuchstieres wurden die Perfusion und die Erdung des Bades angeschlossen. Daraufhin wurde die Potenzial-Referenzelektrode in das Bad gebracht und der Flüssigkeitsspiegel der Badlösung mit einer Absaugvorrichtung eingestellt. Die Geschwindigkeit der Perfusion betrug circa 1 ml/min. Die Zusammensetzung der Perfusionslösung wurde an die jeweiligen Messbedingungen angepasst und kann im Anhang nachgeschlagen werden (Tabelle A.3). Die zur Messung notwendigen Elektroden wurden aus dünnwandigen Borosilikatglaskapillaren (GC100TF-10, Harvard-Apparatus) gezogen, welche einen äußeren Durchmesser von 1 mm aufwiesen. Des Weiteren waren diese Glaskapillaren mit einem Filament versehen, welches das blasenfreie Befüllen der feinen Elektrodenspitzen erleichterte. Die Stromelektrode wurde mit 2 M Kaliumzitrat + 100 mM Kaliumchlorid-Lösung gefüllt während die potenzialmessende Elektrode mit 3 M KCl-Lösung befüllt wurde. Die Widerstände der Elektroden lagen in etwa bei 5 M Ω für die Strom- und 13 M Ω für die Potenzialelektrode. Während der vorbereitenden Maßnahmen blieb der Zweielektroden-Verstärker (Turbo-TEC 10, NPI) im Modus für die Stromklemme (Current-Clamp). Beide Elektroden wurden unter Beobachtung in das Bad gefahren und nahe an die Muskelfaser herangebracht. Nach einer Feinjustierung des Flüssigkeitsniveaus wurden die Elektroden über dem Muskel 6 platziert. Die Stromelektrode wurde dabei so platziert, dass sie in der Mitte der Muskelfaser einsticht und die Potenzialelektrode wurde in halber Entfernung zwischen Stromelektrode und Muskelende platziert. Die Spannungselektrode wurde daraufhin auf die Muskelfaser aufgesetzt, was durch einen geringen Spannungsabfall am Oszilloskop beobachtet werden konnte. Durch eine kurze Dekompensation der Kapazitätskompensation geriet die Elektrodenspitze in Schwingung und penetrierte die Membran des Muskels. Sobald sich ein stabiles Potenzial eingestellt hatte

wurde die Stromelektrode ebenfalls auf den Muskel aufgesetzt. Durch den Wechsel in den Spannungsklemmen-Modus, und den dadurch resultierenden Stromstoß dieser Elektrode, wurde die Zellmembran durchbrochen und die Messkonfiguration war hergestellt.

Die Applikation eines Testpulses von -10 mV erlaubte es, die kapazitiven Widerstände der Elektroden zu kompensieren und die Spannungsklemme zu optimieren. Daraufhin wurde ein Rampenprotokoll gestartet, um die Kapazität der Muskelfibrille (als Maß für die Größe des Muskels) und die Ruheleitfähigkeit der Zelle zu bestimmen (siehe Abbildung 3.4). Die Daten wurden mittels eines PC und der Software CellWorks 3.6 aufgezeichnet und mit einer Frequenz von 10 kHz AD-gewandelt. Die Auswertung erfolgte mit der Software Igor 6.02 (WaveMetrics). Die zur Auswertung geschriebene Prozedur findet sich im Anhang unter A.3.1. Anhand der in Abbildung 3.4 farblich dargestellten Parameter und den nachfolgend gezeigten Gleichungen, konnten somit der Eingangswiderstand und die Membrankapazität bestimmt werden.

Zur Berechnung des Eingangswiderstandes gilt:

Das Ohmsche Gesetz:

$$U = R \times I \Leftrightarrow R = \frac{dU}{dI}$$

$$R = \frac{1}{G}$$

U_M = Membranpotenzial

R_M = Membran- beziehungsweise Eingangswiderstand

I = Strom

G = (Ruhe-)Leitfähigkeit

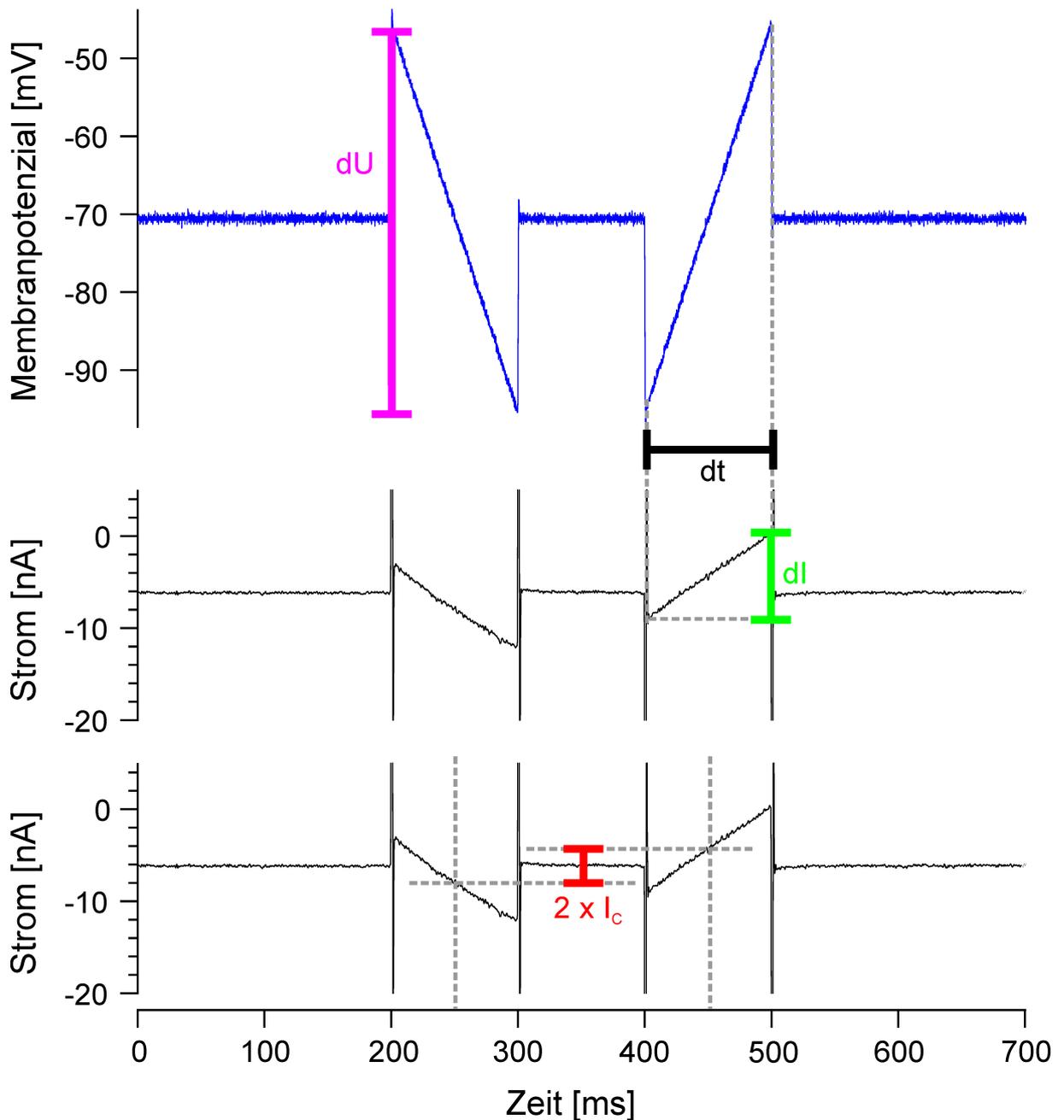


Abbildung 3.4: **oben:** Membranpotenzial während eines Rampenprotokolls zur Messung der Membrankapazität und des Eingangswiderstandes der Muskelfaser
Mitte und unten: Ströme während eines Rampenprotokolls zur Messung der Membrankapazität
 Die hieraus gewonnenen Parameter, die in die entsprechenden Gleichungen zu den gewünschten Ergebnissen führen, sind farbig dargestellt.
Magenta: dU
Schwarz: dt
Grün: dI
Rot: $2 \times dI_C$

Zur Berechnungen des kapazitiven Stromes gilt:

$$I_C = C_M \times \frac{dU}{dt}$$
$$\rightarrow C_M = \frac{I_C}{\frac{dU}{dt}} \rightarrow C_M = \frac{I_C \times dt}{dU}$$

C_M, C = Kapazität

U = elektrisches Potenzial

t = Zeit

I_C = kapazitiver Strom

3.4.3.1 Charakterisierung der Gesamtkalziumströme

Wie bereits in Kapitel 3.4.3 beschrieben war die physiologische Salzlösung, mit der die Versuchstiere perfundiert wurden, verändert. Zum einen wurde das Kalzium weitestgehend entfernt, um Muskelkontraktionen während der Messungen zu vermeiden und zum anderen wurden Blocker für Kaliumkanäle hinzugefügt, um keine Artefakte durch Kaliumströme zu messen. Um, trotz des Weglassens von Kalziumionen in der Badlösung, Ströme durch Kalziumionenkanäle messen zu können, wurde Kalzium durch Barium substituiert. Dies brachte zudem den Vorteil mit sich, dass eine kalziumbedingte Inaktivierung der Kalziumströme verhindert wurde. Insgesamt orientierte sich die Komposition der physiologischen Salzlösung und die Versuchsdurchführung an der von Gielow et al. (1995) durchgeführten Studie zur Messung und Differenzierung von Kalziumströmen bei *Drosophila*-Larven

Zunächst wurde ein Haltepotenzial von -70 mV eingestellt und daraufhin das Messprotokoll gestartet. Dieses sah folgendermaßen aus:

Nach einer Zeitspanne von 10 ms wurde das Haltepotenzial für 50 ms auf -90 mV abgesenkt. Anschließend begann der variable Teil des Protokolls. Innerhalb dessen wurde in einem ersten Schritt für 500 ms eine Spannung von -60 mV angesprungen. In der weiteren Wiederholung wurden die Spannungen von -50 bis zu 20 mV mit einem 10 mV Inkrement angesprungen. Nach jedem Sprung wurde wieder ein Haltepotenzial von -70 mV eingestellt. Die Pause zwi-

schen zwei Messungen betrug 10 s. Für die Auswertung wurde die jeweils maximale Amplitude des aufgezeichneten Stromes, nach Substraktion des linearen Stromes, bestimmt und durch die vorher gemessene Kapazität der entsprechenden Muskelfaser dividiert. Die hierfür geschriebene Prozedur kann im Anhang unter A.3.2 eingesehen werden. Die so erhaltene Stromdichte führte dazu, dass Streuungen aufgrund der unterschiedlichen Muskelgröße verschiedener Versuchstiere minimiert werden konnten. Abbildung 3.5 zeigt das Sprungprotokoll während des Experiments. Es wurden die Maximalströme von neun (EKO-222) beziehungsweise acht (Wildtyp und UAS-EKO) Versuchstieren gemessen, und der daraus resultierende Mittelwert mit Standardfehler als Stromdichte in nA/nF (I/V-Kurve) angegeben. Zusätzlich wurden die relativen Veränderungen der Stromdichten der UAS-EKOs und der EKO-222 in einen Bezug auf das Niveau der Canton S-Tiere in einem Diagramm dargestellt.

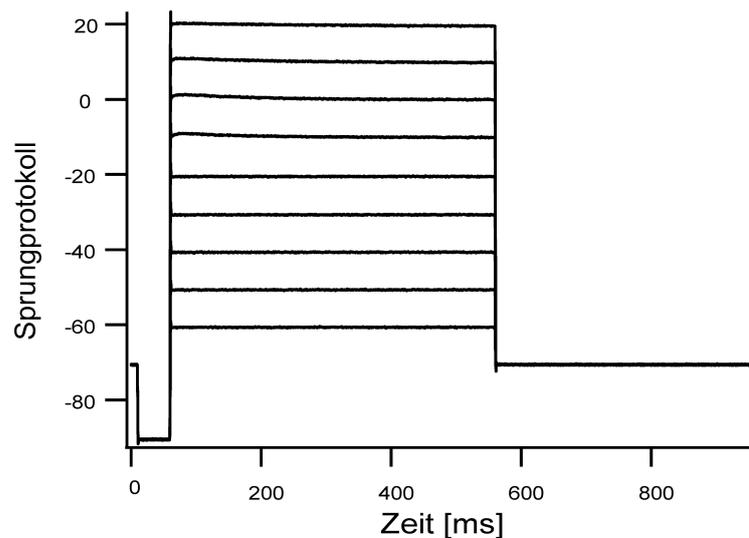


Abbildung 3.5: Sprungprotokoll zur Messung des Gesamtkalziumstromes

3.5 Molekularbiologie

Die Ergebnisse der Elektrophysiologie wurden kritisch hinterfragt, indem die relative RNA-Menge der entsprechenden Ionenkanalgene semiquantitativ bestimmt wurde. Soweit nicht anders angegeben, wurde bei allen Experimenten mit sogenannten Kits gearbeitet, die alle notwendigen Reagenzien und Enzyme enthalten, über deren Zusammensetzung wiederum keine

genaueren Angaben gemacht werden können.

3.5.1 Primerdesign

Für die spezifische Amplifikation der gewünschten Genbereiche wurden ebenso spezifische Oligonukleotide benötigt. Für das Design dieser sogenannten "Primer" wurden die Sequenzen von Interesse in der FlyBase BLAST Datenbank (Version r4.3 - r5.4) auf der Internetseite www.flybase.org nachgeschlagen. Anhand der dort verfügbaren mRNA-Sequenz wurde ein Bereich ausgewählt, in dem sich ein Intron mit einer Länge von mindestens 100 Basenpaaren (bp) befand. Dadurch könnte man eventuelle Amplifikationen von genomischer DNA aufgrund der Länge des PCR - Produkts von der Amplifikation der aus der RNA hergestellten cDNA unterscheiden. Die genauen Primersequenzen können im Anhang nachgeschlagen werden (siehe A.4.3).

3.5.2 Probenaufbereitung

Jeweils fünf Larven wurden für einen Ansatz zunächst in 70%igem Isopropylalkohol gewaschen, getrocknet, der restliche Alkohol abzentrifugiert und anschließend mit einem sterilen Zahnstocher grob homogenisiert.

3.5.3 RNA-Isolation

Die Isolation der Gesamt-RNA der Zelle erfolgte mit dem RNeasy Kit der Firma Qiagen. Die vorbereiteten Proben wurden zunächst in 350 μ l des Lysispuffers (RLT) suspendiert und durch mehrmaliges Aufziehen mit einer feinen Kanüle homogenisiert. Alternativ wurde zur Homogenisierung der Qiashreder verwendet. Dazu wurden die Präparate in Lysispuffer zunächst mit einer Pipette homogenisiert, dann auf diesen Schredder geladen und für eine Minute zentrifugiert. Das Lysat wurde auf die von Qiagen gelieferte RNA-bindende Säule überführt mit 350 μ l 70 %igem Ethanol versetzt und anschließend für 15 s bei 10000 U/min zentrifugiert. Der Durchfluss wurde, wie auch nach allen anderen Zentrifugationsschritten (wenn nicht anders

angegeben) verworfen. Danach wurden 350 μl des Waschpuffers RW1 auf die Säule pipettiert und wiederum für 15 s bei 10000 U/min zentrifugiert. Zwischenzeitlich wurden 10 μl RNase freie DNase mit 70 μl RDD Puffer versetzt. Das Gemisch wurde dann auf die Säule gegeben, die anschließend für 20 min bei Raumtemperatur inkubiert wurde, um Verunreinigungen durch genomische DNA auszuschließen. Nun wurde nochmals ein Waschschriff mit 350 μl RW1 Puffer durchgeführt. Als nächstes wurden 500 μl der RPE Lösung auf die Säule gegeben und für 1 min bei 8000 U/min zentrifugiert. Nach der Wiederholung dieses Schrittes wurde der Durchfluss wiederum verworfen und ein weiteres mal bei 8000 U/min zentrifugiert, um die sich in der Säule befindliche Membran zu trocknen. Als letzter Schritt wurde die so aufgereinigte RNA in ein RNase-freies Eppendorfgefäß eluiert indem die Membran mit 30 μl Wasser beladen und anschließend für 1 min bei 8000 U/min zentrifugiert wurde. Die RNA konnte direkt weiterverarbeitet oder bei -80°C gelagert werden.

3.5.4 Reverse Transkription

Da in den folgenden Versuchen nur DNA und nicht RNA eingesetzt werden konnte, musste die RNA in DNA umgeschrieben werden. Dazu wurde eine reverse Transkriptase benutzt (SuperScript II, Invitrogen), die normalerweise aus Retroviren stammt. Für einen 20 μl -Versuchsansatz wurden zunächst 1 μl Random-Hexamer-Oligonukleotide, 10 μl der isolierten RNA und 1,5 μl RNase-freies Wasser gemischt und für 5 min bei 65°C inkubiert. Danach wurden 4 μl Puffer und 2 μl DTT hinzugefügt. Das Gemisch wurde für 2 min bei 25°C belassen. Letztlich wurden 0,5 μl der reversen Transkriptase (SuperScript II, Invitrogen) beigefügt und nochmals für 10 min bei 25°C inkubiert. Die eigentliche Erststrangsynthese erfolgte dann bei 42°C für 50 min. Die Enzyme wurden in einem finalen Schritt bei 70°C für 5 min denaturiert.

3.5.5 Polymerase Kettenreaktion

Die durch die reverse Transkription hergestellte cDNA wurde als Matrize ("Template") für die Polymerase Kettenreaktion (PCR) eingesetzt. In jedes Reaktionsgefäß kamen 3 μl 10x Puffer und 1,5 μl dNTPs. Von den sequenzspezifischen Oligonukleotiden wurden 1,5 μl sowohl für

die Sinn-Richtung als auch für die Gegensinn-Richtung eingesetzt. Nach der Zugabe von 2,5 μl des Templates und 10,5 μl Wasser wurde 1 μl der thermostabilen DNA-Polymerase (Roche) hinzugefügt und die Amplifikation im PCR-Gerät der Firma Thermo Hybaid gestartet. Nach einem anfänglichen Denaturierungsschritt von 2 min bei 94° C, startete der zyklische Teil des PCR-Programmes. Innerhalb eines Zyklus wurde die Probe zunächst für 30 s auf 94° C erhitzt um die DNA-Doppelstränge aufzuschmelzen. Danach wurde die Probe für 45 s auf die primerspezifische Anlagerungstemperatur gebracht ("Annealing"). Die Elongation erfolgte bei 72° C für 45 s. Nach 35 durchlaufenen Zyklen wurde eine finale Elongation bei 72° C für 2 min durchgeführt. Nach Abschluss des Programmes wurden die Proben bei 4° C gekühlt, bis sie in einem 1 - 1,3 %igen Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt wurden.

Dazu wurden 0,5 - 0,65 g Agarose mit 50 ml 1x TAE-Puffer versetzt und in einer Mikrowelle zum Sieden gebracht. Nachdem die Agarose vollständig gelöst war, wurden 2,5 μl Ethidiumbromid hinzugegeben und das Gel in eine Elektrophoresekammer gegossen. Sobald die Agarose abgekühlt und somit polymerisiert war wurde die Kammer mit 1x TAE Puffer aufgefüllt. 10 μl aus der PCR-Reaktion wurden mit 2 μl 6x Ladepuffer versetzt und davon 10 μl in die Taschen des Gels pipettiert. Durch Anlage eines elektrischen Feldes in der Gelkammer werden die negativ geladenen Nukleinsäuren zur Anode gezogen. Nach circa 1 h bei 80 V, war die Auftrennung erfolgt. Durch das in das Gel eingegossene Ethidiumbromid, welches in doppelsträngige Nukleinsäuren interkaliert, konnten die Banden im Gel unter UV-Beleuchtung sichtbar gemacht, fotografiert und wie nachfolgend beschrieben quantifiziert werden.

3.5.6 Bestimmung der Expressionsrate

Zum Nachweis von Expressionsunterschieden war es wichtig, einen internen Standard als Referenz zu benutzen. Dazu werden sogenannte "Housekeepinggenes" verwendet, die ubiquitär exprimiert und keinerlei (oder möglichst wenig) Regulation unterworfen sind. Bei *Drosophila melanogaster* wird hierfür meist das ribosomale Protein 49 (rp49) verwendet. Dieser interne Standard diente zur Kontrolle für die eingesetzte RNA-Menge. Die nach der Gelelektrophorese erhaltenen Bilder wurden in digitaler Form gespeichert. Mit der Software ImageJ (Version

1.38x) konnten die Fluoreszenzintensitäten der Banden bestimmt werden. Durch Quotientenbildung aus der Bandenintensität der entsprechenden Produkte durch den Intensitätswert für den internen Standard konnten Schwankungen bei der RNA-Isolation oder der RT-Reaktion minimiert, und so die einzelnen Proben miteinander verglichen werden. Insgesamt wurden fünf unabhängige RNAs pro Versuchstiergruppe isoliert. Mit jeder RNA wurde in unabhängigen Reaktionen eine cDNA hergestellt. Mit jeder cDNA wurden drei PCRs durchgeführt. Dadurch ergab sich ein **n** von 5 und ein **N** von 15. Die Ergebnisse wurden als Mittelwerte mit Standardabweichung in einem Diagramm dargestellt. Die statistische Signifikanz wurde mit der paarweisen Vergleichsmethode nach Holm-Sidak überprüft.

3.5.7 Gelelution

Damit gewährleistet war, dass die amplifizierten Produkte keine unspezifischen Amplifikate waren, die zufällig die jeweilig entsprechende Größe aufwiesen, mussten diese sequenziert werden. Dazu wurden unter UV-Licht die Banden, die die erwartete Größe aufzeigten, mit einem Skalpell aus dem Gel ausgeschnitten und in ein steriles Eppendorfgefäß überführt. Die weitere Bearbeitung erfolgte mit dem Qiaquick Gelextraction Kit. Pro 100 mg Gelgewicht wurden 300 μl QG Puffer hinzugefügt und für 10 min auf 50° C erhitzt. Dabei wurde das Gemisch alle 2 - 3 min geschüttelt. Anschließend wurden pro 100 mg Gelgewicht 100 μl Isopropanol beigefügt. Nach der Durchmischung wurde mit dieser Mixtur die mitgelieferte, DNA-bindende Säule beladen. Nach einem Zentrifugationsschritt von 1 min Dauer bei 18000 \times g, wurde die Säule mit 750 μl PE-Puffer gewaschen und abermals zentrifugiert (1 min, 18000 \times g). Um die in der Säule befindliche Membran zu trocknen, wurde das Eluat verworfen und ein weiteres Mal unter den gleichen Bedingungen zentrifugiert. Die nun gewaschene DNA wurde mit 50 μl sterilem Wasser in der Zentrifuge von der Säule gewaschen. Die so aufgereinigte DNA konnte ohne weitere Behandlung für die folgende Transformation eingesetzt werden.

3.5.8 Transformierung und Klonierung

Damit das aufgereinigte PCR-Produkt sequenziert werden konnte, musste dies zunächst in *Escherichia coli* transformiert werden, um es zu vermehren. Hierzu wurde der pGemT–Easy Klonig Kit der Firma Promega benutzt. Dazu wurde das Produkt zunächst in ein Plasmid (pGemT) ligiert. Hierfür wurden 5 μl des 2x Puffers mit 1 μl des Vektors, 3 μl des aufgereinigten PCR-Produkts und 1 μl der T4-DNA-Ligase gemischt. Mit der Zugabe von 10 μl sterilem Wasser wurde ein Reaktionsvolumen von insgesamt 20 μl hergestellt. Die Ligation erfolgte bei 4° C über Nacht.

Von dieser Ligation wurden 2 μl mit 50 μl hochkompetenter *E. coli* Zellen (Stamm: JM109) vermischt und für 20 min auf Eis inkubiert. Danach wurde das Gemisch für 40-50 s im Wasserbad auf 42° C erhitzt. Dieser Hitzeschock sorgte für die Aufnahme des Plasmids durch die Bakterien. Anschließend wurden 950 μl des NZY-Mediums hinzugefügt und für 1,5 h bei 37° C unter leichtem Schütteln präinkubiert. Abschließend wurden 100 μl dieser Kultur auf die LB-Agarplatten ausgestrichen und über Nacht bei 37° C im Inkubator bebrütet. Aufgrund der Selektionsmechanismen (Ampicillin-Resistenz, blau/weiß-Test) konnten nun die Bakterien ausgewählt werden, bei denen die Plasmidaufnahme erfolgreich war und deren Plasmid das PCR-Produkt enthielt. Nur diese Bakterien wurden für die anschließende Sequenzierung aufbereitet.

3.5.9 Mini-Prep, Sequenzierung und Datenbankabgleich

Für eine erfolgreiche Sequenzierung musste die Menge an DNA weiter vermehrt werden. Daher wurde von den als positiv transformiert identifizierten Klonen eine Flüssigkultur angelegt. 3 ml LB-Medium wurden mittels eines sterilen Zahnstochers mit einer als positiv identifizierten Kolonie angeimpft, und über Nacht bei 37° C unter Schütteln inkubiert. In einer, Mini-Prep genannten, Prozedur wurden mit dem QIAprep Spin Miniprep Kit (Qiagen), die in *E. coli* vermehrten Plasmide zurückgewonnen. Um die gewachsenen Bakterienzellen zu sedimentieren, wurde die Kultur für 5 min bei 18000 \times g zentrifugiert. Das so entstandene Zellpellet wurde in 250 μl des P1-Puffers resuspendiert und in ein steriles Eppendorfgefäß überführt. Nach der

Zugabe von 250 μl des Puffers P2 wurde das Gefäß 4-6 mal invertiert, um eine Durchmischung zu erreichen. Anschließend wurden 350 μl der Lösung N3 hinzugegeben, wie vorher gemischt und anschließend für 10 min bei $17000 \times g$ zentrifugiert. Der Überstand wurde auf eine der mitgelieferten, DNA-bindenden Säulen pipettiert und für 60 s zentrifugiert. Der Durchfluss wurde verworfen. Durch Hinzugabe von 0,5 ml PB-Puffer und 0,75 ml PE-Puffer mit jeweils anschließendem Zentrifugationsschritt, wurde die DNA auf der Säule gewaschen. Nach dem Waschen mit PE-Puffer wurde die Säule durch Zentrifugation getrocknet (1 min, $18000 \times g$). Die DNA wurde schließlich mit 50 μl des EB-Puffers eluiert.

Die aufgereinigte DNA konnte nun auf eine Konzentration von 2-3 μg in 20 μl eingestellt werden und wurde an die Firma MWG Biotech zur Sequenzierung geschickt. Dort wurde das Plasmid, ausgehend von der darauf befindlichen SP6-Primer-Sequenz nach der Sanger-Methode sequenziert. Das Ergebnis wurde in elektronischer Form übermittelt und anhand der *Drosophila* - Genomdatenbank auf der Internetseite www.flybase.org überprüft. Dabei wurden die übermittelten Sequenzen mit denen verglichen, die sich in der Datenbank befinden. Nur Treffer bei denen mindestens 99 % der Suchanfrage mit der Datenbank übereinstimmten wurden als positive Treffer bewertet. Pro Amplifikat wurden jeweils zwei unabhängige Proben aufbereitet und zur Sequenzierung geschickt.

3.6 Verhaltensbiologie

Abschließend wurden einige Verhaltensversuche gemacht, um die Wirkung der Expression des EKO-Shaker-Kanals besser abschätzen zu können. Dazu wurden die sogenannten "Gene-Switch"-Mutanten benutzt, bei denen es möglich war, die Expression des Transkriptionsfaktors Gal4 spontan (innerhalb von 21 h) zu induzieren. Daher bleibt dieser Art von EKO-Mutante keine beziehungsweise nur sehr wenig Zeit, zur Kompensation der eingebrachten Störung.

3.6.1 Bewegungsanalyse

Die Larven, die durch das Vorhandensein einer, durch das GFP vermittelten Grünfluoreszenz, als erfolgreich induziert eingestuft werden konnten, wurden zu Bewegungsanalysen herangezogen. Dafür wurden diese zunächst in demineralisiertem Wasser gewaschen, um etwaige Futterreste zu entfernen und anschließend getrocknet. Danach wurde jeweils eine Larve auf die Lauffläche überführt. Als Lauffläche diente eine schwarze Platte mit einer kreisrunden Vertiefung die mit Apfelsaftschorle-Agar (3% (w/v)) gefüllt worden war. Nach einer Erholungsphase von 1 min wurde die Videoaufzeichnung gestartet. Mit einer Frequenz von durchschnittlich 10 Einzelbildern pro Sekunde wurde ein Film mit einminütiger Dauer aufgezeichnet. Durch das Programm ImageJ wurde der Film zunächst in eine 8-bit-Graustufen Bilderfolge zerlegt und mit Hilfe eines Schwellenalgorithmus in eine binäre schwarz-weiß-Folge. Dadurch erschien die Larve als einziges Objekt (schwarz) vor weißem Hintergrund und konnte nun durch das Tracking-Plugin der Software bildweise in ihrer Bewegung verfolgt werden. Von Bild zu Bild wurden die X/Y- Koordinaten des Objektes ermittelt und ausgegeben. Die so erhaltenen Daten wurden mit der Software IgorPro 6.02 weiterverarbeitet. Zunächst wurde die Differenz in X- und in Y-Richtung von einem Bild zum nächsten bestimmt. Die Relativbewegung wurde nach Pythagoras ausgerechnet und die Summe aller Teilstrecken aufaddiert. Hieraus ergab sich die Gesamtdistanz, die in einer Minute zurückgelegt wurde. Die Instantangeschwindigkeit in mm/s ergab sich aus der Summe der Bewegungsdifferenz von zehn Einzelbildern. Aus den 60 so erhaltenen Einzelwerten konnte eine mittlere und eine maximale Geschwindigkeit errechnet werden. Die Ergebnisse wurden als Säulendiagramme mit Standardfehlern in einem Diagramm dargestellt und nach Holm-Sidak statistisch überprüft. Für die Gruppe der Canton S betrug die Anzahl der Versuchstiere $n=23$, die Anzahl der EKO-222 betrug $n=25$ und für die Gruppe MHC-EKO waren es $n=22$ Versuchstiere.

3.6.2 Erregungs-Kontraktionskopplung unter kontrollierten Bedingungen

Die in Abschnitt 3.4.1 beschriebene Präparation wurde auch für diese Messreihe benutzt. Allerdings wurde hier darauf geachtet, dass das komplette Nervensystem entfernt wurde (siehe auch Abbildung 3.6). Zur Stimulation wurde ein Verstärker mit Möglichkeit zur Spannungsklemme verwendet (SEC-10L, npi). Aus Glaskapillaren wurden Intrazellulärelektroden hergestellt, die den Stromelektroden aus den Versuchen zur Messung der Kalziumströme entsprachen. Diese wurden mit 2M Kalium-Zitrat + 100 mM KCl gefüllt. Der Widerstand der Elektroden lag bei etwa 5-6 M Ω . Diese Elektroden wurden dann unter dem Binokular bis auf wenige Mikrometer an Muskel 6 herangeführt. Unter Beobachtung auf dem Oszilloskop (Yogokawa DL 1450) konnte das Aufsetzen der Elektrodenspitze auf der Zelle durch einen wenige mV betragenden Spannungsabfall erkannt werden. Durch eine kurze Überkompensation der Kapazität der Elektrode geriet diese in Schwingung, und penetrierte so die Zellmembran. In diesem Zustand wurden alle Parameter des Intrazellulärverstärkers (SEC-10L, npi) eingeregelt, um erfolgreich in den Modus der Spannungsklemme wechseln zu können. In diesem Modus wurden die Einstellungen des Verstärkers noch weiter optimiert, bis die Zeit zum Erreichen der maximalen Amplitude eines Spannungssprunges kürzer als 10 ms war. "Space-Clamp"-Probleme, bei der die Spannung der zu messenden Zelle, in diesem Falle des Muskels, nur in einem Bereich nahe der Einstichstelle kontrolliert wird, konnten ausgeschlossen werden, da hierzu vorab Versuche gemacht wurden, die belegten, dass die Spannung über die gesamte Länge des Muskel maximal 5 - 10% abnimmt. Bei einem mittigen Einstich in die Muskelfaser würde sich hier ein Spannungsabfall ergeben, der noch geringer wäre. Mit der Software Spike2 wurden Pulse definiert, die über das CED 1401plus an den Verstärker gegeben wurden.

Von einem Haltepotenzial von -60 mV aus wurden Spannungssprünge mit einer Dauer von 200 ms in positive Richtung gemacht. Diese besaßen ein Inkrement von jeweils 5 mV zum vorangegangenen Impuls. Gleichzeitig wurde die Kraft der Muskeln gemessen. Es wurde die Schwelle bestimmt, an der Muskel 6 zu kontrahieren beginnt. Des Weiteren wurde für jeden Spannungssprung die Kraft gemessen. Da sich zeigte, dass die Maximalamplitude bei allen

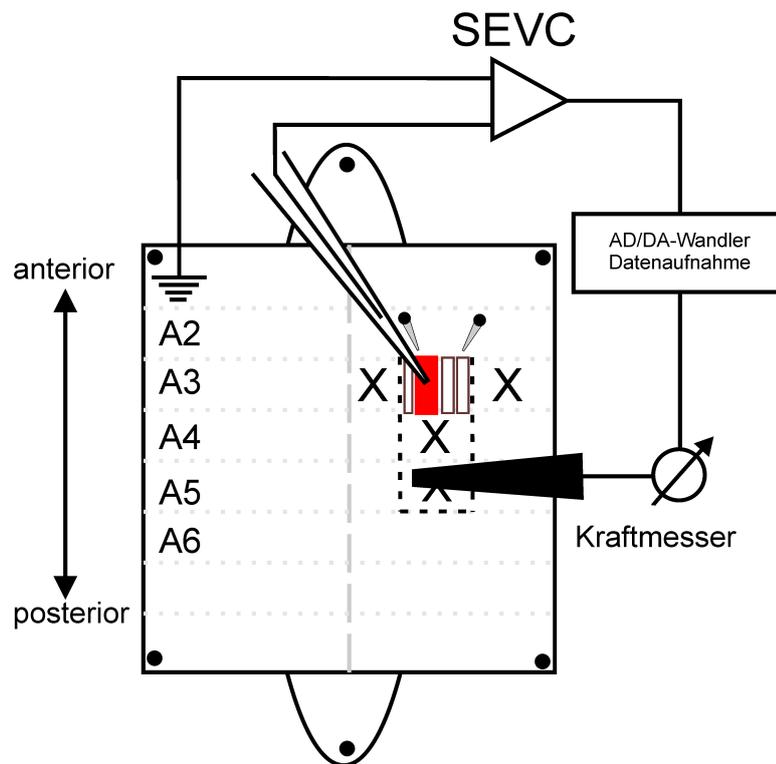


Abbildung 3.6: Schematische Darstellung des Versuchsaufbaus zu den Messungen der Erregungs-Kontraktionskopplung des Muskels 6 unter den kontrollierten Bedingungen der Spannungsklemme
A2-A6: Segmentbezeichnungen
X: Durch Scherenschnitte zerstörte Muskulatur

Messungen bei einer Membranspannung von +20 mV erreicht war, wurden, um die in den einzelnen Experimenten variierenden Kontraktionsamplituden vergleichbar zu machen, die Werte der Kontraktionskräfte jedes Experiments jeweils auf den Maximalwert bei +20 mV normiert. Für alle auswertbaren Experimente wurden die Daten gemittelt (Canton S: n=8; EKO-222 n=12; MHC-EKO: n=9), und mit dem Standardfehler in einem Diagramm dargestellt. Die normierten Daten jedes einzelnen Experiments wurden am besten mit einem sigmoiden Regressionsmodell, das auf der im Folgenden dargestellten Gleichung beruht, beschrieben:

$$f(V_M) = base + \frac{max}{1+exp\left(\frac{V_{M0,5}-V_M}{rate}\right)}$$

Die aus dieser Funktion erhaltenen Parameter (**rate** für die Steigung des linearen Teils der Kurve und $V_{M0,5}$ für den Membranspannung V_M an der Stelle des Halbmaximums) wurden ebenfalls für jede Versuchstiergruppe gemittelt, und mit dem Standardfehler angegeben. Die Überprüfung auf statistische Signifikanz erfolgte mit der "Methode nach Dunn".

Um die Stärke der Expression des EKO-Kanals abschätzen zu können, wurde die Maximalamplitude des Stromes ermittelt, der nötig war, um ein Potenzial von -20 mV zu erreichen, da sich erst ab -15 mV ein eindeutiger Einbruch bei den EKO-Tieren zeigte. Die Ergebnisse wurden als Mittelwerte mit Standardfehler in einem Diagramm dargestellt, und nach der bereits erwähnten "Methode nach Dunn" auf statistische Signifikanz untersucht.

3.6.3 Lokalisation der Kalziumkanäle

Zur Darstellung der Verteilung der spannungsabhängigen Kalziumkanäle wurden diese Immunohistochemisch angefärbt. Dazu wurden die Präparate nach der in Abschnitt 3.3 beschriebenen Art und Weise vorbereitet und anschließend für 2 h in 4%igem Paraformaldehyd in Phosphatpuffer (PB) (w/v) fixiert. Danach wurden die fixierten Präparate 3 mal für je 20 Minuten mit Phosphatpuffer mit 0,5% (v/v) Triton X 100 (PB-X) gewaschen. Dann wurden die fixierten Tiere über Nacht in einem Verhältnis von 1:100 in PB-X-verdünnten Primäantikörper inkubiert. Details zu den verwendeten Antikörpern sind im Anhang unter A.4.4 zu finden. Daraufhin wurde 3 mal jeweils für 20 min mit PB-X gewaschen. Der 1:200 in PB-X-verdünnte, fluoreszenzgekoppelte Zweitantikörper wurde für 1 h zur Inkubation hinzugegeben. Die gefärbten

Tiere wurden bei einer Anregungswellenlänge von 550 nm (Emission bei 570 nm) unter einem Mikroskop (Zeiss Axioskop I) betrachtet und mittels einer VDS 1300B Kamera (Vosskühler) sowie dem Programm Lucia 5.0 (Lucia-Imaging) am PC aufgenommen.

3.7 Statistik

Bei allen statistischen Auswertungen wurden nicht-parametrische Tests angewendet. Dabei handelte es sich um einfaktorielle Varianzanalysen zum Vergleich mehrerer Gruppen (ANOVA). Wenn sich zeigte, dass die Daten nicht normalverteilt waren, wurde eine Varianzanalyse der Rangsummen nach Kruskal-Wallis durchgeführt. Bei allen Tests wurde eine maximale Irrtumswahrscheinlichkeit von 5% festgelegt. Die verwendeten *post-hoc*-Tests sind in den jeweiligen Kapiteln der Beschreibung des experimentellen Vorgehens erwähnt. In den Ergebnissen sind demnach nur noch die Signifikanzniveaus (P) dargestellt.

4 Ergebnisse

4.1 Kreuzung von genetisch veränderten Tieren

Wie bereits unter Abschnitt 3.2 beschrieben, konnte eine erfolgreiche Kreuzung der Gal4-Treiberlinie mit der UAS-EKO-Empfängerlinie und somit auch die Expression des modifizierten Shaker-Kaliumkanals durch grüne Fluoreszenz bei Anregung mit Licht der Wellenlänge zwischen 460 und 480 nm, nachgewiesen werden. Die nachfolgenden Abbildungen zeigen die Expression des Kanals im Überblick (4.1) und im Detail (4.2).

Neben den motorischen Synapsen (Abbildung 4.2, Mitte links und rechts) fluoreszierten auch die Zellkerne der Muskelfasern mehr oder weniger stark. Weitere Strukturen, die den EKO-Shaker unter diesem Treiber exprimierten, waren die Muskelansatzstellen (oben rechts) und die als "cap-cells" indentifizierten Bereiche der pentascolopidialen Chordotonalorgane (oben links). Bei rein muskulärem Treiber (MHC-Gal4) war ein positives Fluoreszenzsignal allein bei den motorischen Synapsen zu erkennen (unten links und rechts). Ausschließlich die Tiere, die durch die Fluoreszenz als positiv für die EKO-Mutation identifiziert werden konnten, wurden für die Versuche eingesetzt. Die Identifikation war aufgrund der Vielzahl der leuchtenden Strukturen auch ohne Eröffnung des Tieres problemlos möglich.

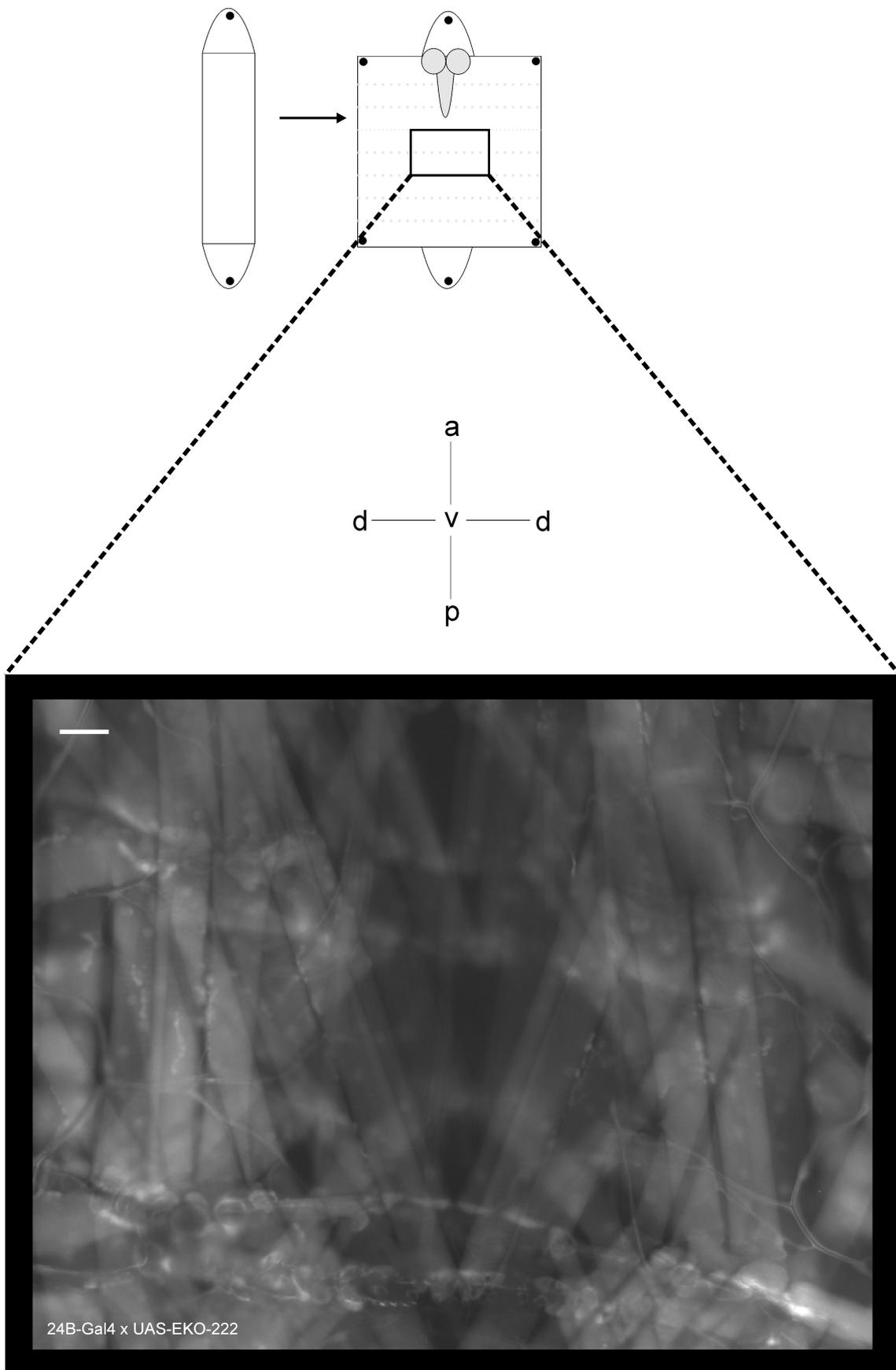


Abbildung 4.1: Fluoreszenzaufnahme; Übersichtsdarstellung des EKO-Expressionsmusters bei Kreuzung der UAS-EKO-Linie mit 24B-Gal4-Treiberlinie; Maßstab 250 μm

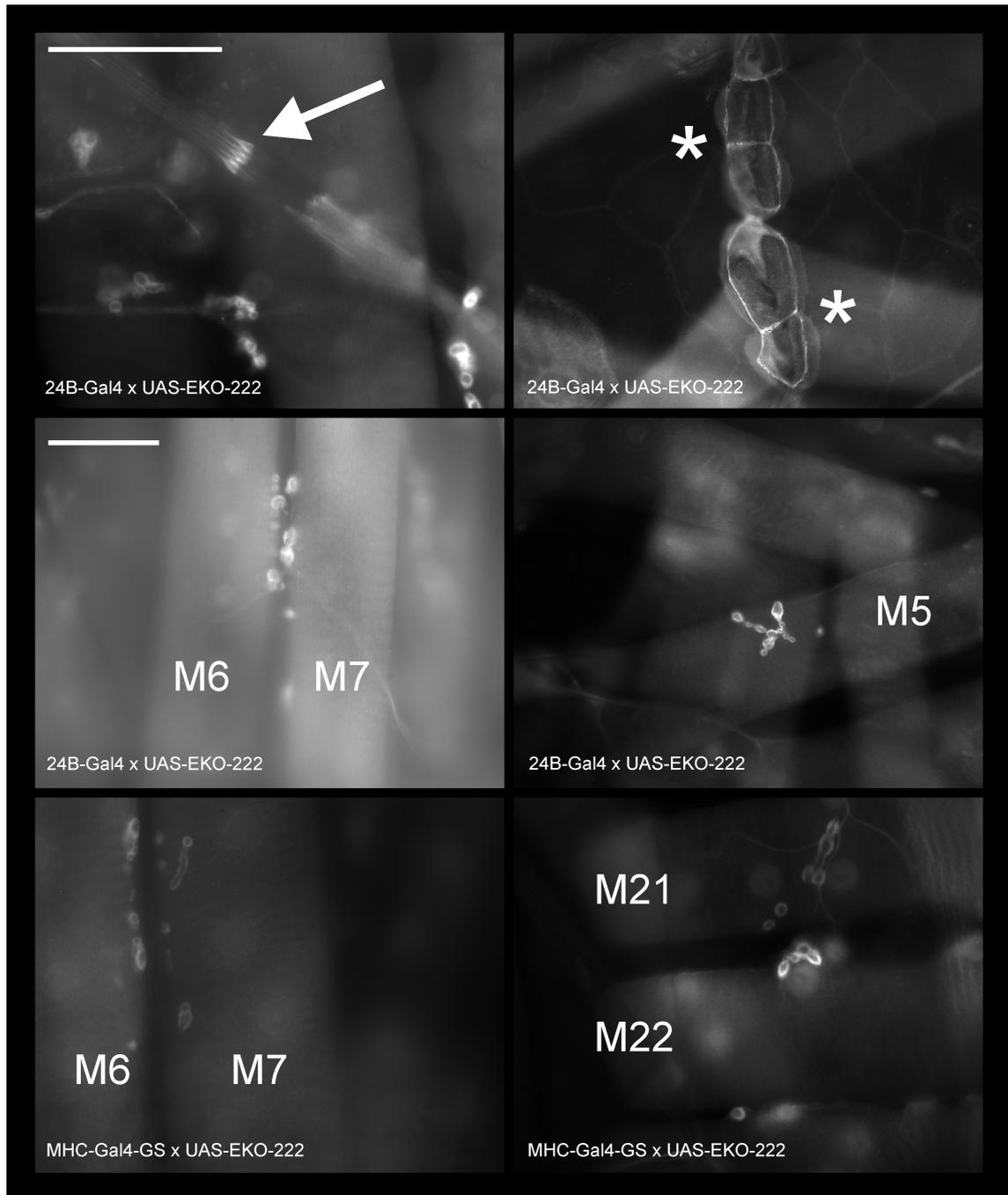


Abbildung 4.2: Fluoreszenzaufnahmen; Vergleichende Darstellung fluoreszierender Strukturen bei Nachkommen aus der Kreuzung von UAS-EKO mit 24B-Gal4 (oben und Mitte) und mit MHC-Gal4 (untere Reihe) Tieren;
oben: Der Pfeil markiert die Cap-Cells eines pentascolopodialen Chordotonalorgans (links); die Sterne verweisen auf die Muskelansatzstellen (rechte Abbildung)
Mitte und unten: Motorische Synapsen bei Muskel 6 und 7 (linke Abbildungen) sowie Muskel 25 (rechte Abbildungen)
 Maßstäbe: 50 μm

4.2 Elektrophysiologie

4.2.1 Kraftmessung an einzelnen Körperwandmuskeln

Um Unterschiede in der Kontraktilität der Körperwandmuskulatur, bei elektrischer Stimulation über den motorischen Nerv, zu untersuchen, wurden Kraftmessungen an den ventralen Longitudinalmuskeln 6, 7, 12 und 13 vorgenommen. Während Abbildung 4.3 nur beispielhaft einige Kontraktionen der Versuchstiergruppen Canton S und den mutierten EKO-222 bei verschiedenen Stimulusfrequenzen zeigt, sind die zusammengefassten Ergebnisse in Abbildung 4.4 dargestellt. Eine direkte Gegenüberstellung der Rohdaten der Kontraktionen zeigte keine auffälligen Unterschiede bei Stimulusfrequenzen von 0,5 und 2 Hz.

Bei einer Reizung, die zu einer tetanischen Kontraktion führte (20 Hz), waren die gemessenen Kräfte bei den EKO Tieren geringer. Die in Abbildung 4.4 verwendete Farbgebung setzt sich, soweit möglich, durch alle weiteren Abbildungen hindurch fort. Dabei werden in schwarzen Balken die Ergebnisse der Canton S-Gruppe, in grauen, die der ungekreuzten, phänotypisch dem Wildtyp entsprechenden UAS-EKO und in weißen Balken, die der mutierten EKO-222-Gruppe gezeigt. Die hier gezeigte Auswertung der vorher angesprochenen Rohdaten entspricht den Mittelwerten mitsamt Standardabweichung. Die mittlere Kraft für die Reizfrequenz von 0,5 Hz betrug für die Versuchstiergruppe der Wildtypen $9,75 \mu\text{N} \pm 4,42$. Die zweite Kontrollgruppe (UAS-EKO) lag bei $15,54 \pm 14,95 \mu\text{N}$. Die mutierten EKO-222 erzeugten eine mittlere Kraft von $4,47 \pm 4,37 \mu\text{N}$. Für 2 Hz Reizfrequenz ergaben sich folgende Ergebnisse: Die Canton S konnten eine Kraft von $8,02 \pm 3,62 \mu\text{N}$ erzeugen, während die UAS-EKO eine Kraft von $30,06 \pm 32,37 \mu\text{N}$ erzeugten. Die mutierten EKO-222 erzeugten im Mittel eine Kraft von $8,39 \pm 9,95 \mu\text{N}$. Eine Reizung mit einer Frequenz von 20 Hz hatte sich in den Vorversuchen als tetanische Reizfrequenz herausgestellt. Die Kontraktionsamplituden zeigten eine deutliche Steigerung im Vergleich zu den vorangegangenen Messungen. Die konkreten Werte lagen bei $160,37 \pm 66,73 \mu\text{N}$ (Canton S), $117,22 \pm 65,03 \mu\text{N}$ (UAS-EKO) und $87,50 \pm 61,78 \mu\text{N}$ (EKO-222). Die statistische Überprüfung zeigte selbst bei 20 Hz Stimulusfrequenz keine signifikanten Unterschiede zwischen den Versuchstiergruppen ($P=0,056$). Ebenfalls auffällig waren

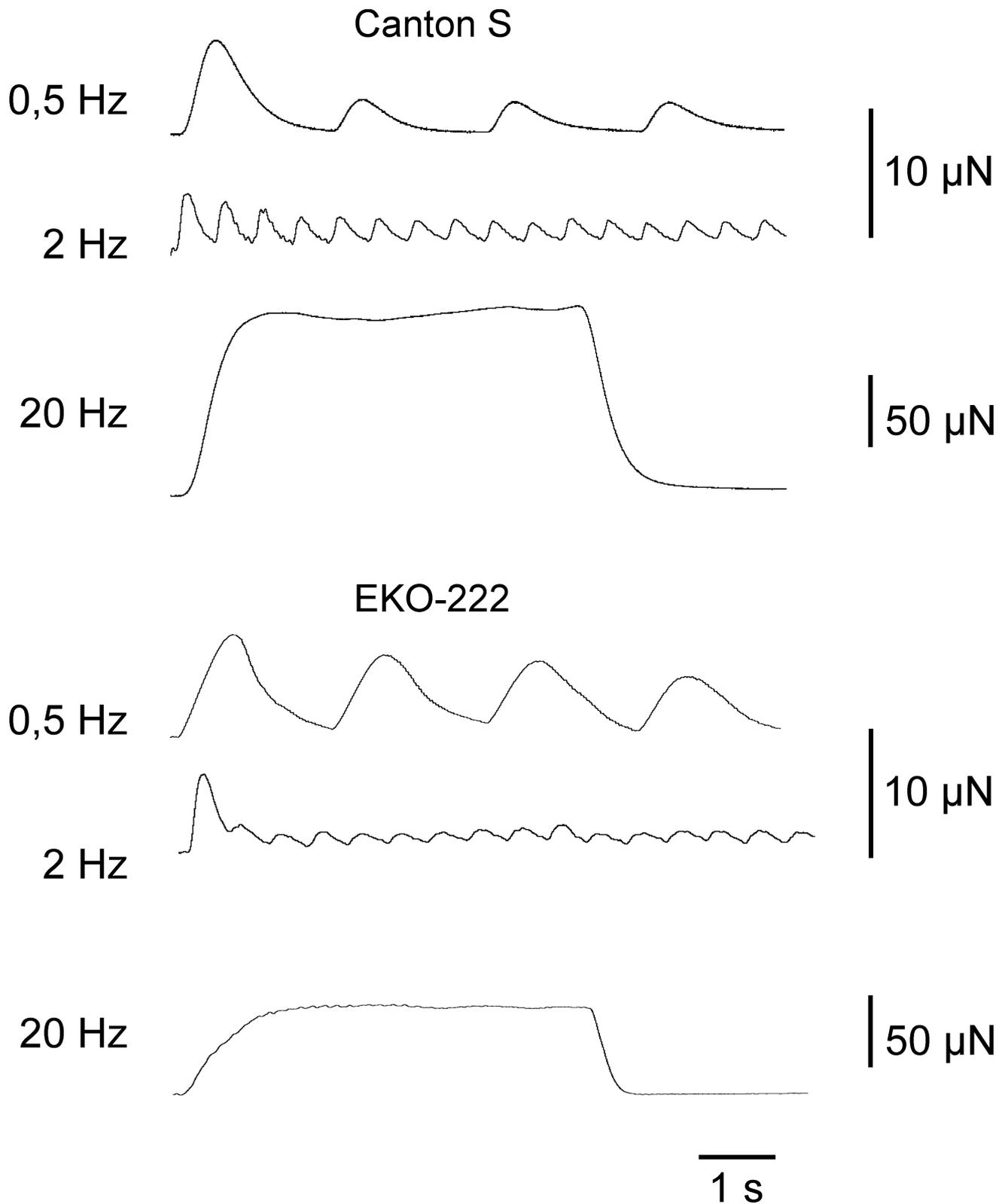


Abbildung 4.3: Originaldaten; Vergleichende Darstellung der Kontraktionsmessungen bei Wildtyp und mutierten (EKO-222) *Drosophila melanogaster* bei nervaler Reizung mit verschiedenen Stimulusfrequenzen.
Horizontaler Maßstab: 1s, Vertikaler Maßstab 10 bzw. 50 μN

die sehr großen Streuungen, die bei diesen Kraftmessungen insgesamt zutage traten. Um Unterschiede in der Kontraktionskinetik auszuschließen, wurden die Zeiten ausgewertet, in denen die Kraft auf die Hälfte des Maximums angestiegen, und vom Maximum bis zur halben Maximalamplitude abgefallen war. Dazu wurden ausschließlich Einzelkontraktionen ausgewertet. Die Ergebnisse können der Abbildung 4.5 als Mittelwerte mit Standardabweichung entnommen werden. Die Zeiten für die Halbanstiegszeit betragen in ms $71,7 \pm 19,37$ (Canton S), $119,0 \pm 19,511$ (UAS-EKO) und $95,7 \pm 37,882$ (EKO-222). Die Halbabfallszeiten waren wesentlich länger und betragen im Mittel $229,7 \pm 124,7$ ms (Canton S), $262,7 \pm 36,9$ ms (UAS-EKO) und $240,7 \pm 84,2$ ms (EKO-222). Die Tests auf Signifikanz der Unterschiede zeigte, dass sich die UAS-EKO Gruppen im paarweisen Vergleich signifikant ($p \leq 0,05$) von den anderen beiden Gruppen unterschied. Zwischen den Canton S und den EKO-222 war kein Unterschied festzustellen. Bei den Halbabfallszeiten war ebenfalls kein signifikanter Unterschied nachweisbar.

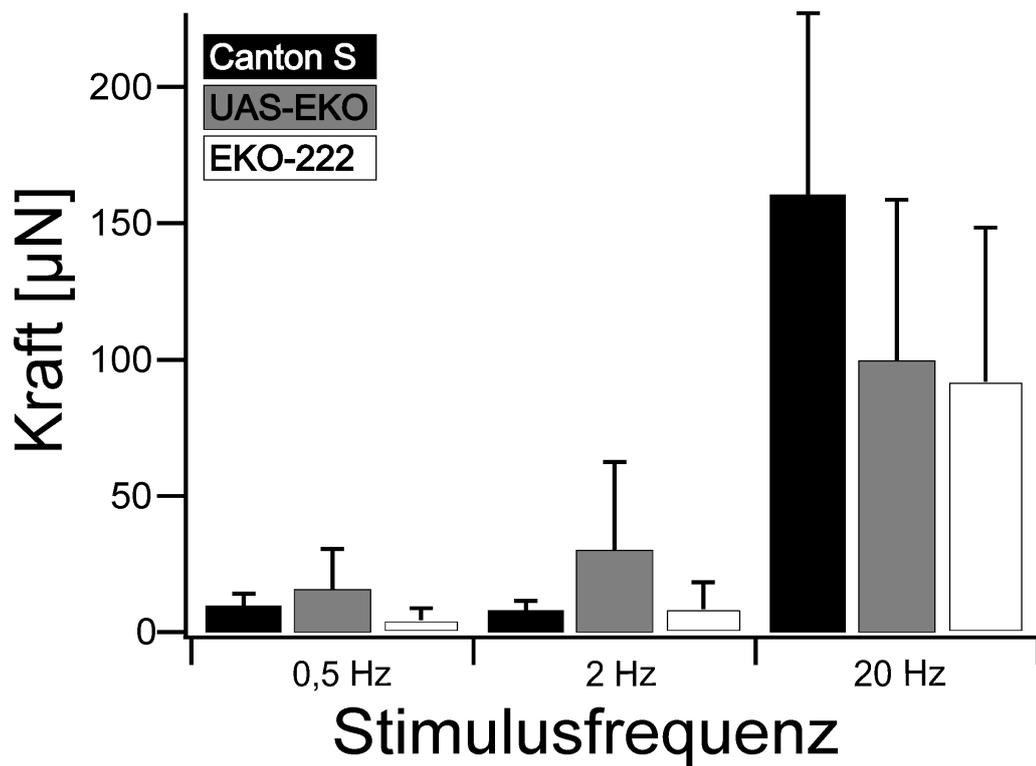


Abbildung 4.4: Ergebnisse der Kontraktionsmessungen für die drei Versuchstiergruppen (Canton S, UAS-EKO und EKO-222) bei verschiedenen Stimulusfrequenzen; Mittelwerte mit Standardabweichung; n=10

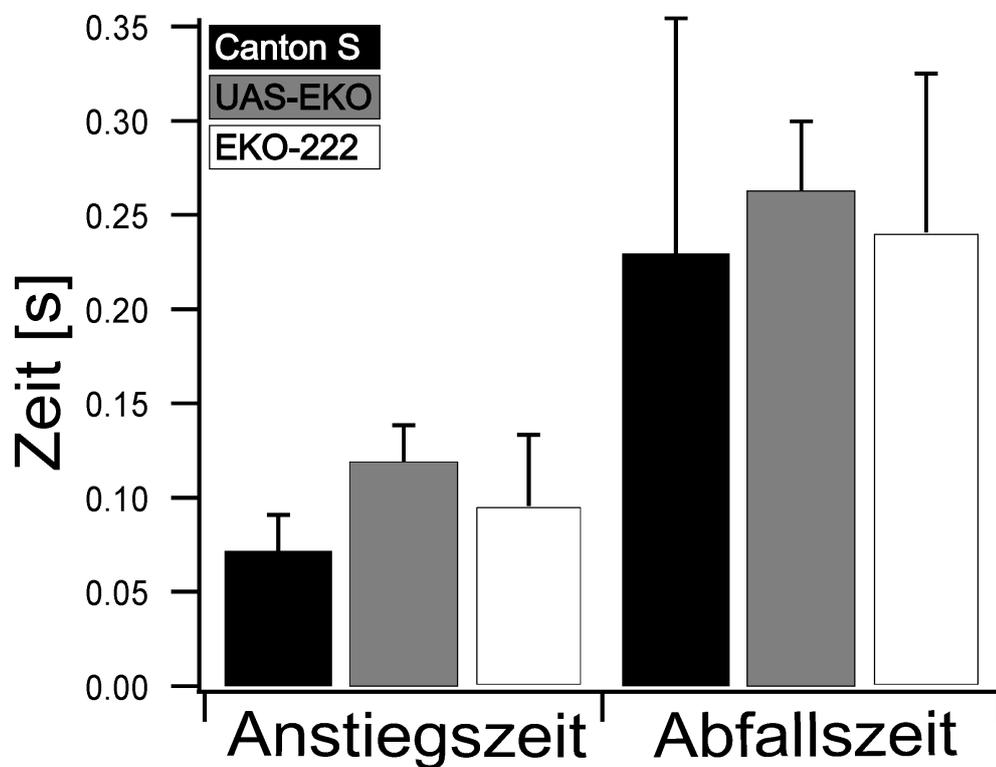


Abbildung 4.5: Kinetik bei Einzelkontraktionen, Anstiegs- und Abfallszeit bis zur halbmaximalen Amplitude; Mittelwerte mit Standardabweichung; n=10

4.2.2 Charakterisierung der motoneuronalen Aktivität

Die etwaige Veränderung der motoneuronalen Aktivierung der Muskeln, im Hinblick auf kompensatorische Veränderungen, wurde durch extrazelluläre Ableitung von Muskelpotenzialen während der rhythmischen Aktivität des Nervensystems untersucht.

Für die Gruppen Canton S und EKO-222 werden die Rohdaten beispielhaft in Abbildung 4.6 präsentiert. Der obere Teil stellt hierbei die Aktivität der Wildtypen und der untere die der Mutanten dar. Bei der Begutachtung der Rohdaten gab es weder in der Dauer einer Aktivitätsphase noch in der Häufigkeit des Auftretens oder der Instantanfrequenz offensichtliche Unterschiede.

Bei allen Versuchstiergruppen war eine basale Instantanfrequenz von circa 10 Hz mit Spitzen bis zu 75 Hz zu sehen. Dazwischen waren alle Frequenzbereiche mehr oder weniger ausgeprägt vertreten. Die Bursts wurden daraufhin, wie unter 3.4.1 beschrieben, weitergehend untersucht und die Mittelwerte mit Standardabweichung als Säulendiagramme in Abbildung 4.7 dargestellt.

Die Dauer einer Aktivitätsphase des Nervensystems betrug im Mittel $17,3 \pm 5,57$ s (Canton S), $13,17 \pm 4,63$ s (UAS-EKO) und $13,46 \pm 4,12$ s (EKO-222). Innerhalb dieser Aktivitätsphasen wurde die mittlere Frequenz der Muskelpotentiale bestimmt, was sich für die einzelnen Versuchstiergruppen folgendermaßen darstellte: Die Versuchstiergruppe vom Stamm Canton S wies eine Frequenz von $13,72 \pm 3,62$ Hz auf. Bei den Tieren des Stamms UAS-EKO wurden $16,15 \pm 4,69$ Hz gemessen. Die Mutanten (EKO-222) wiesen eine mittlere Aktivierungsfrequenz von $16,63 \pm 2,82$ Hz auf. Das Signifikanzniveau ($P=0,05$) war sowohl bei der Dauer ($P=0,125$) als auch der Frequenz ($P=0,189$) der Aktivierung deutlich überschritten worden und somit kein Unterschied feststellbar.

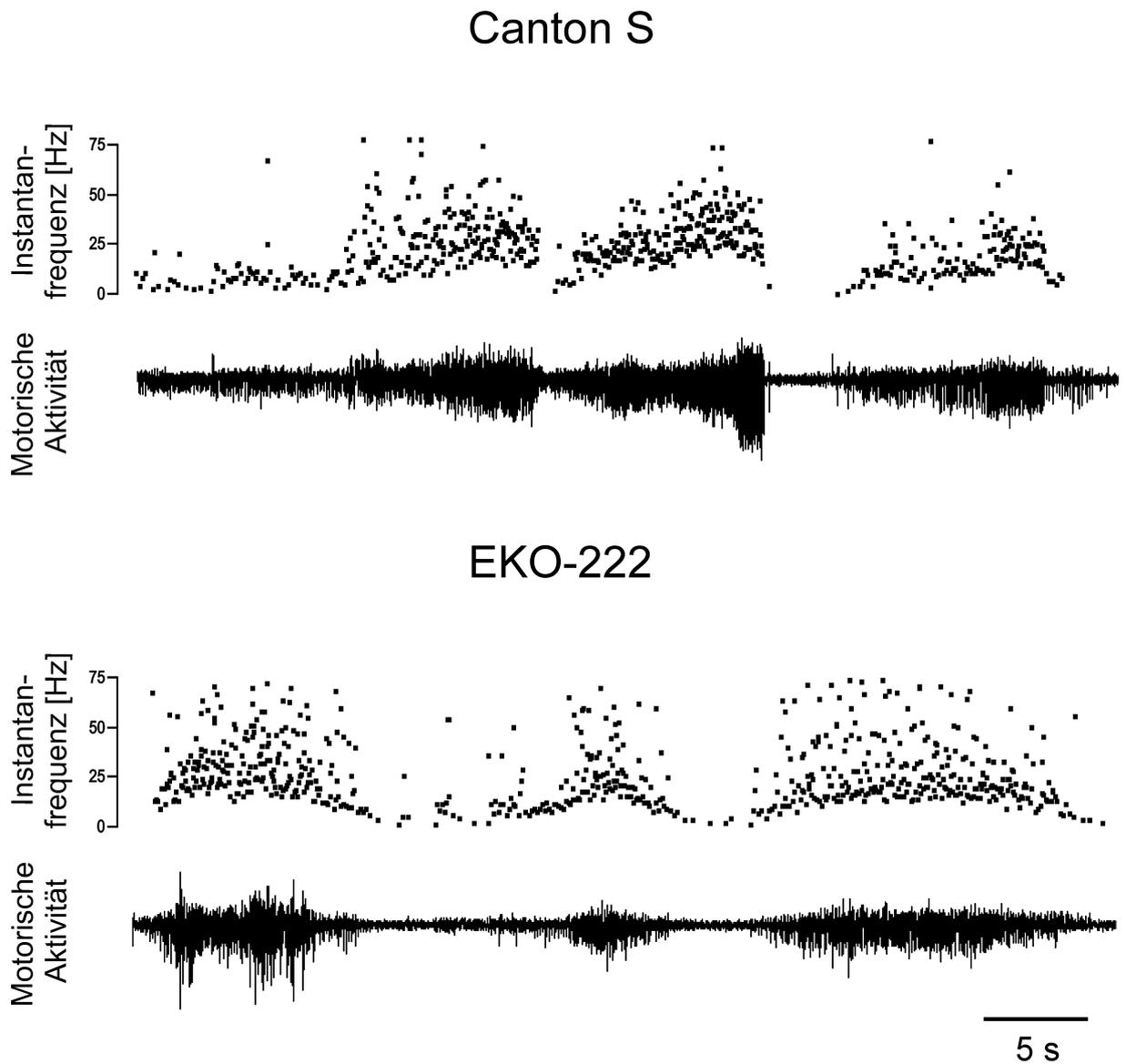


Abbildung 4.6: Originaldaten; Vergleichende Darstellung von Aktivitätsphasen bei Ableitung von der Muskeleoberfläche während der spontanaktiven, autonomen motorischen Aktivierung bei den Versuchstiergruppen Canton S und EKO-222. Jeweils oben ist die Instantanfrequenz in Hertz der darunter gezeigten Aufnahme dargestellt; Maßstab: 5s

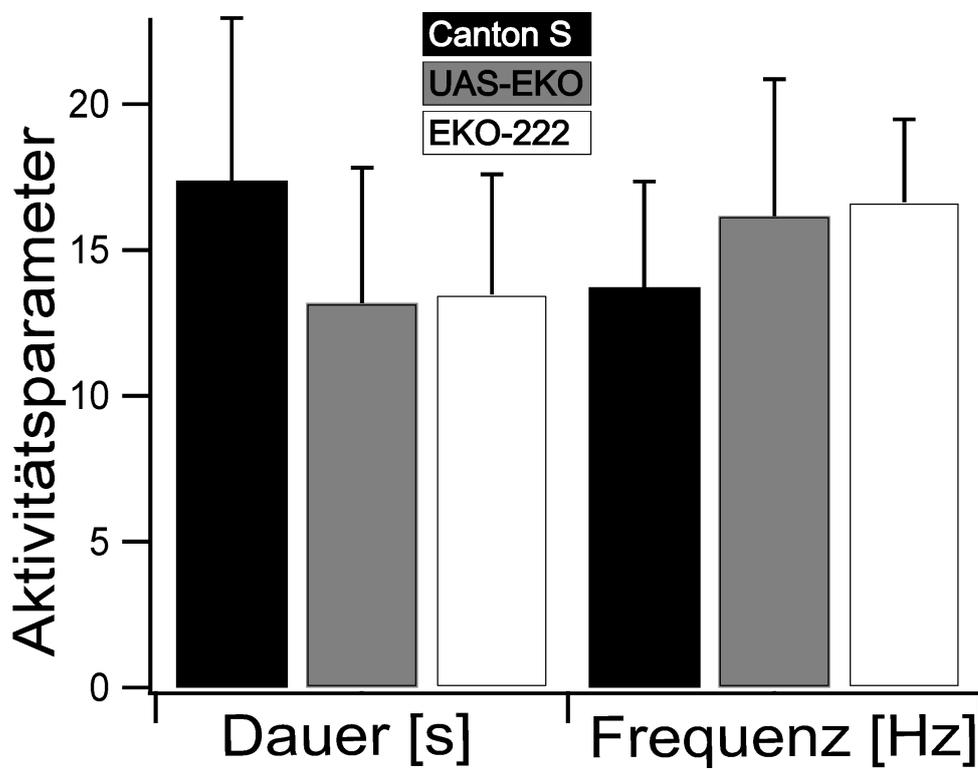


Abbildung 4.7: Dauer und Frequenz innerhalb einer Aktivitätsphase bei den Versuchstiergruppen Canton S, UAS EKO und EKO 222; Mittelwerte mit Standardabweichung; n=10

4.2.3 Charakterisierung der Ionenströme

Damit festgestellt werden konnte, ob eine Kompensation durch eine Veränderung der ionalen Leitfähigkeiten der Muskelfaser vorlag, wurden diese mittels der Zweielektroden-Spannungsklemme, einer Technik zur Messung von transmembranen Ionenströmen, genauer untersucht. Dabei wurden, aufgrund der in Abschnitt 3.4.3 angeführten Gründe, Bariumströme durch Kalziumionenkanäle untersucht. Ein in der Literatur beschriebener genereller "Rundown" der Amplitude, der gemessenen Kalziumströme, war nicht zu verzeichnen. Allerdings konnte dieser Rundown beobachtet werden, wenn eine Muskelfaser über längere Zeit in der Spannungsklemme gehalten, und in einem 5-Minuten-Intervall gemessen wurde. Dieser Sachverhalt wird in Abbildung 4.8 dargestellt.

Bereits in den Rohdaten (Abbildung 4.9) deutete sich an, dass der Barium- beziehungsweise Kalziumstrom bei den EKO-Mutanten (rot) deutlich größer war als beim Wildtyp (schwarz) war. Endgültige Unterschiede zeigten jedoch erst die auf die Muskelfaserkapazität bezogenen Ergebnisse (Stromdichte), welche grafisch der Abbildung 4.10 und in Textform der Tabelle 4.1 entnommen werden können.

Wie die grafische Darstellung der Stromdichten als Mittelwerte mit Standardfehler deutlich zeigt, unterschieden sich die Einzelergebnisse der Canton S- und der UAS-EKO-Gruppen nicht. Dagegen hoben sich die Ergebnisse der EKO-222-Versuchstiere davon ab. Bis zu einem Membranpotential von -30 mV sind bei keinem Exemplar der Versuchstiergruppen, Kalziumströme ausgelöst worden. Erst ab -20 mV waren dagegen bei allen Gruppen dementsprechende Ströme zu beobachten. Sowohl die Tiere der Canton S-Gruppe als auch die UAS-EKOs wiesen ein maximale Amplitude der Stromdichte bei 0 mV auf, wobei dies bei den letztgenannten Tieren noch deutlicher zutage trat. Die EKO-222-Tiere hingegen zeigten dieses Maximum schon bei -10 mV. Auch die Amplitude bei -20 mV war deutlich höher als bei den Kontrollen. Bei +10 und +20 mV Membranpotential nahm die Amplitude des Kalziumstroms bei allen Gruppen wieder ab. Um die Ergebnisse aus Tabelle 4.1 übersichtlicher darzustellen, wurden die Werte der Kontrollgruppe UAS-EKO und der mutierten EKO-222 in Relation zu den Messwerten der Canton S-Tiere gesetzt. Diese wurden, ausgehend vom Niveau der Canton S, als positive beziehungs-

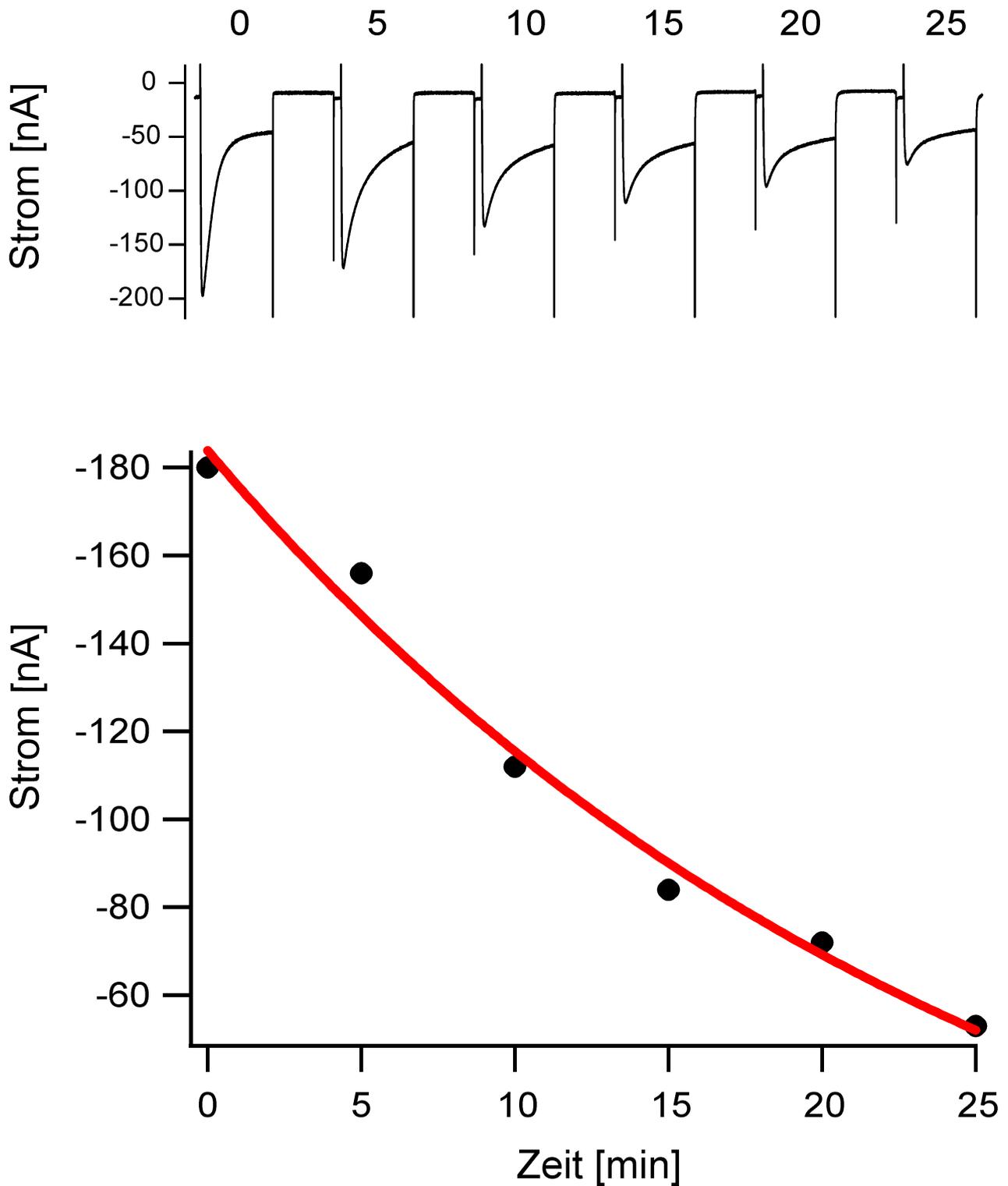


Abbildung 4.8: **oben:** Originaldaten; Vergleichende Darstellung des gleichen Kalziumstromes der im 5-Minuten-Intervall in einer Muskelfaser gemessen wurde; **unten:** Ermittelte Maximalamplituden der oben dargestellten Ströme und Annäherung durch ein exponentielles Regressionsmodell

weise negative Werte in einem Säulendiagramm dargestellt. Die grauen Balken entsprechen den Werten der UAS-EKOs, und die weißen Balken denen der EKO-222. Man kann erkennen, dass die, dem Wildtyp entsprechenden UAS-EKOs, keine wesentlichen Unterschiede zum Canton S Niveau aufwiesen. Die EKO-222-Werte lagen jedoch alle deutlich über diesem Level. Bei einem Membranpotenzial von -20 mV lag die Maximalamplitude des Kalziumstromes bei den EKO-222-Tieren im Mittel 150% höher als bei den wildtypischen Gruppen. Im weiteren Verlauf lagen die Werte bei den mutierten Tieren noch um ca. 30% höher. Eine statistisch haltbare Signifikanz zeigte sich nur zwischen den Werten der EKO-222- und der UAS-EKO-Gruppe bei den Spannungssprüngen auf -20 mV ($P=0,014$) und -10 mV ($P=0,002$).

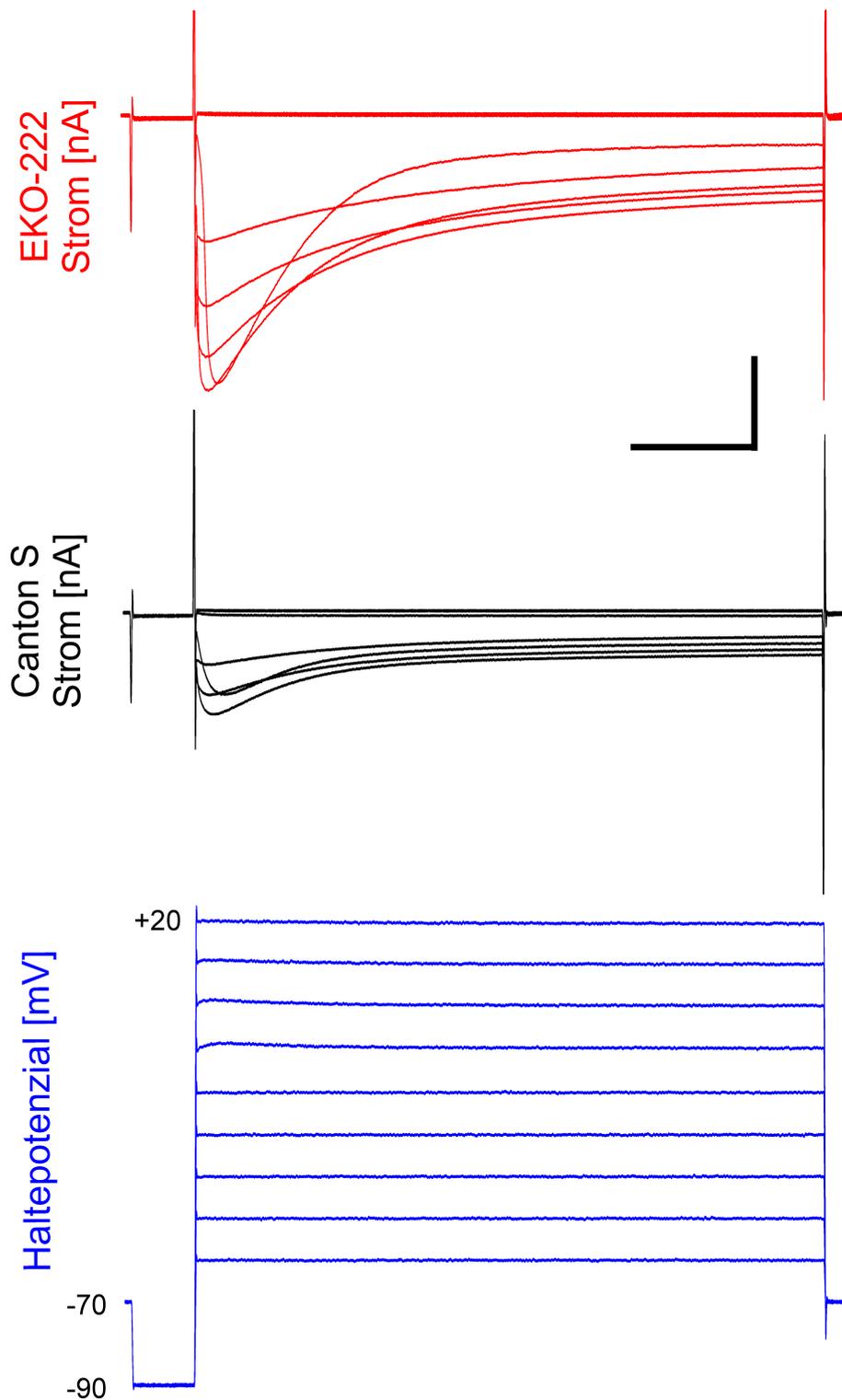


Abbildung 4.9: Originaldaten; **oben und Mitte:** Vergleichende Darstellung von gemessenen Kalziumströmen bei den Versuchstiergruppen Canton S (Mitte) und EKO-222 (oben);
unten: Spannungsprotokoll zur Messung von transmembranen Kalziumströmen
 Maßstäbe: senkrecht: 10 nA, 20 mV; waagrecht: 100 ms

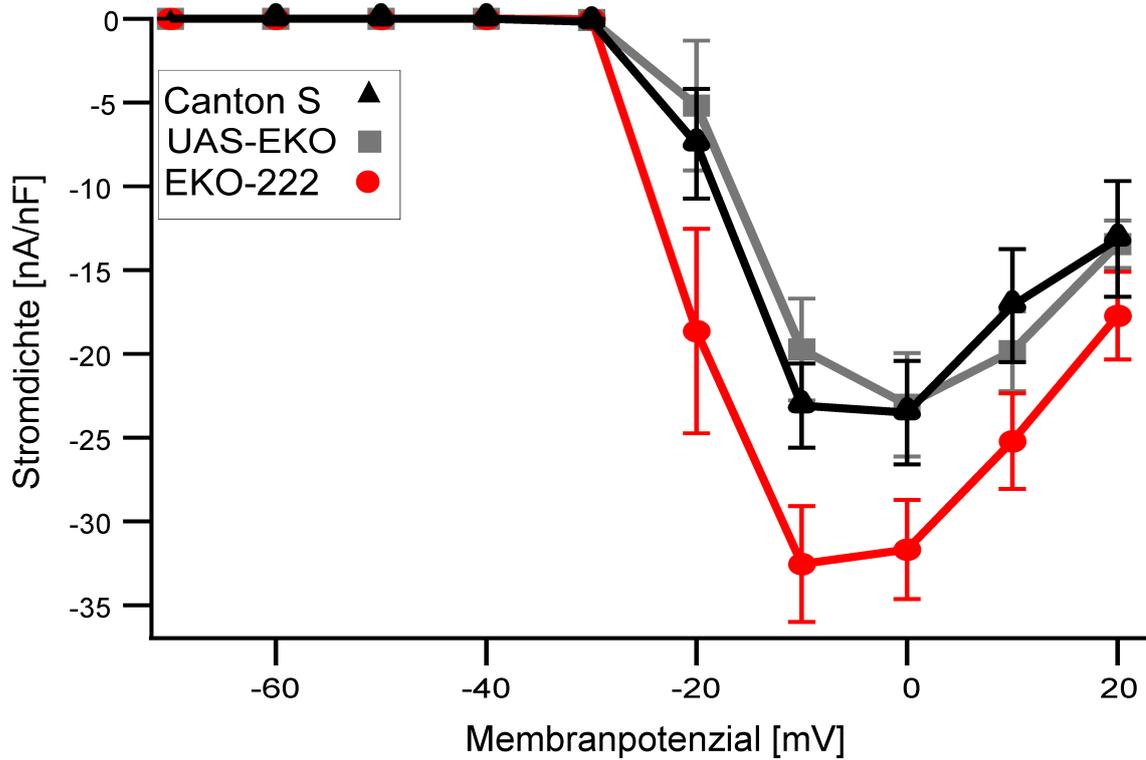


Abbildung 4.10: Die Maximalamplitude des gemessenen Kalziumstromes als Stromdichte bei verschiedenen Membranpotenzialen für die drei Versuchstiergruppen Canton S (schwarze Dreiecke; n=8), UAS-EKO (graue Vierecke; n=8) und EKO-222 (rote Kreise; n=9); Mittelwerte mit Standardfehler

Tabelle 4.1: Mittelwerte und Standardfehler aus der Messung der Gesamtkalziumströme. Die Werte sind auf die Faserkapazität bezogen.

Membranpotenzial	Versuchstiergruppe		
	Canton S	UAS-EKO	EKO-222
	Alle Werte in nF/nA		
-70	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0
-60	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0
-50	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0
-40	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0
-30	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0
-20	-7,47 ± 3,27	-5,17 ± 3,87	-18,64 ± 6,10
-10	-23,09 ± 2,52	-19,73 ± 3,03	-32,53 ± 3,46
0	-23,50 ± 3,09	-23,02 ± 3,08	-31,66 ± 2,96
10	-17,13 ± 3,37	-19,84 ± 2,38	-25,22 ± 2,84
20	-13,13 ± 3,46	-13,45 ± 1,40	-17,73 ± 2,61

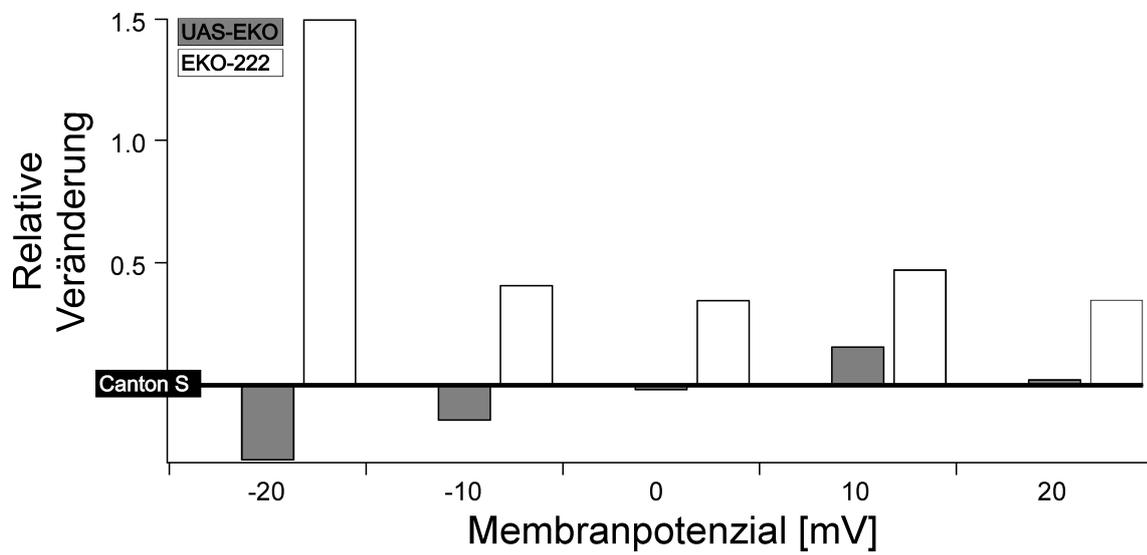


Abbildung 4.11: Relative Veränderung der Maximalamplitude der Kalziumströme bei den Versuchstiergruppen UAS EKO und EKO 222 in Relation zur Gruppe Canton S

4.3 Molekularbiologie

Da die, aus der Messung der Kalziumströme erhaltenen Ergebnisse, eine Steigerung der Maximalamplitude zeigten, hätte sich dies auch in einer gesteigerten Expressionsrate der betreffenden Ionenkanäle widerspiegeln müssen. Daher, und, um die in den elektrophysiologischen Experimenten gewonnenen Ergebnisse zu untermauern, wurden Expressionsanalysen von α - beziehungsweise β -Untereinheiten von spannungsabhängigen Kalziumkanälen mittels der semiquantitativen RT-PCR gemacht. Dazu mussten jedoch die einzelnen Reaktionsbedingungen ausgetestet und optimiert werden.

4.3.1 Probenaufbereitung

Bei der Probenaufbereitung hat sich gezeigt, dass die Präparation von Larven zur Gewinnung einzelner Gewebeteile nicht so durchgeführt werden konnte, dass die, im weiteren Verlauf erhaltene, RNA zur Quantifizierung geeignet gewesen wäre. Daher wurden für die Versuche ganze Larven eingesetzt.

4.3.2 Polymerase Kettenreaktion

Die Optimierung der PCR-Parameter beschränkte sich hauptsächlich auf die Optimierung der Annealing-Temperatur der Primer. Eine für alle Amplifikate gleichermaßen geeignete Temperatur ergab sich mit 55° C. Die hierbei erhaltenen Amplifikate waren hinsichtlich ihrer Menge und Spezifität mehr als ausreichend.

4.3.2.1 Zyklenoptimierung

Da die Wachstumsrate der Vermehrungsreaktion, die (theoretisch) exponentiell ist, gegen Ende des Experiments abnimmt und in eine Sättigung übergeht, muss die PCR noch während des exponentiellen Wachstums unterbrochen werden. Dazu wurde eine Optimierung der Zyklenzahl durchgeführt, bei der die Amplifikation schon stark genug zum Nachweis, aber noch nicht in die Sättigung übergegangen war. Das Ergebnis, welches in Abbildung 4.13 dargestellt ist,

zeigte, dass nach 36 durchlaufenen Zyklen kein Zuwachs an PCR-Produkt mehr stattfand. Bis zu 34 Zyklen war das Produkt noch sehr nahe an der Nachweisweisgrenze, und nicht zur Quantifizierung geeignet (siehe auch Abbildung 4.12). Daher wurde für die Durchführung der weiteren PCRs eine Zyklenzahl von 35 gewählt.

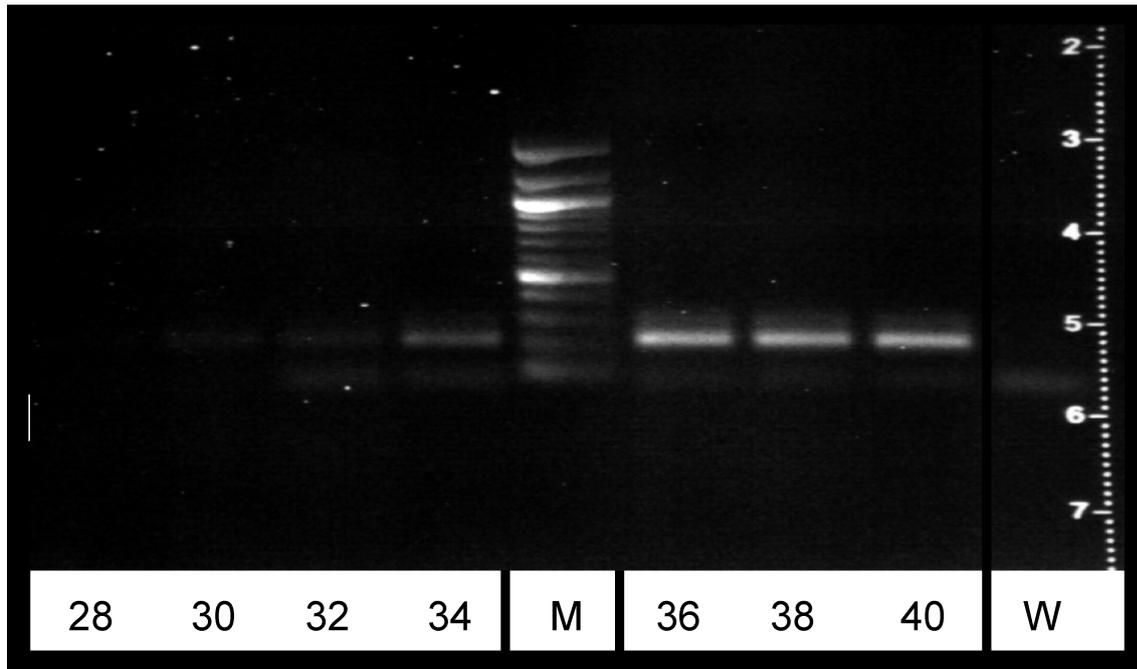


Abbildung 4.12: Trennung der PCR-Amplifikate von rp49 nach unterschiedlicher Zyklenzahl
28-40: Zahl durchlaufener Zyklen
M: 100bp Marker
W: Wasserprobe

4.3.3 Bestimmung der Expressionsrate

Bei der Bestimmung der Expressionsrate wurden PCRs mit dem Ziel gemacht, die Menge an Amplifikat zu bestimmen, um darüber auf die Expressionsrate verschiedener Kalziumkanal-untereinheiten zu schließen. Um eine Quantifizierung bei unterschiedlichem Ausgangsmaterial vornehmen zu können, musste stets auch ein interner Standard, der das Maß für den RNA-Gehalt der Probe war, amplifiziert werden (siehe Abbildung 4.14 und 4.16). Durch Relation der PCR-Produktmenge des Zielgens zu dem Produkt des sogenannten "Housekeeping-Gens" ergab sich ein von der Menge an Ausgangsmaterial unabhängiges Verhältnis, das die Expres-

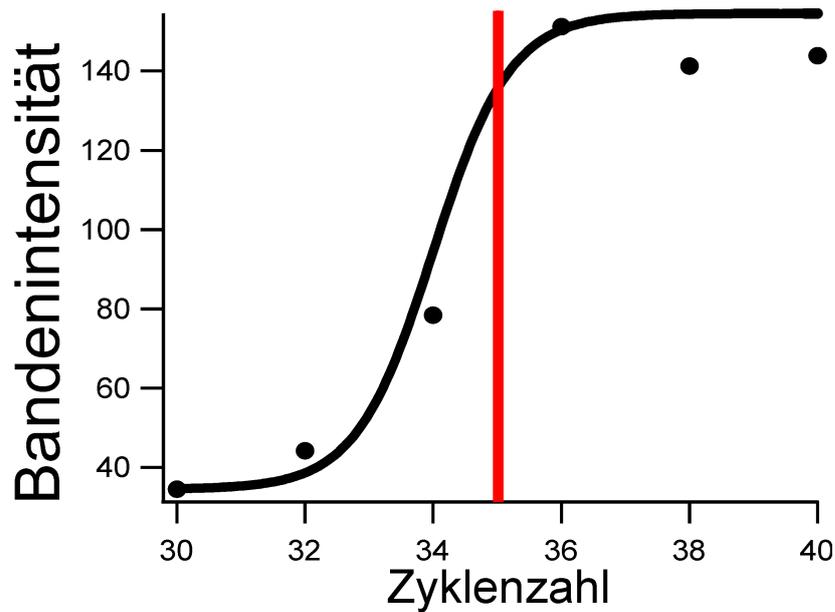


Abbildung 4.13: Darstellung der Produktmenge pro Zyklus anhand der Leuchtintensität der Banden aus der Zyklenoptimierung

sionsrate des zu untersuchenden Gens widerspiegelte (Semiquantifizierung).

Zunächst wurden die Expressionsraten der α -Untereinheiten von T- und L-Typ-Kalziumkanälen untersucht. Wie in der Abbildung 4.14 zu sehen ist, war in den mit T bezeichneten Spuren jeweils ein Produkt mit der Größe 450 bp zu finden. In den mit L markierten Spuren wiesen die Banden eine Länge von ca. 550 auf. Das Housekeeping-Gen rp49, in den mit R gekennzeichneten Bahnen wurde mit einer Größe von etwa 230 bp als positiv identifiziert. Der Marker (Spur M) war ein 1kB Marker, dessen einzelne Banden im Abstand von ca. 100 bp liegen. Die 500 bp-Bande fällt durch eine stärkere Leuchtintensität auf, was vor allem die schnelle Orientierung erleichterte. Eine Verunreinigung des Ausgangsmaterials mit genomischer DNA konnte ausgeschlossen werden, da dies aufgrund der Wahl der Primer zu Doppelbanden geführt hätte. Die Expressionsrate der wildtypischen Canton S wurde mit 1 gleichgesetzt und die Rate der anderen darauf bezogen. Die Auswertung der Expressionsrate und die statistische Überprüfung brachte folgendes hervor: Lediglich beim Vergleich der Transkriptmenge von UAS-EKO und EKO-222 der T-Typ-Kalziumkanäle, unterschritt der statistische Test das Signifikanzniveau mit einem P von 0,011. Alle anderen Vergleiche brachten keine signifikanten Unterschiede hervor.

Nach dem gleichen Prinzip wurden nun die β -Untereinheiten der Kalziumkanäle untersucht.

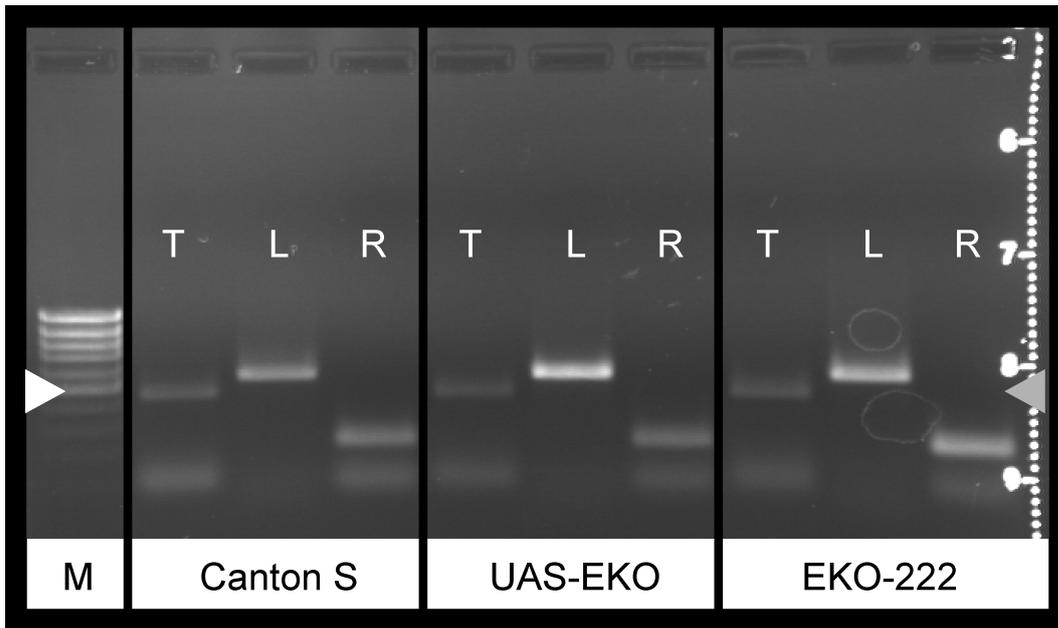


Abbildung 4.14: Auftrennung der PCR Amplifikate in einem Agarosegel und Färbung durch Ethidiumbromid;
M: 100bp Marker
Canton S; UAS-EKO; EKO-222: T: α -Untereinheit des T-Typ Kalziumkanals; L: α -Untereinheit des L-Typ Kalziumkanals; R: Housekeeping-Gen rp49; Pfeilspitzen bei 500 bp

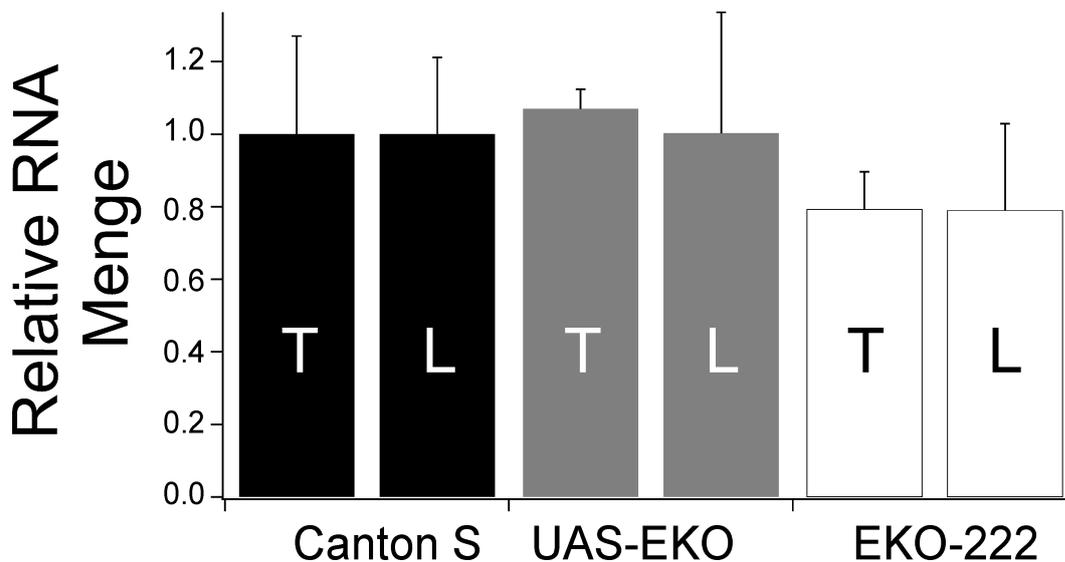


Abbildung 4.15: Graphische Darstellung von Mittelwerten und Standardfehlern aus der Bestimmung der Expressionsrate von Kalziumkanal - α -Untereinheiten (T- und L-Typ) für die Gruppen Canton S, UAS-EKO und EKO-222; n=5, N=15

Die Bande des Housekeeping-Gens (rp49; R) entsprach ihrer erwarteten Größe. Für die β -Untereinheiten ergab das Amplifikat eine Größe von ungefähr 320 bp, was ebenfalls den Erwartungen entsprach. Die Auswertung dieser Experimente ergab, dass sich die Expressionsrate bei den Tieren der EKO-222 Gruppe (statistisch signifikant $P=0,002$) um 30% erhöht hatte. Dies kann auch der Abbildung 4.17 entnommen werden. Zusammenfassend sind die Ergebnisse der Expressionsanalysen in Tabelle 4.2 dargestellt.

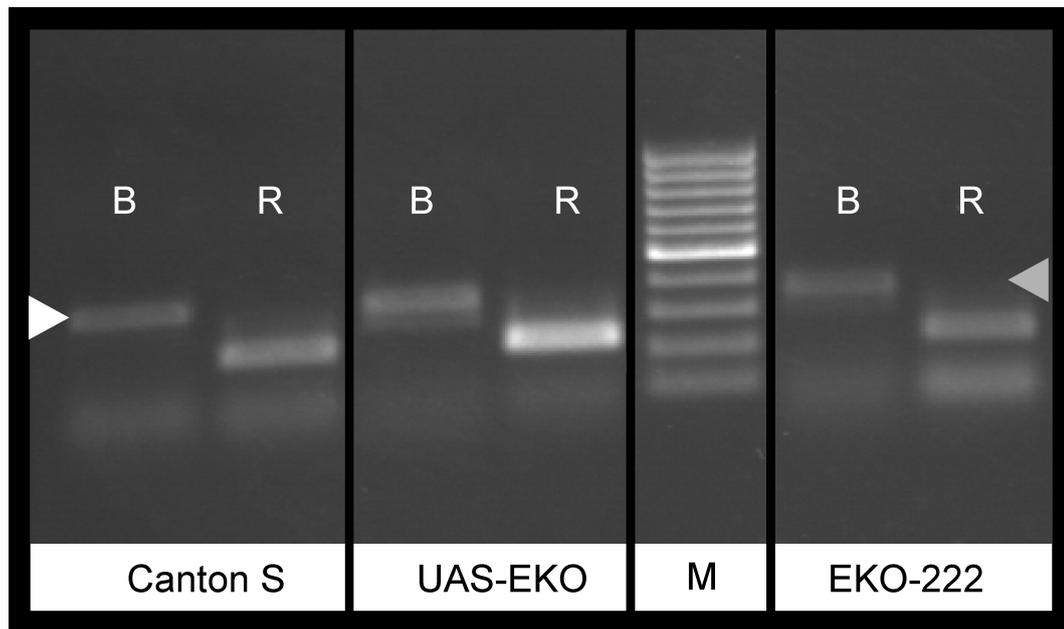


Abbildung 4.16: Auftrennung der PCR-Amplifikate in einem Agarosegel und Färbung durch Ethidiumbromid;

M: 100bp Marker

Canton S; UAS-EKO; EKO-222: B: β -Untereinheit der L-TypKalziumkanäle; R: Housekeeping-Gen rp49; Pfeilspitzen bei 500 bp

Tabelle 4.2: Zusammenfassung von Mittelwerten und Standardfehlern aus der Bestimmung der Expressionsanalysen. Die Werte sind dimensionslos.

Untersuchtes Gen	Versuchstiergruppe		
	Canton S	UAS-EKO	EKO-222
T-Typ	$1 \pm 0,27$	$1,06 \pm 0,05$	$0,79 \pm 0,10$
L-Typ	$1 \pm 0,21$	$1,01 \pm 0,33$	$0,78 \pm 0,23$
Beta	$1 \pm 0,10$	$1,01 \pm 0,11$	$1,31 \pm 0,15$

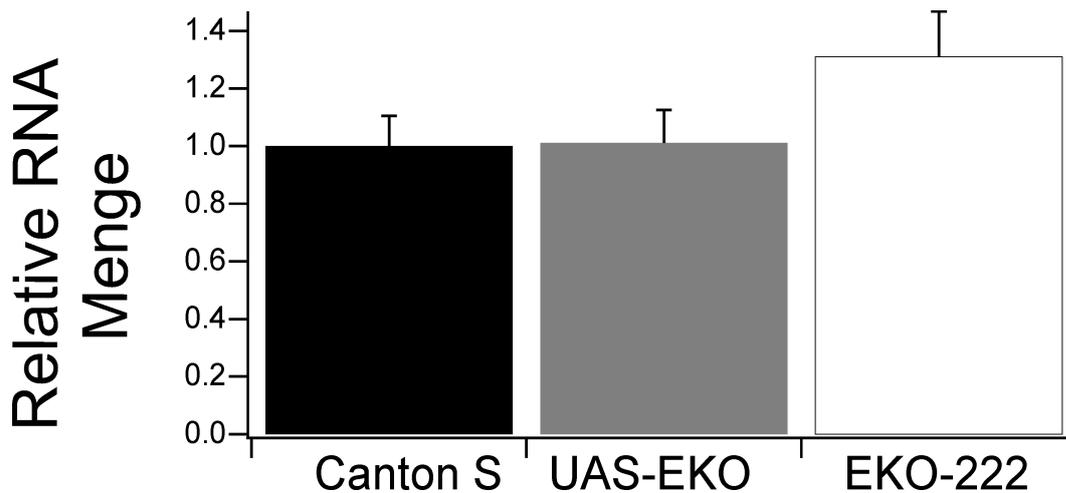


Abbildung 4.17: Graphische Darstellung von Mittelwerten und Standardfehlern aus der Bestimmung der Expressionsrate von Kalziumkanal - β -Untereinheiten für die Gruppen Canton S, UAS-EKO und EKO-222; n=5, N=15

4.3.4 Sequenzierung und Datenbankabgleich

Um zu überprüfen, ob die erhaltenen PCR-Produkte tatsächlich die gewünschten Bereiche des zu untersuchenden Gens waren, wurden diese zur Firma MWG Biotech geschickt um dort deren Basenabfolge analysieren zu lassen. Die Sequenzierungen wurden mit jeweils zwei voneinander unabhängigen Proben durchgeführt, obwohl nachfolgend nur das Ergebnis von je einer Probe gezeigt wird. Der Abgleich mit der Internetdatenbank FlyBase BLAST (www.flybase.org) zeigte in allen Fällen eine nahezu 100%ige Übereinstimmung der Ergebnisse mit der Datenbanksequenz. In den Abbildungen 4.18 - 4.21 sind die DNA-Sequenzen der entsprechenden Gene mit denen der Primer und der Sequenzierungsergebnisse aneinander ausgerichtet ("aligned") worden. Durch farbige Markierung treten hierauf Bereiche mit Übereinstimmung in allen drei Sequenzen (blau) oder keiner (rot) farblich hervor. Gleichzeitig konnte so gezeigt werden, dass im Sequenzierungsprodukt im Gegensatz zu der genomischen DNA Sequenz Lücken auftraten. Eine Ausnahme bildet hier das Ergebnis aus Abbildung 4.21: Da hier direkt ein PCR-Produkt zur Sequenzierung benutzt wurde, traten Bereiche auf die nicht sequenziert wurden. Eine weitere Erläuterung dieses Umstandes folgt in der Diskussion dieser Ergebnisse. Die Länge der Sequenzierungsprodukte entsprach den auf den Agarosegelen festgestellten Größen und somit den Erwartungen. Lediglich für die Ergebnisse aus der Sequenzierung des PCR-Produkts der β -Untereinheit trifft dies wegen der Unterschiedlichkeit der Art, der zur Sequenzierung

geschickten Probe nicht zu.

Ca_alpha_1d genomische DNA	CGAGTTATGC	GACTCGTCAA	GCTTCTCAGC	AAAGGCGAAG	GCATTCGAAC	ATTACTGTGG	20	40	60
Sequenzierungsergebnis	CGAGTTATGC	GACTCGTCAA	GCTTCTCAGC	AAAGGCGAAG	GCATTCGAAC	ATTACTGTGG	60		60
Ca_alpha_1d Sinn- Primer	CGAGTTATGC	GACTCGTCAA	-----	-----	-----	-----	20		
Ca_alpha_1D Gegensinn-Primer	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-		-
Ca_alpha_1d genomische DNA	ACTTTTATCA	AATCCTTCCA	GGCACTGCC	TACGTAGCC	TGCTAATTGT	GCTTCTATTT	80	100	120
Sequenzierungsergebnis	ACTTTTATCA	AATCCTTCCA	GGCACTGCC	TACGTAGCC	TGCTAATTGT	GCTTCTATTT	120		120
Ca_alpha_1d Sinn- Primer	-----	-----	-----	-----	-----	-----	20		
Ca_alpha_1D Gegensinn-Primer	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-		-
Ca_alpha_1d genomische DNA	TTCATTTATG	CGTTGTGGG	GATGCAAgt	tgcttatgt	tttaacattt	ttgtagagat	140	160	180
Sequenzierungsergebnis	TTCATTTATG	CGTTGTGGG	GATGCAAGT	-----	-----	-----	149		180
Ca_alpha_1d Sinn- Primer	-----	-----	-----	-----	-----	-----	20		
Ca_alpha_1D Gegensinn-Primer	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-		-
Ca_alpha_1d genomische DNA	accaatata	aactgtatat	ttgcagG	TGT	TCGGCAAAAT	TGCTCTAGAT	200	220	240
Sequenzierungsergebnis	-----	-----	-----	-GT	TCGGCAAAAT	TGCTCTAGAT	181		240
Ca_alpha_1d Sinn- Primer	-----	-----	-----	-----	-----	-----	20		
Ca_alpha_1D Gegensinn-Primer	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-		-
Ca_alpha_1d genomische DNA	CCATCACGGC	CAATAACAAT	TTCCAACGT	TCCAGCAGGC	TGTTTTAGTA	CTCTTCCGAT	260	280	300
Sequenzierungsergebnis	CCATCACGGC	CAATAACAAT	TTCCAACGT	TCCAGCAGGC	TGTTTTAGTA	CTCTTCCGAT	241		300
Ca_alpha_1d Sinn- Primer	-----	-----	-----	-----	-----	-----	20		
Ca_alpha_1D Gegensinn-Primer	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-		-
Ca_alpha_1d genomische DNA	CGGCCACCGG	AGAAGCTTGG	CAGGAAATTA	TGATGTCCTG	CTCGGCACAA	CCGGATGTGA	320	340	360
Sequenzierungsergebnis	CGGCCACCGG	AGAAGCTTGG	CAAGAAATTA	TGATGTCCTG	CTCGGCACAA	CCGGATGTGA	301		360
Ca_alpha_1d Sinn- Primer	-----	-----	-----	-----	-----	-----	20		
Ca_alpha_1D Gegensinn-Primer	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-		-
Ca_alpha_1d genomische DNA	AGTGCATAT	GAATTCAGAT	ACGCCGGGAG	AACCATGCGG	TTCTCAATA	GCCTATCCGT	380	400	420
Sequenzierungsergebnis	AGTGCATAT	GAATTCAGAT	ACGCCGGGAG	AACCATGCGG	TTCTCAATA	GCCTATCCGT	361		420
Ca_alpha_1d Sinn- Primer	-----	-----	-----	-----	-----	-----	20		
Ca_alpha_1D Gegensinn-Primer	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-		-
Ca_alpha_1d genomische DNA	ACTTTATTTT	CTTCTATGTT	CTCTGCTCGT	TTTTG	gtaag	aatgcaaac	440	460	480
Sequenzierungsergebnis	ACTTTATTTT	CTTCTATGTT	CTCTGCTCGT	TTTTG	-----	-----	396		480
Ca_alpha_1d Sinn- Primer	-----	-----	-----	-----	-----	-----	20		
Ca_alpha_1D Gegensinn-Primer	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-		-
Ca_alpha_1d genomische DNA	tatgaaatca	tattatcata	atatgtccat	ctcag	ATTAT	TAATCTTTTC	500	520	540
Sequenzierungsergebnis	-----	-----	-----	-----	ATTAT	TAATCTTTTC	421		540
Ca_alpha_1d Sinn- Primer	-----	-----	-----	-----	-----	-----	20		
Ca_alpha_1D Gegensinn-Primer	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-		-
Ca_alpha_1d genomische DNA	TTATGGACAA	CTTTGACTAT	CTGACTCGTG	ATTGGTCGAT	TTTGGGTCCC	CACCACCTGG	560	580	600
Sequenzierungsergebnis	TTATGGACAA	CTTTGACTAT	CTGACTCGTG	ATTGGTCGAT	TTTGGGTCCC	CACCACCTGG	481		600
Ca_alpha_1d Sinn- Primer	-----	-----	-----	-----	-----	-----	20		
Ca_alpha_1D Gegensinn-Primer	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-		-
Ca_alpha_1d genomische DNA	ACGAGTTTAT	TCGCCTTTGG	AGCGAATACG	ATCCGGATGC	AAAGGGACGC	ATCAAACACT	620	640	660
Sequenzierungsergebnis	ACGAGTTTAT	TCGCCTTTGG	AGCGAATACG	ATCCGGATGC	CAAGGGACGC	ATCAAACACT	541		660
Ca_alpha_1d Sinn- Primer	-----	-----	-----	-----	-----	-----	20		
Ca_alpha_1D Gegensinn-Primer	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-		CT 2
Ca_alpha_1d genomische DNA	TGGATGTGGT	CACATTGC					678		
Sequenzierungsergebnis	TGGATGTGGT	CACATTGC					559		
Ca_alpha_1d Sinn- Primer	-----	-----					20		
Ca_alpha_1D Gegensinn-Primer	TGGATGTGGT	CACATTGC					20		

Abbildung 4.18: Alignment des PCR-Produktes für L-Typ-Kalziumkanäle mit den Primern und der genomischen Datenbanksequenz.

Rot: Introns

Blau: Primer-Bindestellen

n=2

Ca_alpha_1T genomische DNA	AGCTGGATTC	GTCGCTACAT	CCGGCGATTG	GTGGAGCACACA	AGTACTTCCA	GCAGGGCATC	60	
Sequenzierungsergebnis	AGCTGGATTC	GTCGCTACAT	CCGGCGATTG	GTGGAGCACACA	AGTACTTCCA	GCAGGGCATC	60	
Ca_alpha_1T Sinn-Primer	AGCTGGATTC	GTCGCTACAT	-----	-----	-----	-----	20	
Ca_alpha_1T Gegensinn-Primer	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-	
Ca_alpha_1T genomische DNA	CTGTTGGCCA	TCCTGATTAA	CACGCTGTCC	ATGGGCATCG	AGTACCATAA	TCAGCCGCCG	120	
Sequenzierungsergebnis	CTGTTGGCCA	TCCTGATTAA	CACGCTGTCC	ATGGGCATCG	AGTACCATAA	TCAGCCGCCG	120	
Ca_alpha_1T Sinn-Primer	-----	-----	-----	-----	-----	-----	20	
Ca_alpha_1T Gegensinn-Primer	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-	
Ca_alpha_1T genomische DNA	GAATTGACCG	CCATTGTGGA	GACGAGCAAC	GTCGTCTTCT	CCGGCATCTT	TGCTGTTGAA	180	
Sequenzierungsergebnis	GAATTGACCG	CCATTGTGGA	GACGAGCAAC	GTCGTCTTCT	CCGGCATCTT	TGCTGTTGAA	180	
Ca_alpha_1T Sinn-Primer	-----	-----	-----	-----	-----	-----	20	
Ca_alpha_1T Gegensinn-Primer	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-	
Ca_alpha_1T genomische DNA	ATGTTACTAA	AGTTTGTGTC	AGAGGGTCCA	TTCCGCTACA	TTGCCAATGG	ATTCAATGTT	240	
Sequenzierungsergebnis	ATGTTACTAA	AGTTTGTGTC	AGAGGGTCCA	TTCCGCTACA	TTGCCAATGG	ATTCAATGTT	240	
Ca_alpha_1T Sinn-Primer	-----	-----	-----	-----	-----	-----	20	
Ca_alpha_1T Gegensinn-Primer	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-	
Ca_alpha_1T genomische DNA	TTCGATGGCA	TCATCGTTAT	TCTC	Aggtga	gtgaagttgc	ttaccttacc	aggtgttttag	300
Sequenzierungsergebnis	TTCGATGGCA	TCATCGTTAT	TCTC	-----	-----	-----	-----	264
Ca_alpha_1T Sinn-Primer	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	20
Ca_alpha_1T Gegensinn-Primer	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-
Ca_alpha_1T genomische DNA	cctaaagtag	aaacctacga	agcgtcgata	atccatttaa	ctttctcccc	actgtcatt	a	360
Sequenzierungsergebnis	-----	-----	-----	-----	-----	-----	A	265
Ca_alpha_1T Sinn-Primer	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	20
Ca_alpha_1T Gegensinn-Primer	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-
Ca_alpha_1T genomische DNA	gTGCCATTGA	GATCTGTACAG	ACGTTTCATGG	GCAACGGAAC	GGGTGGTGGT	GGCTCCGGAC	420	
Sequenzierungsergebnis	GTGCCATTGA	GATCTGTACAG	ACGTTTCATGG	GCAACGGAAC	GGGTGGTGGT	GGCTCCGGAC	325	
Ca_alpha_1T Sinn-Primer	-----	-----	-----	-----	-----	-----	20	
Ca_alpha_1T Gegensinn-Primer	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-	
Ca_alpha_1T genomische DNA	TGTCGGTGTT	GCGGACATTTC	CGGTTGCTGC	GAATCCTCAA	ATTGGTCCGG	TTTATGCCCA	480	
Sequenzierungsergebnis	TGTCGGTGTT	GCGGACATTTC	CGGTTGCTGC	GAATCCTCAA	ATTGGTCCGG	TTTATGCCCA	385	
Ca_alpha_1T Sinn-Primer	-----	-----	-----	-----	-----	-----	20	
Ca_alpha_1T Gegensinn-Primer	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-	
Ca_alpha_1T genomische DNA	ATCTGCGACG	CCAGCTATTC	GTGATGCTGC	GCACAATGGA	CAACGTGGCC	GTGTTCTTCT	540	
Sequenzierungsergebnis	ATCTGCGACG	CCAGCTATTC	GTGATGCTGC	GCACAATGGA	CAACGTGGCC	GTGTTCTTCT	445	
Ca_alpha_1T Sinn-Primer	-----	-----	-----	-----	-----	-----	20	
Ca_alpha_1T Gegensinn-Primer	-----	-----	-----	-----	-----	C GTGTTCTTCT	11	
Ca_alpha_1T genomische DNA	CCCTTCTCG	549						
Sequenzierungsergebnis	CCCTTCTCG	454						
Ca_alpha_1T Sinn-Primer	-----	20						
Ca_alpha_1T Gegensinn-Primer	CCCTTCTCG	20						

Abbildung 4.19: Alignment des PCR-Produktes für T-Typ Kalziumkanäle mit den Primern und der genomischen Datenbanksequenz.

Rot: Introns

Blau: Primer-Bindestellen

n=2

		20		40		60	
RP49 genomische DNA	ACGTTGTGCA	CCAGGAACTT	CTTGAATCCG	GTGGGCAGCA	TGTGGCGGGT	GCGCTTGTTT	60
Sequenzierungsergebnis	ACGTTGTGCA	CCAGGAACTT	CTTGAATCCG	GTGGGCAGCA	TGTGGCGGGT	GCGCTTGTTT	60
RP 49 Sinn-Primer	ACGTTGTGCA	CCAGGAACTT	-----	-----	-----	-----	20
RP49 Gegensinn-Primer	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
		80		100		120	
RP49 genomische DNA	GATCCGTAAC	CGATGTTGGG	CATCAGATAC	TGTCCCTTGA	AGCGGCAGCG	CACTCTGTTG	120
Sequenzierungsergebnis	GATCCGTAAC	CGATGTTGGG	CATCAGATAC	TGTCCCTTGA	AGCGGCAGCG	CACTCTGTTG	120
RP 49 Sinn-Primer	-----	-----	-----	-----	-----	-----	20
RP49 Gegensinn-Primer	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
		140		160		180	
RP49 genomische DNA	TCGATACCCT	TGGGCTTGCG	CCATTTGTGc	tgcaaggaga	catgttgatt	aaacacgggt	180
Sequenzierungsergebnis	TCGATACCCT	TGGGCTTGCG	CCATTTGTGC	-----	-----	-----	150
RP 49 Sinn-Primer	-----	-----	-----	-----	-----	-----	20
RP49 Gegensinn-Primer	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
		200		220		240	
RP49 genomische DNA	acaatttggc	acaatcctcg	ftggcactca	cGACAGCTT	AGCATATCGA	TCCGACTGGT	240
Sequenzierungsergebnis	-----	-----	-----	GACAGCTT	AGCATATCGA	TCCGACTGGT	178
RP 49 Sinn-Primer	-----	-----	-----	-----	-----	-----	20
RP49 Gegensinn-Primer	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
		260		280			
RP49 genomische DNA	GGCGGATGAA	GTGCTTGGTG	CGCTTC	TTCA	CGATCTTGGG	CCTGTA	286
Sequenzierungsergebnis	GGCGGATGAA	GTGCTTGGTG	CGCTTC	TTCA	CGATCTTGGG	CCTGTA	224
RP 49 Sinn-Primer	-----	-----	-----	-----	-----	-----	20
RP49 Gegensinn-Primer	-----	-----	-----	TTCA	CGATCTTGGG	CCTGTA	20

Abbildung 4.20: Alignment des PCR-Produktes für das Houskeeping-Gen rp49 mit den Primern und der genomischen Datenbanksequenz.

Rot: Introns

Blau: Primer-Bindestellen

n=2

Ca_beta genomische DNA	GGGTATGAAG	CCCACATCAC	AGCCCTCCTT	GACCAGCCGG	CCGATCCACC	AGTTATTGTC	60
Sequenzierungsergebnis	GGGTATGAAG	CCCACATCAC	AGCCCTCCTT	GACCAGCCGG	CCGATCCACC	AGTTATTGTC	19
Ca_beta Sinn-Primer	GGGTATGAAG	CCCACATCAC	AGCCCTCCTT	GACCAGCCGG	CCGATCCACC	AGTTATTGTC	20
Ca_beta Gegensinn-Primer	GGGTATGAAG	CCCACATCAC	AGCCCTCCTT	GACCAGCCGG	CCGATCCACC	AGTTATTGTC	20
Ca_beta genomische DNA	GTACTTCTCT	TTGATGTGCA	GGAATTCCCG	GATCTCGAAC	GAAACTGCTC	CGCCCTGCAC	120
Sequenzierungsergebnis	GTACTTCTCT	TTGATGTGCA	GGAATTCCCG	GATCTCGAAC	GAAACTGCTC	CGCCCTGCAC	79
Ca_beta Sinn-Primer	GTACTTCTCT	TTGATGTGCA	GGAATTCCCG	GATCTCGAAC	GAAACTGCTC	CGCCCTGCAC	20
Ca_beta Gegensinn-Primer	GTACTTCTCT	TTGATGTGCA	GGAATTCCCG	GATCTCGAAC	GAAACTGCTC	CGCCCTGCAC	20
Ca_beta genomische DNA	CGGCGAATCG	TCGTCGATGG	CGCCATCGTA	TGCTACGTTG	GTTGCGCACAG	CGAACGCCAC	180
Sequenzierungsergebnis	CGGCGAATCG	TCGTCGATGG	CGCCATCGTA	TGCTACGTTG	GTTGCGCACAG	CGAACGCCAC	139
Ca_beta Sinn-Primer	CGGCGAATCG	TCGTCGATGG	CGCCATCGTA	TGCTACGTTG	GTTGCGCACAG	CGAACGCCAC	20
Ca_beta Gegensinn-Primer	CGGCGAATCG	TCGTCGATGG	CGCCATCGTA	TGCTACGTTG	GTTGCGCACAG	CGAACGCCAC	20
Ca_beta genomische DNA	TGGTTTGCT	ctgaaattaca	gggtattaca	gggttggatt	tccattttta	taatgcacaa	240
Sequenzierungsergebnis	TGGTTTGCT	TGAAATTACA	GGGTATTACA	GGGTGGATT	TTCATTTTAA	GAATGAACAA	199
Ca_beta Sinn-Primer	TGGTTTGCT	TGAAATTACA	GGGTATTACA	GGGTGGATT	TTCATTTTAA	GAATGAACAA	20
Ca_beta Gegensinn-Primer	TGGTTTGCT	TGAAATTACA	GGGTATTACA	GGGTGGATT	TTCATTTTAA	GAATGAACAA	20
Ca_beta genomische DNA	cacacttac	CTCGCTTTAT	CCAACTGGCT	TAAGGCCTGA	CGTTCCTTTT	CTCGCCGAAG	300
Sequenzierungsergebnis	CACACTTACC	CTCGCTTTAT	CCAACTGGCT	TAAGGCCTGA	CGTTCCTTTT	CTCGCCGAAG	259
Ca_beta Sinn-Primer	CACACTTACC	CTCGCTTTAT	CCAACTGGCT	TAAGGCCTGA	CGTTCCTTTT	CTCGCCGAAG	20
Ca_beta Gegensinn-Primer	CACACTTACC	CTCGCTTTAT	CCAACTGGCT	TAAGGCCTGA	CGTTCCTTTT	CTCGCCGAAG	20
Ca_beta genomische DNA	CGATTCCTTT	TCCTCGTCTA	GCGACAGATC	GGATGACGGT	TGTGAGTAGT	TCGAGTCGGC	360
Sequenzierungsergebnis	CGATTCCTTT	TCCTCGTCTA	GCGACAGATC	GGATGACGGT	TGTGAGTAGT	TCGAGTCGGC	319
Ca_beta Sinn-Primer	CGATTCCTTT	TCCTCGTCTA	GCGACAGATC	GGATGACGGT	TGTGAGTAGT	TCGAGTCGGC	20
Ca_beta Gegensinn-Primer	CGATTCCTTT	TCCTCGTCTA	GCGACAGATC	GGATGACGGT	TGTGAGTAGT	TCGAGTCGGC	18
Ca_beta genomische DNA	AG	362					
Sequenzierungsergebnis	AG	321					
Ca_beta Sinn-Primer	--	20					
Ca_beta Gegensinn-Primer	AG	20					

Abbildung 4.21: Alignment des PCR-Produktes für die β -Untereinheit mit den Primern und der genomischen Datenbanksequenz.

Rot: vorhergesagter Intronbereich

Blau: Primer-Bindestelle

Grün: nicht sequenzierter Bereich

n=2

4.4 Verhaltensbiologie

4.4.1 Bewegungsanalyse

Für die Charakterisierung der Auswirkung der Expression des EKO-Genes im intakten Tier, wurden Bewegungsanalysen gemacht. Die Ergebnisse sind in den folgenden Abbildungen dargestellt (4.22-4.26). Eine beispielhafte Bewegungstrajektorie ist in Abbildung 4.22 gezeigt. Man kann erkennen, dass sich die Larve relativ zielstrebig und geradlinig bewegte. Dieses Muster trat jedoch nicht häufiger auf, als eine Art kreisförmige Bewegung. Eine Vorzugs-Bewegungsrichtung war augenscheinlich nicht ersichtlich. Ebenfalls exemplarisch wird in Abbildung 4.23 die zu dieser Trajektorie gehörende Geschwindigkeit pro Einzelbild ("frame") gezeigt.

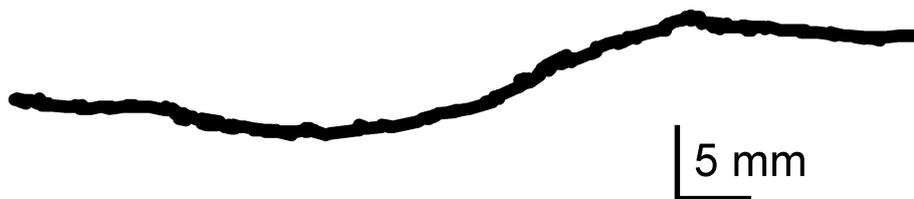


Abbildung 4.22: Originaldaten; Bewegungstrajektorie einer sich frei fortbewegenden Canton S-Larve. Maßstäbe: horizontal und vertikal: 5 mm

Der in Abbildung 4.23 dargestellte Parameter zeigt deutlich, dass die Fortbewegung nicht kontinuierlich sondern eher pulsartig war. Ebenfalls wird ersichtlich, dass es immer wieder zu mehr oder weniger kurzen Pausen kam, in denen keine Fortbewegung stattfand und auch die Geschwindigkeit dementsprechend sank. In diesem repräsentativen Beispiel einer Larve aus der Gruppe der Canton S war lag die insgesamt zurückgelegte Strecke bei 32,22 mm. Die mittlere Geschwindigkeit betrug $0,47 \pm 0,22$ mm/s. Die maximale Geschwindigkeit wurde mit 1,13 mm/s ermittelt. Im Weiteren folgen nun die gemittelten Daten und Diagramme des gesamten Experiments.

Die mittlere Distanz die die einzelnen Versuchstiergruppen zurücklegten betrug in etwa 33 mm für die wiltypische Gruppe Canton S und circa 24 mm für die beiden mutierten Gruppen (MHC-EKO und EKO-222).

Die statistische Untersuchung zeigte eine Signifikanz der Unterschiede zwischen den Canton S und den Mutanten (beide Gruppen, $P \leq 0,001$), während sich letztere nicht signifikant

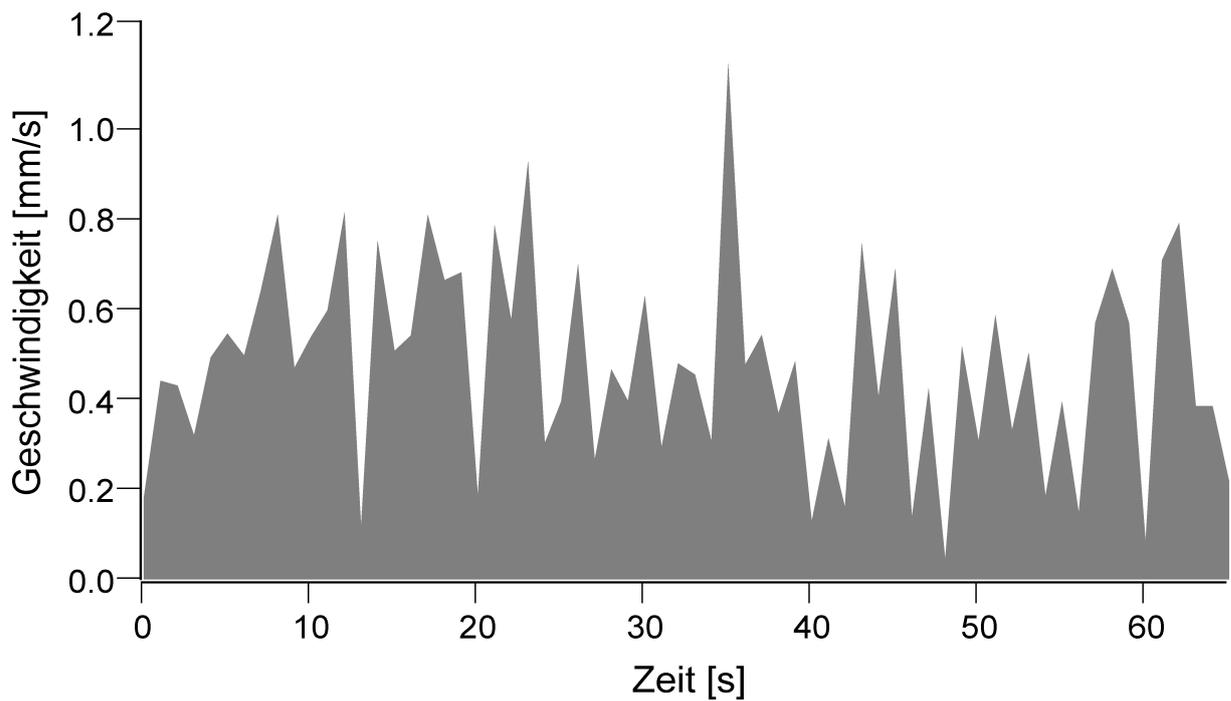


Abbildung 4.23: Darstellung des Geschwindigkeitsverlaufs während eines Experiments zur Bewegungsanalyse.

voneinander unterschieden. Ebenso verhielt sich die statistische Überprüfung der Ergebnisse aus der Bestimmung der mittleren Geschwindigkeit der drei Versuchstiergruppen ($P \leq 0,001$). Während die Wildtypen eine mittlere Geschwindigkeit von $0,49 \pm 0,09$ mm/s zeigten, waren es bei den MHC-EKOs $0,36 \pm 0,11$ und bei den EKO-222-Tieren $0,35 \pm 0,09$ (Mittelwerte \pm Standardabweichung).

Die maximale Geschwindigkeit lag bei allen Gruppen auf einem ähnlichen Niveau (Canton S: $1,177 \pm 0,430$ MHC-EKO: $1,040 \pm 0,400$ EKO 222: $0,955 \pm 0,482$) Hier war eine Signifikanz lediglich zwischen den Tieren der Canton S- und der EKO-222 Gruppe zu erkennen ($P=0,032$)

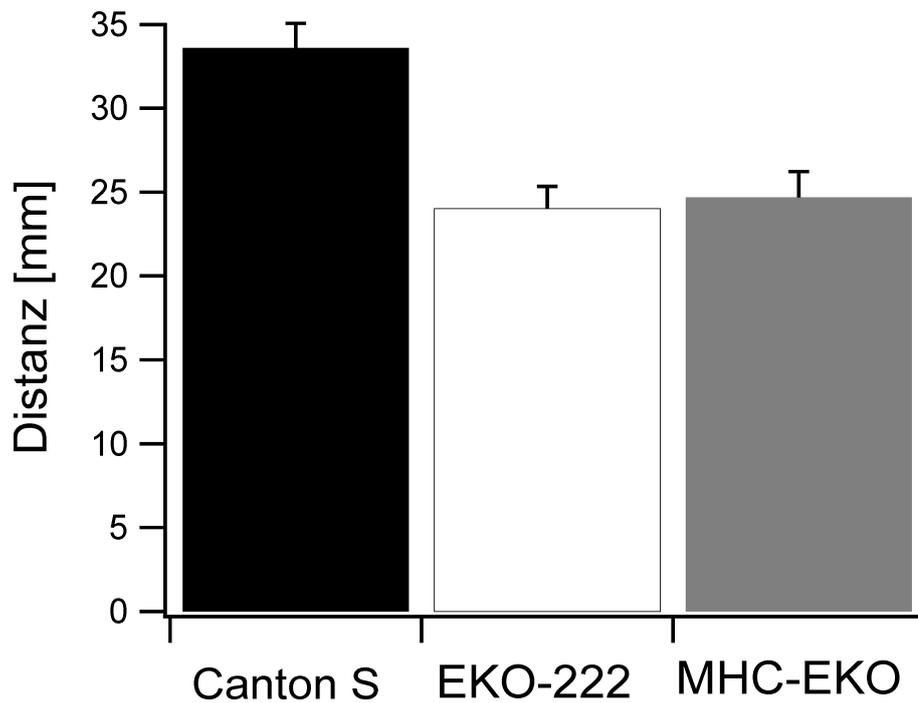


Abbildung 4.24: Gesamte, pro 60 s zurückgelegte Distanz für die Gruppen Canton S, EKO-222 und MHC-EKO; Mittelwerte mit Standardfehler; n=23 (Canton S), n=25 (EKO-222), n=22 (MHC-EKO)

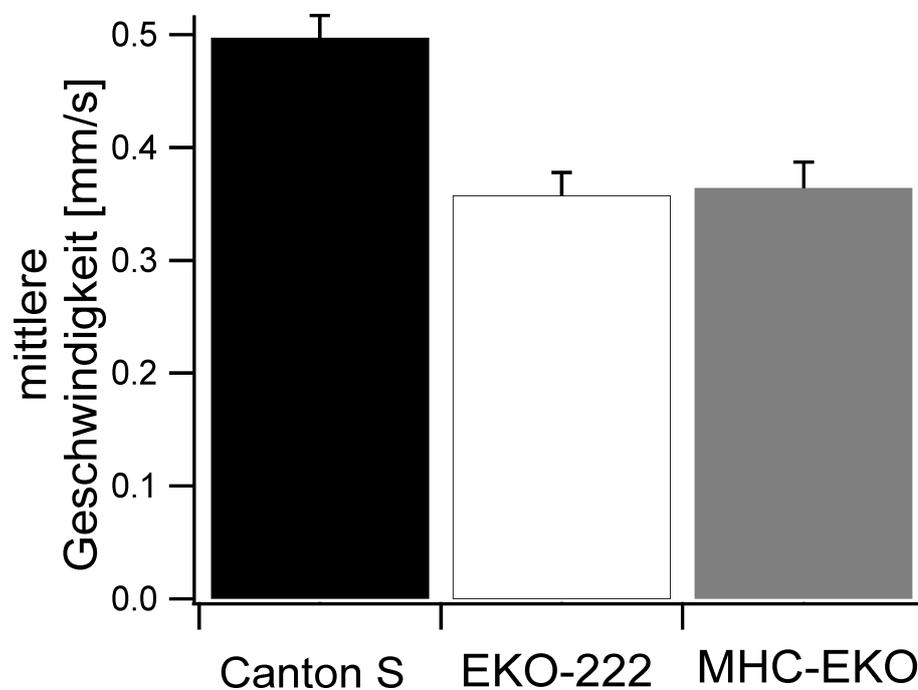


Abbildung 4.25: Mittlere Geschwindigkeit aus einem 60 s-dauernden Bewegungsexperiment für die Gruppen Canton S, EKO 222 und MHC-EKO; Mittelwerte mit Standardfehler; n=23 (Canton S), n=25 (EKO 222), n=22 (MHC-EKO)

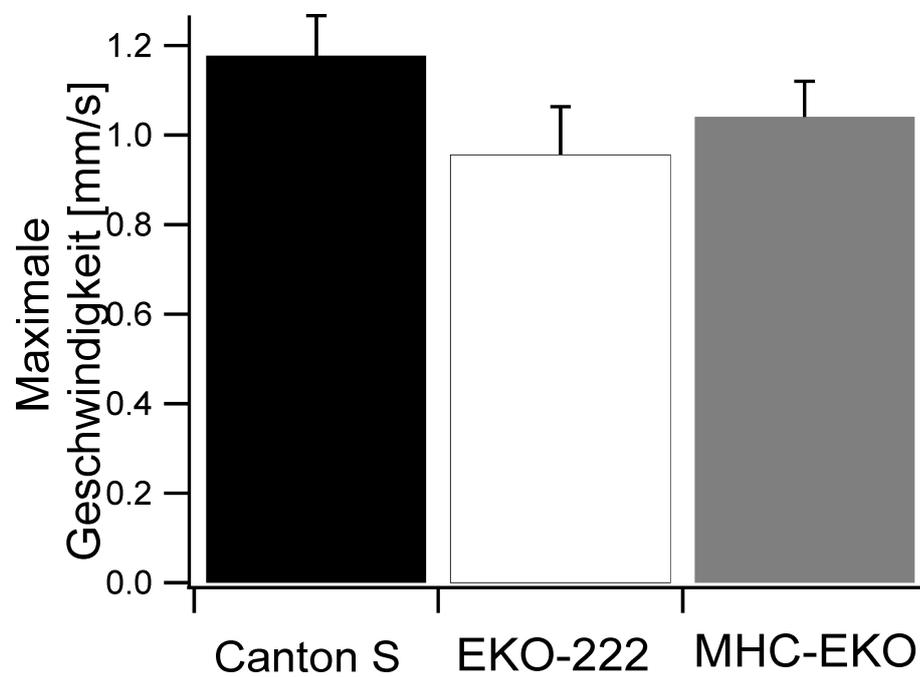


Abbildung 4.26: Mittelwerte mit Standardfehler der maximalen Geschwindigkeiten die in einem Beobachtungszeitraum von 60 s beobachtet wurden; $n=23$ (Canton S), $n=25$ (EKO-222), $n=22$ (MHC-EKO)

4.4.2 Erregungs-Kontraktionskopplung unter kontrollierten Bedingungen

Um zu untersuchen, wie groß der Effekt des EKO-Kanals auf die Erregungs-Kontraktionskopplung ist, wurden Experimente gemacht, bei denen mittels der Spannungsklemme das Membranpotential der Muskelzellen kontrolliert verändert und gleichzeitig die Kraftentwicklung durch einen Kraftmesser sichtbar gemacht wurde.

Der Verlauf eines solchen Versuchs ist in Abbildung 4.27 grafisch festgehalten worden. Nur teilweise ist hierbei der kurze Testpuls in der ersten Sekunde des Experiments zu erkennen, der benötigt wurde, um anschließend die Kapazität der gemessenen Muskelfaser zu bestimmen. Die Kraft, welche in dieser Abbildung in der oberen Spur gezeigt wird, wuchs mit der zunehmenden Membrandepolarisation und erreichte schließlich ihr Maximum bei circa +20 mV. Der Strom (unterste Spur) blieb weitestgehend stabil und zeigte nur während starker Kontraktionen kurze Einbrüche, die sich jedoch (bei allen ausgewerteten Experimenten) noch vor dem nächsten Puls wieder stabilisierten und somit die Spannung weiterhin exakt geklemmt werden konnte.



Abbildung 4.27: Komplexe Darstellung eines Experiments

oben: Kraftentwicklung in Muskel 6 während eines Experiments; Maßstab: 20 μN

mitte: Tatsächliches Membranpotential in Muskel 6 während der Spannungsklemme; Maßstab: 20 mV

unten: Während eines Experiments injizierter Strom, zum Erreichen des vorgegebenen Potentials; Maßstab: 20 nA

Maßstab: Horizontal 2s

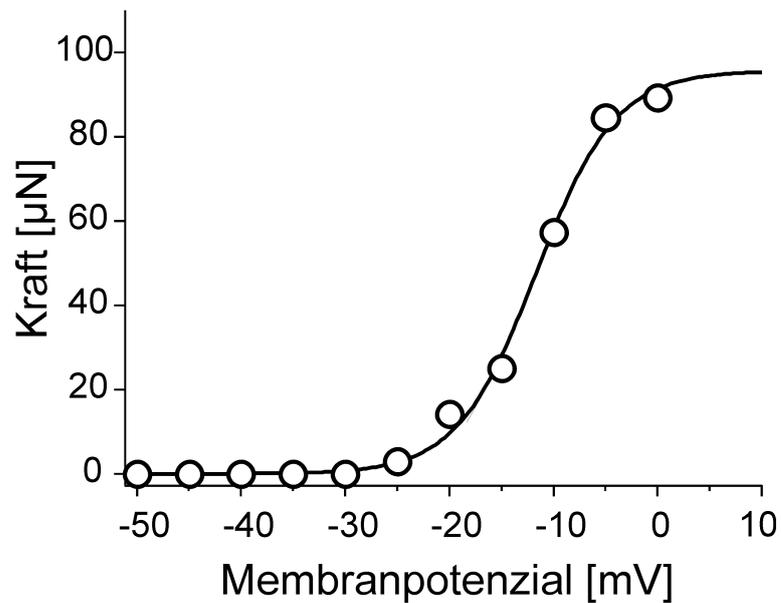


Abbildung 4.28: Einzelmessung der Kraftentwicklung in Muskel 6 unter den kontrollierten Bedingungen der Spannungsklemme. Die Daten konnten mit einem sigmoiden Regressionsmodell hinreichend gut beschrieben werden.

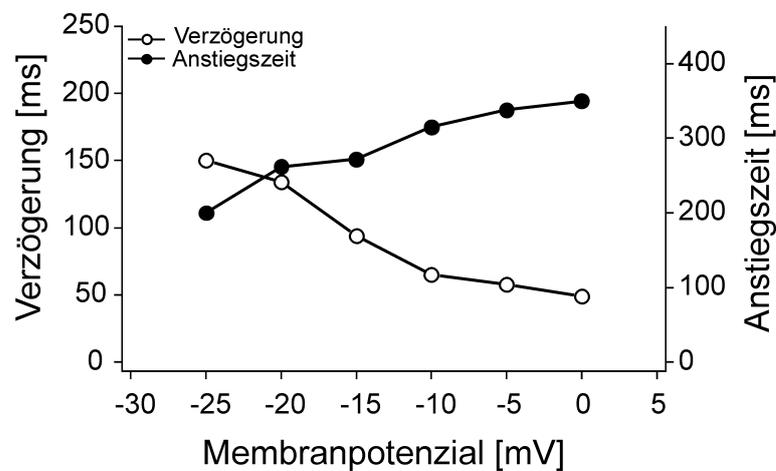


Abbildung 4.29: Daten aus einer Einzelmessung; Zeit vom Beginn des Stimulus bis zum Einsetzen der Kontraktion (**Verzögerung**) und Zeit vom Beginn der Kontraktion bis zum Maximum (**Anstiegszeit**) in Abhängigkeit vom Membranpotenzial

Die hier erstmals bei *Drosophila* angewandte Methode zeigte, dass das Membranpotenzial durch die Spannungsklemme derart verändert werden konnte, dass Kontraktionen evoziert wurden. Die Darstellung der gemessenen Kräfte schlug zudem ein sigmoides Regressionsmodell zur Beschreibung der Daten vor (siehe Abbildung 4.28). Daher konnten die Daten, um sie untereinander vergleichbar zu machen, auf den Wert der maximalen Kraft bei +20 mV

normiert werden.

Eine Untersuchung der Kontraktionsparameter zeigte ein proportionales Verhältnis der Zeit vom Beginn der Kontraktionen bis zum Maximum (**Anstiegszeit**) und ein reziprok-proportionales Verhältnis der Zeit vom Beginn des Stimulus' bis zum Beginn der Kontraktion (**Verzögerung**). Dargestellt sind diese Daten in Abbildung 4.29.

Nach der Auswertung und dem grafischen Aufbereiten der eigentlichen Experimente in Form eines Kraft-/Membranpotenzial-Diagramms zeigte sich (siehe Abbildung 4.30), dass der Verlauf der Kraftentwicklung bei den wildtypischen Larven die typische sigmoide Form aufwies. Im Bereich von circa -30 bis 0 mV nahm die Kraft näherungsweise linear mit der Membranspannung zu, während sie in den letzten Sprüngen auf einem annähernd gleichen Niveau blieb und somit für den angesprochenen Kurvenverlauf sorgte. Die Messwerte lagen alle nahe bei dem durch die sigmoide Funktion beschriebenen Regressionsmodell. Die Standardfehler der Messwerte waren zudem im Vergleich zu einigen Werten der anderen Versuchstiergruppen, relativ gering. Die Messwerte und somit auch die Kurve der mutierten MHC-EKO hingegen zeigten eine deutliche Verschiebung in positive Richtung. Alle Werte lagen unter denen der anderen beiden Gruppen. Der sigmoide Kurvenverlauf war nur zum Teil erkennbar, da es bis +20 mV noch zu einem linearen Ansteigen der Kraft kam. Die EKO-222-Tiere hingegen zeigten eine sehr deutliche Verschiebung der Kurve in negative Richtung. Wenn diese Werte auch mit einem größeren Fehler als die Werte der Canton S-Gruppe behaftet waren, lagen sie dennoch deutlich über den Werten dieser Gruppe und noch deutlicher über denen der MHC-EKOs. Auffallend war zudem noch, dass die Werte bei ca. -15 mV einen Art Einbruch zeigten, der den weiteren Kurvenverlauf auf das Niveau der Canton S-Tiere brachte. Aus den für jedes Tier durchgeführten Regressionskurven ergaben sich folgende Mittelwerte und Standardfehler für die Spannung, bei der die Kontraktion halbmaximal war ($V_{M0,5}$): Bei den Canton S-Tieren war diese Kraft bei einem Potenzial von -13,06 mV und bei den EKO-222 bei -19,39 mV erreicht. Die Tiere der MHC-EKO Gruppe hingegen erreichten diese Kraft erst bei 0,59 mV. Der Parameter, der die Steigung der Kurve widerspiegelt, war bei allen Gruppen in einem ähnlichen Bereich (Canton S: 6,53; MHC-EKO: 5,67; EKO-222: 5,27). Die statistische Überprüfung dieser Ergebnisse zeigte, dass die Steigung der Geraden sich unter den Gruppen nicht signifikant

unterschied ($P=0,265$), während sich die Werte für die $V_{M0,5}$ bei den MHC-EKO signifikant von den anderen beiden unterscheiden ließen ($P=0,002$).

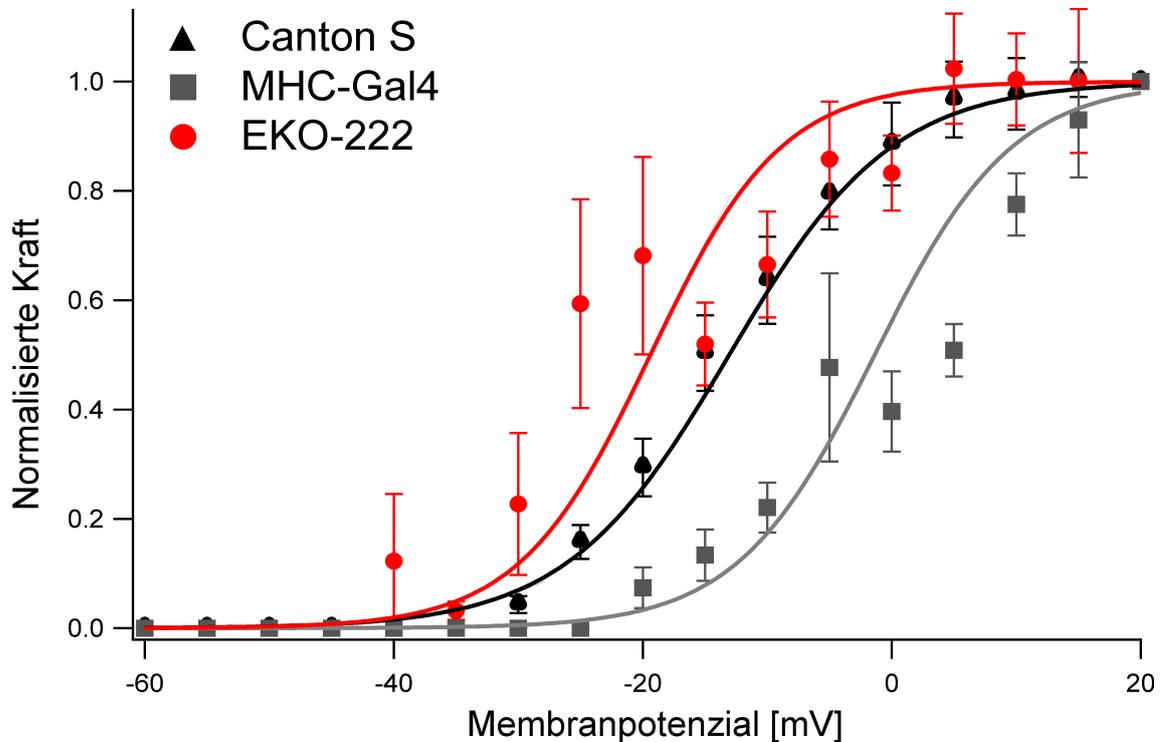


Abbildung 4.30: Mittelwerte der normierten Kraft für jeden Spannungssprung mit Standardfehler und Regressionsmodell auf sigmoider Basis.

Canton S: schwarze Dreiecke; $n=8$

MHC-EKO: graue Vierecke; $n=9$

EKO 222: rote Kreise; $n=12$

Um die Expressionsstärke der EKO-Kanäle beziehungsweise der nativen Kaliumkanäle zu untersuchen, wurden die Maximalamplituden des zum Erreichen des Potentials von -20 mV notwendigen Stromes gemessen und auf die Faserkapazität bezogen. Dieser Strom stellte den Gesamtstrom dar, der durch Spannungssprünge in positive Richtung evoziert wurde. Da der überexprimierte EKO-Kanal durch seine Amplitude und fehlende Inaktivierung alle anderen Ströme maskierte beziehungsweise auch dominierte, konnte durch Bestimmung der Maximalamplitude des Auswärtsstroms ein Maß für die Expressionsstärke des EKO-Kanals gefunden werden. Die Ergebnisse sind in Abbildung 4.31 veranschaulicht. Während bei den Canton S im Mittel ein Strom von $4,63 \pm 1,39$ nA/nF notwendig war, um vom Haltepotential (-60 mV) eine Membranspannung von -20 mV zu erreichen, waren es bei den MHC-EKOs $12,09 \pm 3,59$ und bei den EKO-222 $22,96 \pm 3,65$ nA/nF. Als statistisch signifikant zeigte sich lediglich der

Unterschied zwischen der EKO-222- und der Canton S-Gruppe ($P \leq 0,001$). Alle Ergebnisse sind nochmals in der Tabelle 4.3 zusammengefasst dargestellt.

Anhand der in Abbildung 4.32 gezeigten Originaldaten eines Spannungssprunges auf -20 mV

Tabelle 4.3: Mittelwerte und Standardfehler der Parameter aus den Messungen zur Erregungs-Kontraktionskopplung. Alle Ströme sind auf die Faserkapazität bezogen.

Parameter	Versuchstiergruppe		
	Canton S	MHC-Gal4	EKO 222
rate	$6,53 \pm 0,90$	$5,67 \pm 1,06$	$5,27 \pm 1,49$
$V_{M0,5}$	$-13,06 \pm 1,58$	$0,59 \pm 2,34$	$-19,39 \pm 4,11$
base	0	0	0
Max	1	1	1
Strom bei -20 mV [nA/nF]	$4,63 \pm 1,39$	$12,09 \pm 3,59$	$22,96 \pm 3,65$

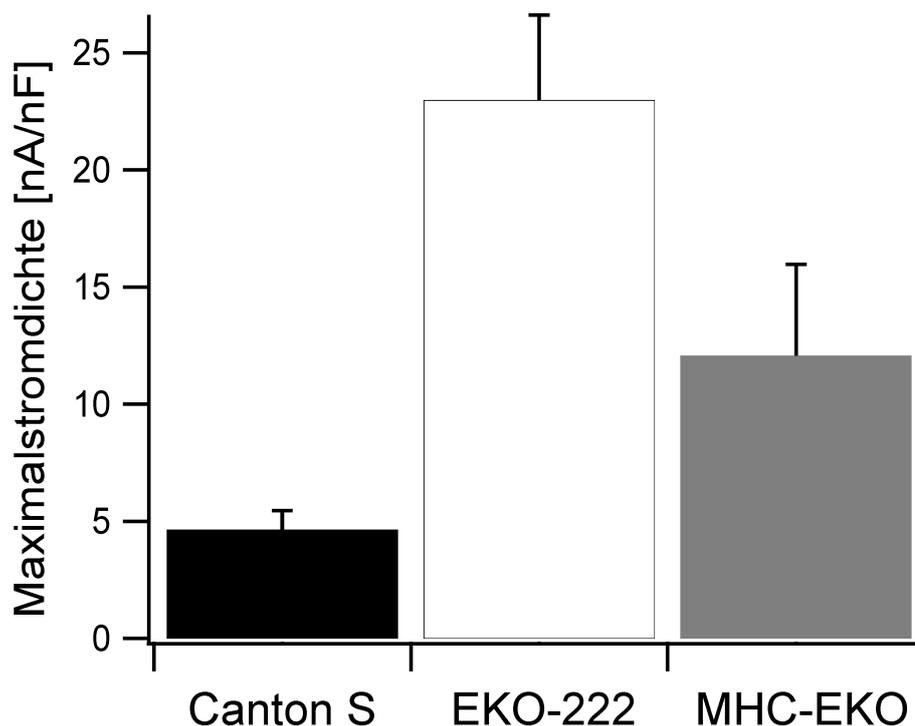


Abbildung 4.31: Auf die Muskelfaserkapazität bezogener Strom beim Sprung auf ein Potenzial von +20 mV für die Gruppen Canton S (n=8), EKO-222 (n=12) und MHC-EKO (n=9); Mittelwerte mit Standardfehler

kann dieses Ergebnis nochmals nachvollzogen werden. Die hier gemessenen Ströme bei den mutierten Stämmen (MHC-EKO und EKO-222) unterschieden sich ebenso deutlich von den

wildtypischen Canton S wie die vorher angesprochenen Messwerte.

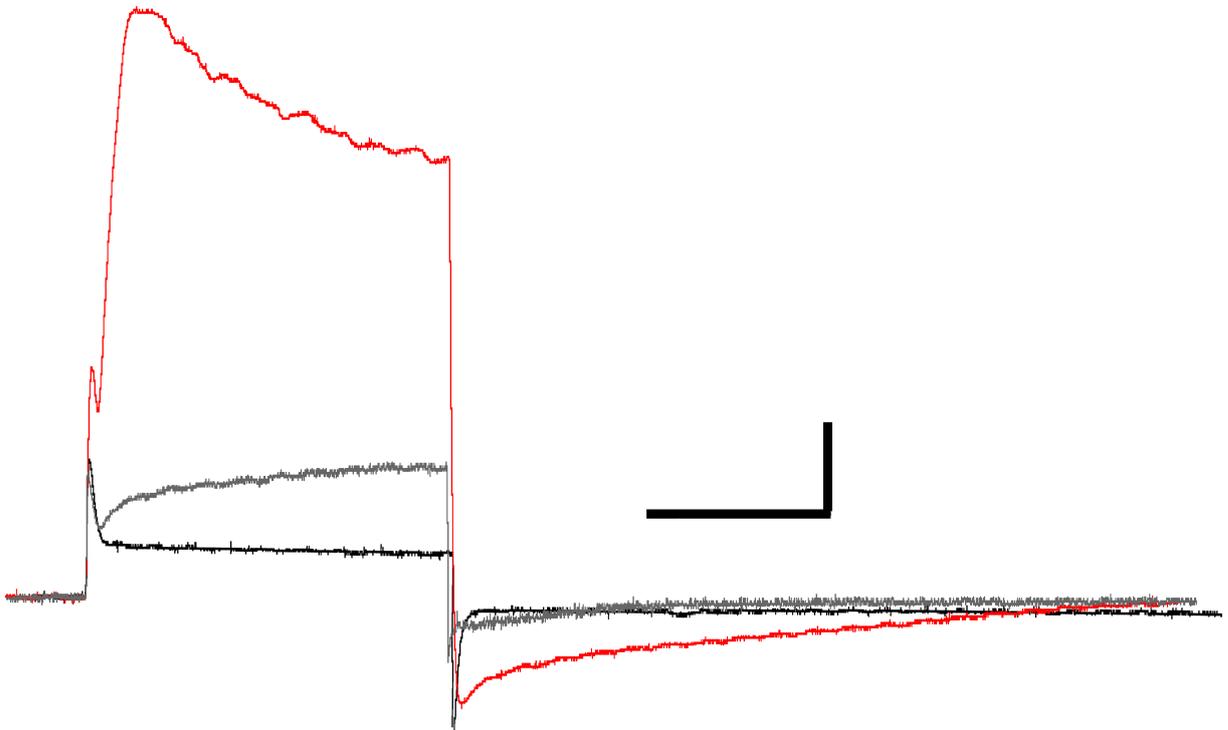


Abbildung 4.32: Originaldaten; Vergleichende Darstellung der zum Erreichen eines Membranpotenzials von -20mV notwendigen Stromes bei Canton S (schwarz), MHC-EKO (grau) und EKO-222 (rot).
Maßstab: 10 nA

4.4.3 Lokalisation der Kalziumkanäle

Für die Darstellung der räumlichen Verteilung der spannungsabhängigen Kalziumkanäle auf der Muskelmembran, wurden diese immunohistochemisch angefärbt und unter einem Fluoreszenzmikroskop sichtbar gemacht. Abbildung 4.33 zeigt ein Ergebnis dieser Färbungen. Zum einen waren in Längsrichtung verlaufende Linien zu erkennen, die sich über die gesamte Länge des Muskels erstreckten. Zum anderen war jedoch auch eine typische Querstreifung zu sehen. Die neuromuskulären Synapsen traten als Strukturen ohne komplexes Verteilungsmuster der Kalziumkanäle hervor.

Etwas anders stellte sich das Ergebnis der Antikörperfärbung in Abbildung 4.34 dar. Das Verteilungsmuster zeigte hierbei keine klaren, durchgängigen Linien, die längs zur Muskelachse verliefen wie im ersten Beispiel, sondern eher eine, aus unterbrochenen, längs verlaufenden

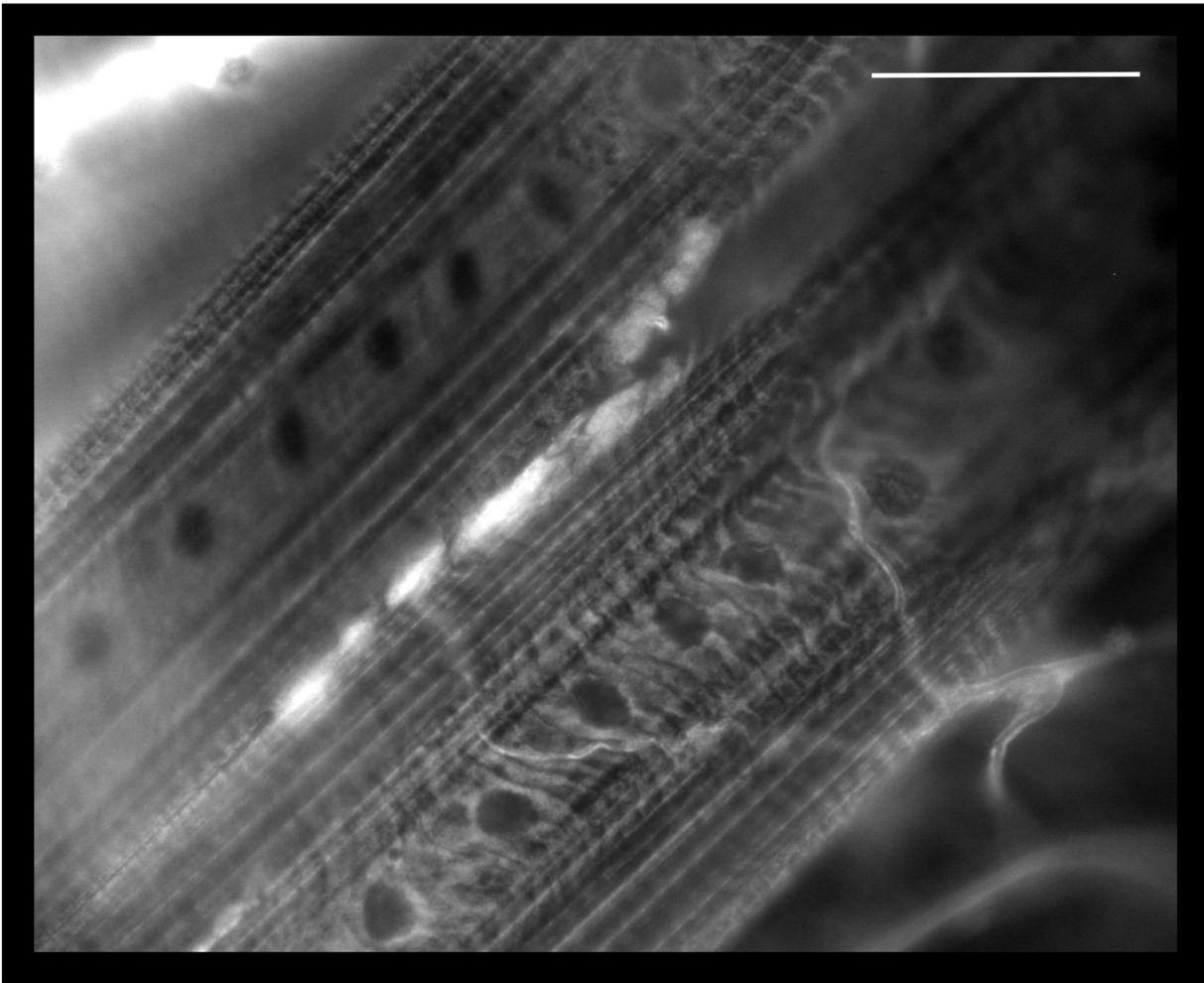


Abbildung 4.33: Fluoreszenzaufnahmen; Lokalisation von spannungsabhängigen Kalziumkanälen mittels eines spezifischen Antikörpers
Maßstäbe: 50 μm

Linien zusammengesetzte Querstreifung. Diese wiederum erschien wesentlich deutlicher als in der erstgezeigten Abbildung.

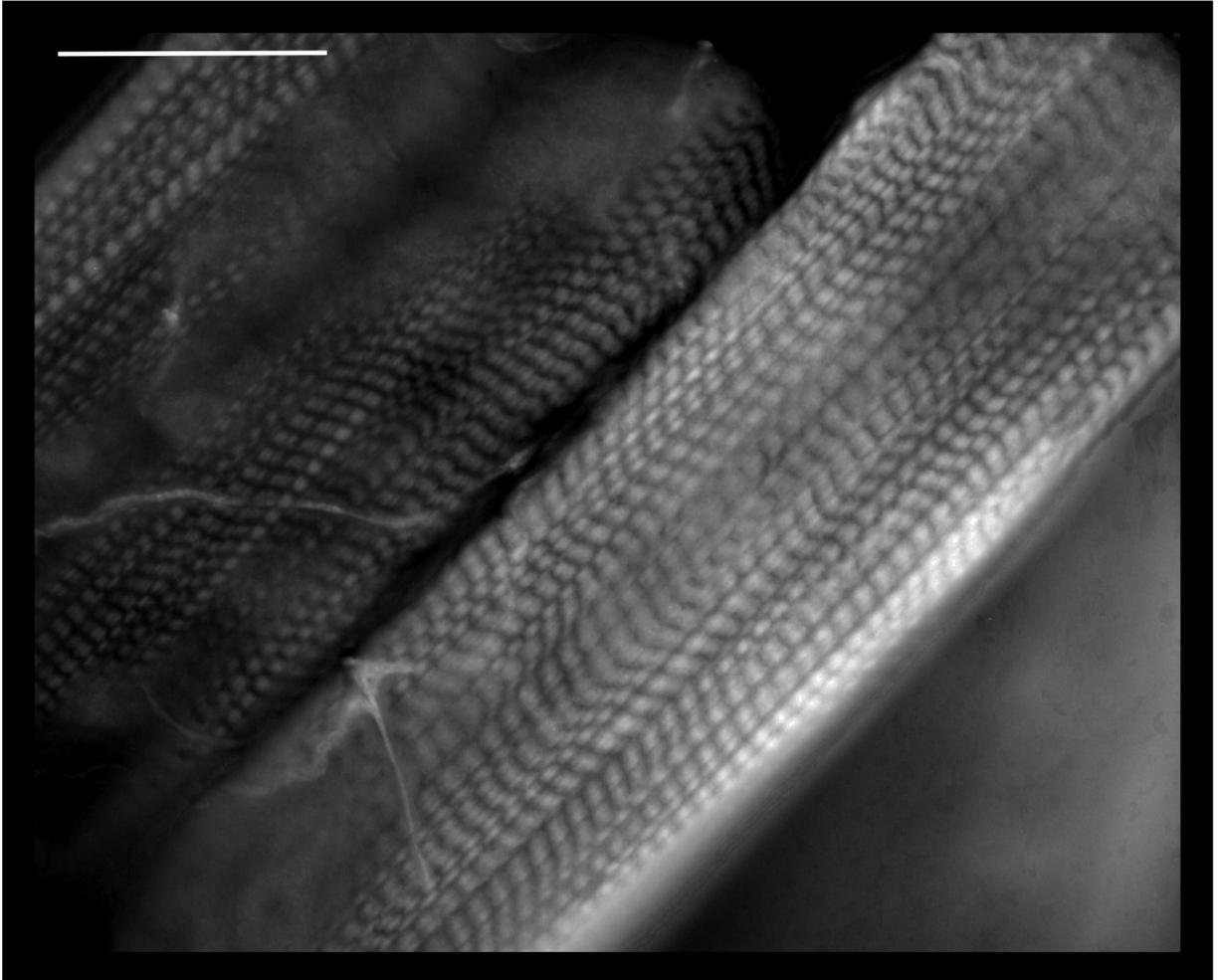


Abbildung 4.34: Fluoreszenzaufnahmen; Lokalisation von spannungsabhängigen Kalziumkanälen mittels eines spezifischen Antikörpers
Maßstäbe: 50 μm

5 Diskussion

5.1 Kreuzung von genetisch veränderten Tieren

Die gekreuzten Versuchstiere zeigten bei entsprechender Illumination schon ungeöffnet eine deutliche Grünfluoreszenz, die es ermöglichte, merkmalsexprimierende Tiere von denen zu unterscheiden, die den veränderten Shaker-Kaliumkanal nicht exprimieren. Das in der Abbildung 4.1 gezeigte Expressionsmuster entsprach dem, was White et al. (2001) schon in ihrer Arbeit gezeigt haben. Die Autoren wiesen allerdings nicht darauf hin, dass es durch Kreuzung der UAS-EKO mit der 24B-Gal-Linie auch zur Expression des Kanals an den Muskelansatzstellen und den "Cap-Cells" der pentascolopidialen Chordotonalorgane kam.

Hinweise auf eventuelle Nebeneffekte des EKO-Kanals durch die ungewünschten Expressionsorte liegen nicht vor, sollten aber bei den folgenden Interpretationen der Ergebnisse stets in Betracht gezogen werden. Die induzierte Expression des EKO-Gens durch die MHC-Gal4-Gene-Switch-Linie zeigte, wie schon in der Arbeit von Osterwalder et al. (2001) dargestellt, eine stabile Grünfluoreszenz, die wesentlich intensiver war, als in nicht induzierten Tieren dieser Kreuzung.

Spätere Versuche (3.6.2) konnten diese Beobachtungen noch zusätzlich belegen, wenngleich diese auch zeigten, dass die Expression des EKO-Kanals unter Kontrolle des 24B-Gal4-Treibers stärker war, als die unter der MHC-Gal4-Gene-Switch-Regie. Diese Tatsache kann ebenso nachvollzogen werden, wenn die Ergebnisse aus den Messungen des EKO-Stroms in beiden genannten Arbeiten (White et al. 2001 und Osterwalder et al. 2001) gegenüber gestellt werden. In der erstgenannten Studie wurde gezeigt, dass der EKO-Strom circa neunmal größer

ist als der native Shaker-Kaliumstrom. Im zweiten Beispiel hingegen, unter der Kontrolle des MHC-Gal4-Konstrukts also, war der EKO-Strom lediglich fünfmal größer als der native Shaker-Strom. Eben jenes Verhältnis konnte auch in dem unter 3.6.2 beschriebenen Experiment und den dazugehörigen Ergebnissen dargestellt werden.

5.2 Elektrophysiologie

5.2.1 Kraftmessung an einzelnen Körperwandmuskeln

Zum Vergleich der Kontraktionsfähigkeit der mutierten Tiere mit den (phänotypischen) Wildtypen, wurden Kraftmessungen durchgeführt. Die hierfür notwendigen Kontraktionen wurden durch nervale Stimulation evoziert.

Zunächst sollte angemerkt werden, dass es bislang keine Vergleichswerte für die Kontraktionskräfte von einzelnen Muskelfasern bei *Drosophila melanogaster* gab. Rose et al. (2007) haben mittlerweile nach dem hier gezeigten Verfahren erfolgreich Kraftmessungen durchgeführt und publiziert.

Bislang wurden, um die Kontraktilität der larvalen Muskulatur zu untersuchen, meistens die peristaltischen Kontraktionswellen der Körperwandmuskeln pro Minute gezählt. Da mir diese Methode als nicht hinreichend aussagekräftig für meine Fragestellung erschien, entwickelte ich eine Präparation, die aufschlussreichere Ergebnisse liefern konnte. Lediglich in den von Beramendi et al. (2005), Zordan et al. (2006) und Hewes et al. (1998) verfassten Arbeiten wurden wirklich Kontraktionskräfte gemessen. Allerdings wurden in den genannten Arbeiten nicht nur die von den Longitudinalmuskeln (6, 7, 12 und 13) aus einem Segment generierte Kraft gemessen (Vergleich: 3.4.1) sondern entweder Körperwandstreifen (Beramendi et al., 2005; Zordan et al., 2006) oder aber die Kraft der Muskeln eines kompletten Hemisegments (Hewes et al., 1998). Allen drei genannten Arbeiten gemein ist jedoch, dass durch die Verwendung von mehreren Segmenten eine elastische Komponente hinzugefügt wird, die zum einen die maximale Kraftamplitude maskieren könnte und zum anderen die Untersuchung der Kontraktionsknetik unmöglich macht. Die Amplitude der Kontraktion wurde in nachfolgend zitierten Arbeiten

durch Relation zum Muskelquerschnitt standardisiert (Beramendi et al., 2005; Zordan et al., 2006). Dennoch zeigen die Ergebnisse Standardfehler mit einer Größe bis zu 30%. Diese sehr große Streuung der Ergebnisse spiegelt sich auch in den von mir durchgeführten Experimenten und in den Daten von Rose et al. (2007) wider.

In den Vorversuchen zeigte sich, dass eine Stimulusfrequenz von 20 Hz zu tetanischen Kontraktionen führte. Bei einer Stimulation mit einer Frequenz von 10 Hz war dies noch nicht der Fall. Die in der Arbeit von Beramendi et al. (2005) angegebenen 15 Hz liegen jedoch in einem sehr ähnlichen Bereich wie die von mir gewählten 20 Hz. In der angesprochenen Studie konnte gezeigt werden, dass sich die Kraft bei der tetanischen Reizung im Vergleich zur Einzelzuckung maximal versechsfacht hatte (im Mittel eher weniger). Ich hingegen fand aber eine Zunahme der Amplitude um das bis zu 19fache. Das deutet darauf hin, dass die von der Arbeitsgruppe um Beramendi gewählten 15 Hz Stimulusfrequenz für eine tetanische Reizung eventuell nicht ausreichend waren.

Die Ergebnisse des von mir durchgeführten Experiments zeigten bei niedrigen Stimulusfrequenzen (0,5 und 2 Hz) keine auffälligen Unterschiede zwischen den verschiedenen Testgruppen. Die Tatsache, dass sich die Kontraktionsamplituden bei 0,5 Hz kaum von denen bei 2 Hz unterschieden und zum Teil sogar größer waren (Canton S) ist dadurch zu erklären, dass die Reizfrequenz von 2 Hz gerade noch nicht ausreichte, um eine Aufsummierung der Einzelkontraktionen zu ermöglichen. Dieser Sachverhalt konnte auch durch die Untersuchung der Kinetik von Einzelzuckungen belegt werden. Hier ergaben sich für alle drei Gruppen jeweils sehr ähnliche Werte. Bei der Halbabfalls-Zeit wurden Werte bis maximal 250 ms gemessen. Daher kann man davon ausgehen, dass sich evozierte Kontraktionen mit einem 500-ms Intervall gerade nicht oder aber nur äußerst wenig aufsummierten. Insgesamt wurden die hier gemessenen Werte aber auch durch Rose et al. (2007) bestätigt.

Bei der tetanischen Reizung fiel zunächst auf, dass die Tiere des Canton S-Stamms im Vergleich stärkere Kontraktionen aufwiesen als die anderen Gruppen. Interessant war jedoch, dass die mutierten und den EKO-Kanal-exprimierenden Tiere (EKO-222) die gleiche Kraft generieren konnten wie die phänotypisch wildtypischen UAS-EKOs. Dies deutete darauf hin, dass eine Art von Kompensation vorliegen könnte, die die EKO-222-Tiere dazu befähigte, ihre Muskeln

ebenso kraftvoll zu kontrahieren wie es ihre nicht-exprimierenden Artgenossen (UAS-EKO) konnten.

5.2.2 Charakterisierung der motoneuronalen Aktivität

Um zu untersuchen, ob die, in die EKO-222-Mutanten eingebrachte Störung der elektrischen Erregbarkeit durch eine gesteigerte motorische Aktivierung kompensiert wurde, wurden extrazelluläre Ableitungen von Muskelpotenzialen auf der Oberfläche von Muskel 6 durchgeführt. In der Arbeit von Fox et al. (2006) wurden einige grundlegende Erkenntnisse gewonnen. So konnte in dieser Studie gezeigt werden, dass sich unter entsprechenden Versuchsbedingungen ein sehr regelmäßiger und lang anhaltender Rhythmus einstellt, der Kontraktionswellen verursacht, die von posterior nach anterior laufen. Weiterhin wurde gezeigt, dass diese Kontraktionswellen mit Bursts korreliert sind, die eine mittlere Dauer von circa 6 s haben. Dieser Wert liegt ein Vielfaches unter den von mir gemessenen Werten, was im weiteren Verlauf jedoch erklärt werden soll.

Zum einen wurde bereits durch Budnik et al. (1990) gezeigt, dass mehrere, nämlich bis zu vier, Aktivitätsmuster voneinander unterschieden werden können. Cattaert und Birman (2001) unterscheiden dahingegen nur zwei verschiedene Rhythmen. Fox et al. (2006) sprechen nur von einem Rhythmus und von nicht-rhythmischer Aktivität. Der Klassifizierung von Cattaert und Birman (2001) folgend, da sich die Beschreibung weitestgehend mit meinen Beobachtungen deckt, handelte es sich bei dem von mir gemessenen Rhythmen um einen Typ-I-Rhythmus. Dieser wird beschrieben mit einer mittleren Dauer von 11,65 s, was sich annähernd mit den in dieser Arbeit gezeigten Daten (13 - 17 s) deckt. Weiterhin wurde schon in mehreren Studien beschrieben, dass die rhythmische Aktivität, unabhängig von deren Art, mehr oder weniger stark abhängig ist von der Temperatur (Barclay et al., 2002). Fox et al. (2006) beschreiben zudem noch Abhängigkeiten der gemessenen Rhythmisdauer vom Ort der Ableitung, der Kalziumkonzentration in der Badlösung, dem Zustand der Larve (intakt versus semi-intakt) und der Richtung der Kontraktionswellen (anterior - posterior oder vice versa). Daher sind die Abweichungen der von mir gemessenen Werte mit denen der Literatur nachvollziehbar.

Für die mittlere Frequenz innerhalb einer Aktivitätsphase gaben Cattaert und Birman (2001) einen Wert von 13 - 20 Hz an, der den unter 4.2.2 angegebenen Bereich (13 - 17 Hz) komplett beinhaltet. In der letztgenannten Arbeit wurden ebenfalls Instantanfrequenzen innerhalb eines Bursts dargestellt, die mit den unter 4.6 gezeigten Darstellungen nahezu identisch sind.

Obwohl Marrus und DiAntonio (2005) zeigten, dass es an der neuromuskulären Synapse, selbst bei einer Reizung mit 40 Hz, nicht zu einer Summation der exzitatorischen postsynaptischen Potenziale (EPSP) kam, wurde außer Acht gelassen, dass die gemessenen EPSPs nicht denen entsprachen, die unter natürlichen Bedingungen auftreten würden. So konnten Jan und Jan (1976a) zeigen, dass es bei einer physiologischen Glutamatkonzentration in der Badlösung (circa 1 mM) zu wesentlich länger dauernden EPSPs kam, die sich dann auch aufsummieren müssten. Bei der von Marrus und DiAntonio verwendeten Ringerlösung war kein Glutamat zugegen. Daher hätte eine Steigerung der motorischen Aktivität der Motoneurone in Bezug auf die Dauer oder die Frequenz, ein Mechanismus zur Kompensation, der in die EKO-222-Larven eingebrachten Störung der elektrischen Erregbarkeit sein können.

Da sich die Werte für die Dauer und die Intra Burstfrequenz weder untereinander signifikant noch von den in der Arbeit von Cattaert und Birman (2001) angegebenen Daten unterscheiden, kann daraus gefolgert werden, dass es auf dieser Ebene nicht zu einer Kompensation im Rahmen der Homöostase der elektrischen Erregbarkeit kommt.

5.2.3 Charakterisierung der Ionenströme

Damit untersucht werden konnte, ob eine Kompensation auf Ebene der zellulären Erregbarkeit in Form einer veränderten ionalen Leitfähigkeit stattfindet, wurden die transmembranen Ionenströme untersucht.

Die in der Körperwandmuskulatur von *Drosophila melanogaster* vorkommenden Ionenströme wurden in den letzten Jahren ausführlich beschrieben. Zusammen mit den aus der Sequenzierung des Genoms gewonnenen Daten (Adams et al., 2000; Littleton und Ganetzky, 2000), konnten bislang zwei einwärtsgerichtete Kalziumströme (Gielow et al., 1995), vier unterscheidbare Kaliumströme (Singh und Wu, 1989) sowie ein hyperpolarisiert aktivierter Chloridionenstrom

(Rose et al., 2007) charakterisiert werden. Ein Natriumstrom wurde bislang nicht in der Literatur beschrieben. Auch eigene Experimente bei denen TetrodonToxin (TTX) zum Blocken von spannungsabhängigen Natriumkanälen verwendet wurde, lieferten keinerlei Hinweise auf die Anwesenheit von spannungsabhängigen Natriumkanälen in den Zellen der Körperwandmuskulatur von *Drosophila*. Während die Kalziumströme aufgrund ihrer pharmakologischen und physiologischen Eigenschaften den T- und L-Typen von Vertebraten nur teilweise ähnelten (Gielow et al., 1995), entsprachen die Kaliumströme sehr genau den von anderen Spezies bekannten Daten (Singh und Wu, 1989). Die Arbeitsgruppe um Singh und Wu konnte ebenfalls zeigen, dass es sich um zwei spannungsgesteuerte (I_A , I_K) und zwei kalziumabhängige (I_{CF} , I_{CS}) Kaliumströme handelte. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass der transiente I_A -Strom durch den *Shaker*-Lokus codiert wird (Haugland und Wu, 1990; Wu et al., 1983). Spätere Untersuchungen konnten zeigen, dass sich der Shaker-Kanal durch seine PDZ-Bindungsdomäne im subsynaptischen Retikulum anhäuft (Tejedor et al., 1997; Zito et al., 2002). Diese Bindungsdomäne wurde von White et al. (2001) bewusst unverändert gelassen um eine "natürliche" Lokalisation des veränderten Shaker-Kanals zu gewährleisten. Dass dieser Sachverhalt zutrifft, wurde auch in dieser Arbeit bereits an anderer Stelle gezeigt (vgl. Abbildungen 4.1 und 4.2). Da die in dieser Arbeit benutzte, Mutante EKO-222 über zwei unabhängige Genkopien verfügte und es somit zu einer Überexpression kam, konnte man davon ausgehen, dass der native Shaker-Kanal komplett verdrängt und die verbliebenen Kaliumströme durch den EKO-Strom dominiert wurden (White et al., 2001). Die einzige Möglichkeit zur Kompensation bestand demnach in einer Erhöhung der Amplitude des einwärtsgerichteten, spannungsabhängigen Kalziumstromes. Die Ergebnisse der von mir gemessenen spannungsabhängigen Kalziumströme lagen in dem in der Literatur beschriebenen Bereich von circa 18 nA/nF (Gielow et al., 1995) bis zu 50 nA/nF (Bhattacharya et al., 1999). Dieser recht weite Bereich ist vor allem durch verschiedene Messbedingungen zu erklären. So ist sowohl die Temperatur (aufgrund der Gesetze der Thermodynamik) als auch die verwendete Bariumionen-Konzentration in der Ringerlösung von essentieller Bedeutung. Während Gielow et al. (1995) Ihre Messungen bei 4° C durchgeführt hat, waren es bei Bhattacharya et al. (1999) 21° C. Die ansonsten gleichen Messbedingungen dieser beiden Studien zeigen den großen Einfluss der Temperatur auf die Messungen. Des

Weiteren zeigte die Magnesiumkonzentration eine Auswirkung auf die Amplitude der Kalziumströme (pers. komm. Rose, nicht gezeigte Daten). Diese Beobachtungen belegten den schon von Hille (2001) beschriebenen Sachverhalt, dass Magnesiumionen einen hemmenden Einfluss auf die Kalziumströme haben. Wichtig war diese hohe Konzentration jedoch, um die spontane, synaptische Ausschüttung von Transmittervesikeln zu verhindern.

Für die in den wildtypischen Canton S gemessenen Kalziumströme zeigten sich bei Gielow et al. (1995) bereits ab -30 mV Ströme mit einer wenigen Nanoampere betragenden Amplitude. Bei den von mir durchgeführten Versuchen ergab sich eine deutliche Aktivierung in allen Fällen erst bei -20 mV, was sich durch die erhöhte Magnesiumkonzentration erklären ließe. Konsistent mit den bisher publizierten Daten war jedoch ein Maximum der Ströme in der I/V-Kurve bei 0 mV. Die hierbei gemessene Amplitude war jedoch größer als die von Gielow et al. dargestellten Werte. Da ich meine Experimente jedoch bei einer, im Vergleich zu der von Gielow et al. (1995) publizierten, höheren Temperatur ($20 \pm 2^\circ \text{C}$) durchgeführte habe, ist dieser Unterschied nachvollziehbar. Vergleicht man die Ergebnisse der von mir durchgeführten Experimente an den drei Versuchstiergruppen untereinander, so ist zu erkennen, dass die Werte für die Canton S-Gruppe und die Werte der UAS-EKO-Gruppe sich nahezu kongruent überlagern. Deutlich setzten sich hingegen die Werte für die mutierten EKO-222 ab. Hier war eine Zunahme der Amplitude der Kalziumstromdichten um bis zu 150% maximal zu verzeichnen (im Mittel 30%).

Im Gegensatz zu den anderen beiden Versuchstiergruppen, trat das Maximum in der I/V-Kurve bei den Tieren der EKO-Gruppe bei -10 mV und nicht erst bei 0 mV auf. Auch die statistische Überprüfung zeigte Unterschiede bei den Sprüngen auf -20 und -10 mV zwischen den EKO-222- und den UAS-EKO-Tieren. Eine weitere Signifikanz konnte aufgrund der starken Variationsbreite der Ergebnisse nicht nachgewiesen werden. Der Grund für die Streuung lag höchst wahrscheinlich in den nicht exakt konstanten Messbedingungen, da zum Beispiel, um ein gutes Signal zu Rausch Verhältnis zu gewährleisten, auf ein temperaturregulierendes Element verzichtet wurde. Zum anderen spiegelt die Streuung eventuell auch einen Teil der auftretenden Schwankungen wider, die in der Expression der Ionenkanäle natürlicherweise vorkommt, da sie dynamisch reguliert werden (Liu et al., 1998).

Zusammengenommen deuteten diese Unterschiede darauf hin, dass es sich hierbei um einen Mechanismus zur Kompensation der eingebrachten Störung handeln könnte. Zum anderen deutete die Tatsache, dass sich die Aktivierungsschwelle nicht deutlich verändert hatte darauf hin, dass nur die Amplitude durch eine Erhöhung der Zahl der Ionenkanäle, nicht aber die intrinsischen Eigenschaften der Kanäle selbst, reguliert worden waren. Dies sollte jedoch in weiteren Experimenten überprüft werden.

5.2.3.1 Homöostase auf Ebene der zellulären Erregbarkeit

Wie Singh (1990) zeigen konnte liegt der Effekt des durch die Shaker-Kanäle getragenen Kaliumstroms in einer schnellen Repolarisation der Zelle, die eine weitere Depolarisation nur verzögert und nicht etwa komplett verhindert, weil die Inaktivierung der Kanäle ebenso schnell erfolgt wie die Aktivierung. Da die EKO-Kanäle jedoch keine Inaktivierungsdomäne besaßen und folgerichtig auch keine Form der schnellen Inaktivierung zeigten, sollte eine, durch Kalziumionen getragene Depolarisation weitestgehend verhindert werden. Fakt ist aber, dass es dennoch, wenn auch zu einer stark verminderten, postsynaptischen Depolarisation kommt (White et al., 2001).

Diese verminderte Depolarisation, bei der demnach auch eine geringere Menge an Kalzium in die Zellen gelangt, könnte für eine elektrisch erregbare Zelle das Signal sein, welches eine Regulation im Rahmen der neuronalen Homöostase veranlasst. Wenn auch diese Frage bislang noch nicht experimentell bestätigt werden konnte, so wurde doch die intrazelluläre Kalziumkonzentration als Sensor für die elektrische Erregbarkeit einer Zelle vorgeschlagen, weil Kalziumionen zum einen als intrazelluläre "second-messenger" fungieren, die sowohl die Genexpression beeinflussen als auch wesentlich schnellere Signalwege (in Form von Enzym-Effektoren) beeinflussen können. Daher haben Liu et al. (1998) in ihrer Simulationsstudie versucht eine Expression aller spannungsgesteuerten Ionenkanäle und der damit verbundenen Ströme durch drei verschiedene Kalziumsensoren, die in unterschiedlichen Zeitskalen aktiv sind, regulieren zu lassen. Dies führte zu einem äußerst robusten Modell eines Neuron, das auf zahlreiche Umwelteinflüsse und veränderte Erregungszustände in einer Art reagierte, wie sie aus elektrophysiologischen Daten

bekannt waren.

Bislang wurde der Modellorganismus *Drosophila* hauptsächlich zu Studien der synaptischen Plastizität herangezogen, bei denen die synaptische Übertragung in irgendeiner Form beeinträchtigt wurde (siehe zum Beispiel: Davis und Goodman, 1998; O'Brien et al., 1998; Petersen et al., 1997, 2004).

Paradis et al. (2001) hingegen konnten erstmals bei *Drosophila melanogaster* zeigen, dass ein homöostatisch wirksamer Kompensationsmechanismus auch bei einer Veränderung der zellulären Erregbarkeit (durch Expression eines humanen Kaliumkanals (Kir2.1)) ausgelöst werden kann. Hier fand eine Kompensation allerdings auf (prä-)synaptischer Ebene statt wodurch zusätzlich der Hinweis auf eine retrograde Signalkaskade geliefert wurde.

Die Fähigkeit eines Muskels, seine Erregbarkeit durch Veränderung der Expression der Ionenkanäle zu steigern wurde in dieser Form bei *Drosophila* bislang nicht gezeigt. Hier liefert meine Arbeit die ersten Hinweise überhaupt.

Dass auch Muskeln in der Lage sein müssen, ihre Erregbarkeit adaptiv anzupassen, wird durch die Studien von Katz und Thesleff (1957); Lnenicka und Mellon (1983) gezeigt. Aus diesen geht hervor, dass die Erregbarkeit eines Muskels, allein durch sein enormes Wachstum während der Entwicklung, eine drastische Veränderung seiner aktiven und passiven Membraneigenschaften erfährt (nähere Ausführung: siehe Einleitung unter 2.1.1.1). Über welchen Mechanismus die Regulation genau erfolgt, sollte, wie bereits erwähnt, mit den folgenden Experimenten geklärt werden.

5.3 Molekularbiologie

Eine Veränderung der Amplitude des spannungsgesteuerten Kalziumstroms kann durch vielerlei Mechanismen bewerkstelligt werden. Eine Zusammenstellung über die mannigfaltigen Regulationsmechanismen ist in den Übersichtsartikeln von Catterall (2000) und Trimmer (1998) gegeben. Der einfachste Zugang bestand jedoch zunächst in der Expressionsanalyse der für den entsprechenden Strom korrespondierenden Gene.

Um zu überprüfen, ob die gesteigerte Amplitude des Kalziumstromes durch eine gesteigerte Expression der Kalziumkanalgene, beziehungsweise deren Untereinheiten bedingt war, wurden Expressionsanalysen durchgeführt. Hierzu wurden semiquantitative RT-PCRs mit den α -Untereinheiten von T- und L-Typ-Kalziumkanälen und der einzig bekannten β -Untereinheit durchgeführt. Die Methode an sich beruht auf einer Kopplung einer reversen Transkription (RT) um die isolierte mRNA in cDNA umzuschreiben mit einer anschließenden Polymerasen Kettenreaktion (Polymerase ChainReaction, PCR) zur Vervielfältigung.

5.3.1 Probenaufbereitung

Zur Bestimmung der Expressionsrate der genannten Untereinheiten der spannungsabhängigen Kalziumkanäle, musste zunächst die mRNA aus Frischgewebe isoliert werden. Alle Versuche diese RNA gezielt aus Muskelgewebe zu isolieren, scheiterten jedoch an der Degradation der RNA.

Ein bekanntes Problem bei der RNA-Isolation ist die ubiquitäre Anwesenheit von RNasen, die, wie der Name schon vermuten lässt, RNA-Moleküle verdauen. Daher war es nicht möglich, in ausreichend kurzer Zeit genügend Material zu präparieren, um damit anschließend noch erfolgreich quantifizieren zu können.

Daher wurden ganze Larven als Ausgangsmaterial für die RNA-Isolation gewählt. Dieses vorgehen entspricht jedoch dem allgemeinen Standard beim Umgang mit larvalem Gewebe (siehe zum Beispiel: Betz et al., 2001; Gim et al., 2001). Eine Verfälschung der Ergebnisse hätte

dadurch nur insofern auftreten können, als dass Unterschiede zum Teil nicht entdeckt worden wären. Dies ist dadurch zu erklären, dass die T-Typ- und die β -Untereinheiten nicht ausschließlich in muskulärem Gewebe exprimiert werden. Da auf neuronaler Ebene aber weder in den von mir noch in den von White et al. (2001) durchgeführten Experimenten irgendwelche Veränderungen zutage traten, die auf eine Erhöhung der Anzahl von Kalziumkanälen zurückzuführen wären waren diese Gewebe zwar an der, in der Isolationsreaktion erhaltenen Gesamt-RNA-Menge beteiligt, zeigten aber höchstwahrscheinlich keine Unterschiede (ein direkter Nachweis konnte aus oben genannten, präparativen Gründen ebensowenig erfolgen).

Aus diesem Grund, und weil die eingesetzte Menge an Frischgewebe letztlich jedoch wesentlich mehr Muskel- als neuronales Gewebe enthielt, und trotzdem noch deutliche Unterschiede feststellbar waren, konnte davon ausgegangen werden, dass die im weiteren Verlauf noch zu diskutierenden Ergebnisse zuverlässig waren.

5.3.2 Polymerase Kettenreaktion

Mit der Etablierung der PCR (Mullis und Falloona, 1987) wurde eines der bedeutendsten Werkzeuge der Molekularbiologie geschaffen (Mülhardt, 2002). Die Fähigkeit, kleine Mengen stark zu amplifizieren, bringt jedoch auch die Gefahr mit sich, kleine Fehler auf gleiche Weise zu multiplizieren. Daher mussten die Reaktionsbedingungen für die PCR mit Bedacht gewählt und angepasst werden. Die Stärken und Schwächen der PCR-Methodik für die Quantifizierung von RNA sind in den Arbeiten von Souza et al. (1996) und Freeman et al. (1999) zusammengefasst. Die Primer wurden, wie bereits beschrieben, so gewählt, dass diese in zwei verschiedenen Exons lagen, um so unterscheiden zu können, ob das PCR-Produkt auf eine genomische oder auf eine RNA-Matrize zurückzuführen war. Aufgrund eines sehr ähnlichen GC-Gehaltes, besaßen alle Primer eine ähnliche Annealing-Temperatur. Daher konnten alle zu untersuchenden Gene mit denselben Parametern der polymerasen Kettenreaktion amplifiziert werden, was unterschiedliche Vermehrungsraten während der PCR unwahrscheinlich machte. Auch die Tatsache, dass alle Amplifikate in einem ähnlichen Größenbereich lagen, förderte die Gleichheit der Vermehrungsrate, was letztlich eine wichtige Voraussetzung für Quantifizie-

rungsreaktionen war.

5.3.2.1 Zyklenuptimierung

Obwohl die Vermehrungsrate des PCR-Produkts theoretisch exponentiell ist, zeigt die Wachstumskurve aufgrund zahlreicher Umstände einen eher sigmoiden Verlauf. Wichtig für die Quantifizierung war jedoch, die PCR abubrechen bevor die Vermehrungsreaktion in den gesättigten Bereich überging, da hier ansonsten keine Unterschiede mehr detektiert werden könnten. Dennoch musste aber genügend Produkt zum (einfachen) Nachweis mit Ethidium-Bromid vorhanden sein. Die Durchführung der Zyklenuptimierung wurde mit dem ubiquitär vorhandenen Haushaltsgen *rp49* durchgeführt, weil angenommen werden konnte, dass die Menge an *rp49*-RNA stets dominierend war, weil dieses Gen im Gegensatz zu den anderen untersuchten, wie bereits gesagt, ubiquitär exprimiert wird und so am ehesten eine Sättigung zeigen würde. Aus diesem Grund wurde auch eine Zahl von 35 Zyklen gewählt die, wie auf Abbildung 4.13 zusehen ist, zwar zu einer kurz vor dem Bereich der Sättigung liegenden Menge an PCR-Produkt für das Housekeeping-Gen *rp49* führte, aber gleichzeitig auch sicherstellte, dass selbst die schwachexprimierten Gene wie die β -Untereinheit noch in ausreichendem Maß vermehrt wurden.

5.3.3 Die Wahl der zu untersuchenden Gene

Seit der vollständigen Sequenzierung des Genoms von *Drosophila melanogaster* im Jahre 2000 (Adams et al., 2000) werden die Sequenzdaten in der FlyBase Datenbank (www.flybase.org) gesammelt, verwaltet und aktualisiert. Dadurch war es Littleton und Ganetzky (2000) noch im gleichen Jahr möglich, eine Arbeit über das wahrscheinliche Vorkommen von Ionenkanälen bei *Drosophila* zu verfassen. Aus dieser Arbeit ging hervor, dass vier verschiedene Gene für verschiedene α -Untereinheiten von spannungsabhängigen Kalziumkanälen codieren. Aufgrund der von Gielow et al. (1995) bekannten Daten, waren vor allem Gene interessant, die für T- und L-Typ-Kalziumkanäle codieren.

Für die Kanäle des L-Typ gibt es zwei Kandidaten: (*Cacophony* auch bekannt als *dmca1A* und

dmca1D). Während Zheng et al. (1995) zeigen konnten, dass das Gen *dmca1D* tatsächlich für einen L-Typ-Kalziumkanal codiert, konnten Eberl et al. (1998) und Ren et al. (1998) nachweisen, dass dieses vornehmlich in Muskelgewebe exprimiert wird. Im Gegenzug fanden Smith et al. (1996) heraus, dass *cacophony* hauptsächlich in neuronalem Gewebe exprimiert wird. Daher wurde *dmca1D* für die Experimente zur Untersuchung der Expressionsrate dem anderen Kandidaten vorgezogen.

Bei der Wahl des Gens zur Untersuchung von T-Typ-Kalziumkanälen wurde in der Arbeit von Littleton und Ganetzky (2000) auf das Gen *dmca1G* verwiesen. Bei von mir durchgeführten Datenbankrecherche bei der die Aminosäuresequenz von entsprechenden Kanälen des Menschen und der Ratte mit der FlyBase Datenbank verglichen wurden, die die Hinweise aus der gerade genannten Arbeit absichern sollten, fand ich allerdings einen anderen Kandidaten der in der Arbeit von Littleton und Ganetzky nicht einmal erwähnt wurde. Die Sequenzhomologie zu dem dort genannten *dmca1G* war hingegen so gering, dass ich den Kandidaten mit der größten Homologie zu bekannten Vertretern der T-Typ-Kalziumkanalfamilie aufwies. Daher wurden die Versuche mit Primern für das Gen *dmca1T* durchgeführt. Da jedoch noch Beweise aus entsprechenden Experimenten, die den Zusammenhang dieses Gens mit dem von Gielow et al. beschriebenen T-Typ-Kalziumstrom eindeutig herstellen, fehlen, sind die Ergebnisse für dieses Gen vorerst mit entsprechender Vorsicht zu betrachten.

Im weiteren Verlauf ergab es sich, dass auch noch Experimente folgten, die eine Untersuchung der Expressionsrate von Kalziumkanal- β -Untereinheiten zum Ziel hatten. Da sowohl in der Arbeit von Littleton und Ganetzky (2000) als auch in der Datenbank lediglich ein Hinweis auf **ein** derartiges Gen zu finden war, wurde dieses als Grundlage für die weiteren Untersuchungen verwendet.

Bei der Wahl des Housekeeping-Genes musste bedacht werden, dass dieses so gut wie keiner Regulation unterliegt und ubiquitär exprimiert wird.

Obwohl bei Vertebraten gerne GAPDH (Glycerin-Aldehyd-3-Phosphat DeHydrogenase) als ein solcher Standard benutzt wird (Apostolakos et al., 1993; Zhao et al., 1995), sprachen die bei *Drosophila melanogaster* dargestellten Ergebnisse eher dagegen. Zum einen gibt es zwei verschiedene für eine GAPDH codierende Gene (Tso et al., 1985) und zum anderen werden

diese während verschiedener Entwicklungsstadien unterschiedlich reguliert (Sun et al., 1988), was letztlich das Ausschlußkriterium für dieses Gen darstellte. Dennoch wird es in anderen Arbeitsgruppen nach wie vor als Housekeeping-Gen verwendet (Betz et al., 2001). Durch die grundlegende Arbeit von O'Connell und Rosbash (1984) wurde die Eignung des ribosomalen Proteins 49 (rp49) bezüglich der allgemein an ein Housekeeping-Gen gestellten Bedingungen gezeigt. Daher habe ich wie auch andere Arbeitsgruppen dieses Gen (siehe zum Beispiel: Gim et al., 2001; Kim et al., 2006) als internen Standard verwendet.

5.3.4 Bestimmung der Expressionsrate

Die Ergebnisse zur Bestimmung der Expressionsrate der α -Untereinheiten der spannungsabhängigen Kalziumkanäle zeigten weder bei T- noch bei L-Typ Unterschiede zwischen den Tieren der Gruppe Canton S und UAS-EKO. Lediglich der Vergleich der UAS-EKO und der mutierten EKO 222 zeigte einen signifikanten Unterschied bei den T-Typ α -Untereinheiten. Aus den unter 5.3.3 bereits vorgebrachten Gründen, ist dieser Unterschied allerdings von zweifelhafter Aussagekraft und sollte daher mit Vorsicht betrachtet werden.

Wie unter anderem in den Arbeiten von Bichet et al. (2000); Josephson und Varadi (1996) oder Gregg et al. (1996) gezeigt wurde, verharrt die α -Untereinheit eines Kalziumkanals nach der Expression zunächst im Endoplasmatischen Retikulum (ER) der Zelle. Erst nach Verbindung mit einer dazugehörigen β -Untereinheit wird die α -Untereinheit aus dem ER befreit und in die Zellmembran integriert, was somit auch zu einer Steigerung der Amplitude des entsprechenden Stromes führt. Daher war das Ausbleiben eines signifikanten Unterschiedes auf Niveau der α -Untereinheiten nicht weiter verwunderlich. Aus demselben Grund sollte aber ein deutlicher Expressionsunterschied auf Ebene der β -Untereinheiten nachzuweisen sein. Die hier erhaltenen Ergebnisse konnten diese Vermutung bestätigen. Die signifikante Erhöhung der Expressionsrate um 30% im Vergleich zu den beiden Kontrollgruppen (Canton S und UAS-EKO) ist mit den, in den zuletzt zitierten Arbeiten, dargestellten Hypothesen konform.

Eine Erhöhung der Expressionsrate um 30% liegt im gleichen Bereich wie die Erhöhung der Amplitude des Kalziumstromes. Diese lineare Beziehung wurde auch schon in anderen Systeme-

men beschrieben (Baro et al., 1997; Song, 2002; Tkatch et al., 2000). In diesen Arbeiten wurde bei Kaliumkanälen der lineare Zusammenhang zwischen dem mRNA-Gehalt der α -Untereinheit des entsprechenden Ionenkanals und der Amplitude des dazugehörigen Stromes gezeigt. Da die β - jedoch in einem stöchiometrischen Verhältnis von 1:1 mit den α -Untereinheiten aggregieren, sollten diese Ergebnisse also auch auf den von mir dargestellten Fall übertragbar sein. Ein definitiver Hinweis für ein solch lineares Verhältnis zwischen mRNA-Menge von β -Untereinheiten und der Amplitude des entsprechenden Stromes findet sich in der Literatur bislang nicht. Diese Arbeit könnte also einen ersten konkreten Hinweis darauf geliefert haben.

5.3.5 Sequenzierung und Datenbankabgleich

Die Sequenzierung der PCR-Amplifikate war notwendig, um sicherzustellen, dass zum einen tatsächlich die gewünschten Gene, und nicht etwa andere Produkte mit einer entsprechenden Größe, und zum anderen nur auf RNA-basierende cDNA vervielfältigt wurde. Die Ergebnisse, die sich nach dem Vergleich der Sequenzierungsdaten mit der Internetdatenbank ergaben, konnten dies auch durchweg zeigen.

Eine Ausnahme ergab sich bei dem Sequenzierungsergebnis der β -Untereinheiten zweierlei Hinsicht: Zum einen war das Sequenzierungsergebnis zu kurz, was wie folgt zu erklären ist: Da keine weiteren Bakterien mehr für eine Plasmidvermehrung vor der Sequenzierung mehr zur Verfügung standen, wurde ein PCR zur Sequenzierung geschickt. Da es sich hierbei um ein lineares Produkt mit einem definierten Anfang und einem Ende handelte, traten hierbei im Endbereich der Matrize die üblichen Probleme (vorzeitiges Verlassen des Matrizenstranges) für die zur Sequenzierung eingesetzte Polymerase auf, die sich bei einer zirkulären Matrize nicht ergaben. Damit ist das Fehlen einiger Basen am Ende des Sequenzierungsproduktes zu erklären.

Zum anderen zeigte das Sequenzierungsergebnis das Vorhandensein eines Introns, welches laut der FlyBase Datenbank in der RNA und somit in der cDNA nicht vorhanden sein sollte. Da die Sequenzierung von Produkten aus der gleichen cDNA, die mit anderen Primern amplifiziert wurden, die ebenfalls intronüberspannend angelegt worden waren, aber nie ein Intron aufwies,

spricht dies gegen die Aussage der Datenbank. Ein weiterer Grund, der für die von mir gefundenen Daten sprach, war, dass selbst bei eingehender Betrachtung der Agarosegele nie ein entsprechend kleineres Amplifikat gefunden wurde. Weiterhin gestärkt wird der hier dargestellte Befund, durch die Tatsache, dass ein DNA-Verdau, der noch während der RNA-isolation durchgeführt wurde, zu einer vollständigen Degradierung der DNA geführt haben sollte. Auch blieben PCRs, die mit der isolierten RNA als Template durchgeführt wurden, ohne Ergebnis. Die hier genannten Gründe sprechen allesamt gegen eine Verunreinigung mit DNA, welches die einzige logische Konsequenz wäre, wenn die Informationen der Datenbank nachweislich zuträfen. Wahrscheinlicher jedoch ist, dass es sich bei dem hier untersuchten Abschnitt des Gens der für die Kalziumkanal- β -Untereinheit codiert um eine sogenannte Spleiß-Variante handelt, bei der dieses Intron nicht entfernt wurde. Des Weiteren beruhen die Aussagen über das Vorhandensein dieses Introns auf Analysen, die mit RNA-Extrakten aus separierten Köpfen adulter Fliegen hergestellt wurden. Es könnte also sein, dass nach der Metamorphose zur adulten Fliege eine andere Variante der Untereinheit exprimiert wird, oder dass in neuronal dominiertem Gewebe hauptsächlich diese andere Variante zu finden ist. Ein Beispiel, das zahlreiche Isoformen besitzt, die sowohl spezifisch für verschiedene Gewebe als auch gleichzeitig für verschiedene Entwicklungsstadien sind, stellt das muskuläre Protein dar welches die schweren Ketten des Myosins bildet (MHC) (Bernstein et al., 1986).

Um meine Ergebnisse letztlich abzusichern, müsste noch gezeigt werden, dass eine PCR mit Primern, die direkt in den Introns eines beliebigen Gens liegen, mit der verwendeten cDNA zu keinem Produkt führen. Würde sich hierbei ein Produkt ergeben, wäre dies der Beweis dafür, dass doch eine Verunreinigung der Probe mit genomischer DNA vorlag. Da dieser Versuch aus zeitlichen Gründen nicht mehr durchgeführt werden konnte, ist die Aussage der Experimente zur Bestimmung der Expressionsrate vorab nur unter Vorbehalt gültig, obwohl die Wahrscheinlichkeit aufgrund der von mir angeführten Gründe eher für eine Bestätigung als für eine Ablehnung der Ergebnisse sprach.

5.3.6 Regulation der Expressionsrate

Die Expression von Genen ist höchst komplexen und vielfältigen Regulationsmechanismen unterworfen. In dem in dieser Arbeit betrachteten Fall, wurde eine Mutante mit einer verminderten Erregbarkeit erzeugt, was dazu führte, dass letztlich weniger Kalziumionen in die Zelle gelangten. Das legte nahe, dass dieser Unterschied durch eine Art Kalziumsensor detektiert wurde. Dieser Kalziumsensor kann in Gestalt vieler Proteine auftreten. Neben dem kalziumbindenden Calmodulin (siehe zum Beispiel Chin und Means, 2000), das wiederum an einer Vielzahl von Signalkaskaden beteiligt ist, seien hier noch Synaptotagmin (Brose et al., 1992) und die neuronale Kalziumsensor-Familie (Burgoyne und Weiss, 2001) als Beispiele genannt. Wie Kalziumionen an der Regulation neuronaler Gene beteiligt sein können, wird in der Arbeit von West et al. (2001) zusammengefasst.

Aus dieser Arbeit wird auch der wichtige Einfluss des CREB-Proteins deutlich. Dieser Transkriptionsfaktor wird durch eine durch Kalziumionen induzierte Signalkaskade (Kalzium \rightarrow Calmodulin \rightarrow cAMP \rightarrow CREB) phosphoryliert, und kann dann die Expression bestimmter Gene ermöglichen.

Es war jedoch schwierig, diese Ergebnisse auf die von mir betrachtete Situation zu übertragen, da hierbei ein negatives Signal (das Fehlen von freien Kalziumionen) eine Expression induzieren müsste. Dafür sind bislang keine Beweise gefunden worden. Es könnte aber sein, dass es sich im Falle der Regulation der Kalziumkanäle (zumindest die der β -Untereinheit) um eine Autoregulation handelt. Wie bereits unter 5.3.3 dargestellt, ist die Expression der β -Untereinheiten maßgeblich für die Modulierung der Amplitude des Kalziumstroms während die α -Untereinheit wenig reguliert zu werden scheint. Daher würde es Sinn machen, die Regulation auf diese Untereinheit zu beschränken. Meine Hypothese schlägt vor, dass die Expression von Kalziumkanal- β -Untereinheiten solange ungehindert und unreguliert abläuft, bis ein bestimmtes Niveau an Kalziumionen in der Zelle aufrecht erhalten werden kann. Bei diesem Niveau müssten einige überschüssige Kalziumionen dann eine kalziuminduzierte Repression veranlassen. Zu dem vorher angesprochenen CREB müsste eine Art Antagonist existieren, der eine Transkription verhindert. Dieser Antagonist findet sich in Form der sogenannten ICER-Familie

(Mioduszewska et al., 2003; Sassone-Corsi, 1995).

Während diese Proteinfamilie bei Vertebraten gut untersucht ist, finden sich bei *Drosophila* bislang nur indirekte Hinweise auf dessen Vorkommen. Ein Vergleich der Aminosäuresequenz des bei Vertebraten beschriebenen Proteins zeigte eine nahezu vollständige Übereinstimmung mit dem *Drosophila*-Protein dCREB-B. Für dieses auch unter dem Namen CREB2 bekannte Protein wurde bereits gezeigt, dass es als cAMP und somit kalziumabhängiger, induzierter Repressor der Transkription fungieren kann (Sakai und Kidokoro, 2002; Yin et al., 1995).

Diese Hypothese stellt lediglich eine Möglichkeit dar, die allerdings nicht wahrscheinlicher oder unwahrscheinlicher als alle anderen erdenkbaren Möglichkeiten ist solange keine Experimentellen Beweise vorliegen. So wäre zum Beispiel auch eine kalziuminduzierte und über cAMP und CREB vermittelte Expressionsteigerung eines "klassischen" Repressors denkbar. Eine Aufklärung dieses Signalweges würde bedeutend zum Verständnis der Regulation von spannungsgesteuerten Kalziumkanälen beitragen, da über diese, wie gezeigt wurde, nur wenig bekannt ist.

5.4 Verhaltensbiologie

Da eine Vielzahl von Mutationen sich direkt auf das Verhalten auswirkt beziehungsweise erst durch Verhaltensauffälligkeiten entdeckt wurden, werden verschiedenste Experimente auch bei *Drosophila melanogaster* durchgeführt. So wurden zum Beispiel Mutationen im *Shaker*-Locus (Catsch, 1948) und noch drei weitere Loci (Kaplan und Trout, 1969) durch Verhaltensauffälligkeiten während einer Ethernarkose entdeckt und anschließend genauer charakterisiert. Mit dem Ziel, die Auswirkung der EKO-Mutation bei einer zeitlich limitierten Kompensation zu untersuchen, wurden Bewegungsanalysen mit Larven durchgeführt.

5.4.1 Bewegungsanalyse

Die Bewegungsanalyse von *Drosophila*-Larven kann seit der Etablierung des DIAS ("dynamic image analysis system") durch Wang et al. (1997) nahezu automatisiert durchgeführt werden.

Dieses kommerzielle System erkennt die Umriss eines Objekts in einer binären Schwarz-Weiß-Bilderfolge. Daraus werden automatisch die Position, die Größe und die Orientierung des Objekts erkannt. Diese Informationen werden dann genutzt, um die Parameter wie zurückgelegte Strecke, mittlere Geschwindigkeit, maximale Geschwindigkeit, Richtungswechsel, Schrittweite und -häufigkeit zu berechnen. Diese Methode hat sich bisher erfolgreich dazu geeignet um Verhaltensveränderungen aufgrund von pharmakologischen Behandlungen (Saraswati et al., 2004) oder bei neuronalen (Suster et al., 2004; Wang et al., 2002, 1997; Xu et al., 2004) und sensorischen Mutanten (Caldwell et al., 2003; Suster und Bate, 2002) zu entdecken und den Verhaltensphänotyp zu charakterisieren. Dazu wurden meist nur einige der von der Software berechneten Parameter untersucht beziehungsweise dargestellt.

Ich habe für die Bewegungsanalyse nicht auf ein solches System zurückgreifen können und habe daher die unter 3.6.1 angegebenen Programme gewählt. Da das von mir benutzte System nicht die gleiche Komplexität aufwies wie das kommerzielle waren auch die auswertbaren Parameter limitiert. Da ich jedoch reine Muskelmutanten und nicht etwa generelle Ionenkanalmutanten (wie in den Arbeiten von Wang et al., 2002, 1997), deren verändertes Genprodukt sich in allen elektrisch erregbaren Geweben wieder findet, untersucht habe, sollten die von mir ermittelten Informationen über die zurückgelegte Strecke, mittlere und maximale Geschwindigkeit hinreichend sein um die Phänotypen der untersuchten Stämme zu charakterisieren.

Die mittlere Geschwindigkeit schwankte bei den in der Literatur angegebenen Daten zwischen 0,75 (Saraswati et al., 2004) und 1,0 mm/s (Caldwell et al., 2003; Wang et al., 2002). Diese lagen im Vergleich zu den von mir bestimmten Werten für die mittlere Geschwindigkeit (0,35 (EKO 222) bis hin zu 0,49 mm/s (Canton S)) deutlich höher. Das war dadurch zu erklären, dass es mit der von mir benutzten Software nicht ohne Informationsverlust möglich war, zwischen Momenten der linearen Bewegung und den Pausen, in denen Suchbewegungen stattfanden, zu unterscheiden. Da das kommerzielle System dazu aber in der Lage war, wurde die Geschwindigkeit hierbei nur aus Phasen der linearen Bewegung ermittelt. Ein weiterer Grund für die Abweichung kann durch die Versuchsbedingungen an sich erklärt werden. Die äußeren Umstände entsprachen zwar im Grunde den in der Literatur angegebenen Daten, was die Behandlung, die Erholungszeit, die Illumination und das Medium betrifft, doch die Tempe-

ratur, die einen entscheidenden Einfluss auf die Aktivität der Tiere hat, lag während der von mir durchgeführten Experimente bei 18° C im Vergleich zu 25° C in der von Caldwell et al. (2003) publizierten Arbeit. Damit ist wahrscheinlich auch die Diskrepanz zwischen der zurückgelegten Wegstrecke zu erklären. Während sich aus den von mir aufgenommenen Daten eine mittlere Wegstrecke von 33 mm ergab, zeigten die bereits publizierten Daten eine erhebliche Spannweite von 45 mm (Saraswati et al., 2004) bis hin zu 100 mm (Caldwell et al., 2003). Lediglich die von mir ermittelten Maximalwerte für die Lokomotionsgeschwindigkeit (1,17 mm/s, Canton S) ähnelten der maximalen Geschwindigkeit der wildtypischen Larven aus der Studie von Suster et al. (2004). Wie aber schon die Streuung der Literaturwerte zeigt, ist es für die Charakterisierung eines Bewegungsphänotyps wichtiger, die Daten eines Experiments untereinander vergleichbar zu halten als der absolute Vergleich mit den bereits publizierten Daten. Beim Vergleich der mittleren Geschwindigkeiten aus den von mir durchgeführten Experimenten zeigte sich ein signifikanter Unterschied zwischen den mutierten Gruppen (EKO-222 und MHC-Gal4) und den wildtypischen Canton S. Gleiches traf auch für die zurückgelegte Wegstrecke zu, während sich bei der maximalen Geschwindigkeit nur noch die Canton S-Larven von den EKO-222-Larven signifikant unterscheiden ließen.

Eine Vermutung hierzu war, dass die mutierten Tiere in der gleichen Zeit weniger Phasen des linearen Laufens zeigten und daher eine verminderte mittlere Geschwindigkeit und Gesamtdistanz zeigten. Dafür spricht auch ein Ausbleiben eines Unterschieds beim Vergleich der maximalen Geschwindigkeit zwischen den Canton S-Tieren und den MHC-Gal4-Mutanten. Der signifikante Unterschied zwischen den Tieren der wildtypischen Kontrolle und der EKO-222-Gruppe ist eventuell durch die Beeinträchtigung der Chordotonalorgane durch den EKO-Kanal gegeben (siehe Abbildung 4.2), die nur bei Expression unter der Kontrolle von 24B-Gal4, nicht aber durch MHC-Gal4 gegeben war. Caldwell et al. (2003) konnte bereits zeigen, dass eine komplette oder teilweise Beeinträchtigung der Funktion der Chordotonalorgane zu mehr oder weniger ausgeprägten Bewegungsdefiziten führte.

5.4.2 Erregungs-Kontraktionskopplung unter kontrollierten Bedingungen

Um die nicht eindeutigen Ergebnisse der Bewegungsanalyse zu hinterfragen und um gleichzeitig festzustellen, ob sich Unterschiede in den kontraktile Fähigkeiten zwischen den MHC-Gal4-Mutanten und den anderen beiden, im vorangegangenen Experiment untersuchten Gruppen (Canton S und EKO-222) ergeben, wurden erneut Kontraktionsmessungen durchgeführt. Da aber keine Informationen über etwaige kompensatorische synaptische Veränderungen bei den induzierten (MHC-Gal4) Mutanten vorlagen (im Gegensatz zu den EKO-222 (siehe White et al., 2001)), wurde eine Methode entwickelt die es erlaubte graduelle Kontraktionen unabhängig von einer synaptischen Übertragung zu evozieren.

Im Modus der Spannungsklemme wurde das Membranpotenzial einer einzelnen Muskelfaser kontrolliert und daraufhin definierte Potenziale angesprungen. Die Voraussetzungen für eine akkurat durchgeführte Spannungsklemme waren eine im Vergleich zur Muskelfaser niedrige Streukapazität des Systems und eine große Längskonstante der Muskelfaser. Waren beide Bedingungen erfüllt, konnte man davon ausgehen, dass sogenannte "Space-Clamp" Probleme, bei denen nur Teile der Zelle kontrolliert wurden, nicht vorlagen. Eigene Experimente zeigten zudem, dass der Spannungsabfalls über die komplette Länge des Muskels lediglich zwischen 5 und 10 % betrug. Dies deckte sich mit den von Jan und Jan (1976b) errechneten Daten zur Längskonstante, die mit 2 beziehungsweise 4 mm deutlich über der Muskellänge von circa 400 μm lag. Aus der gleichen Arbeit, sowie aus eigenen Messungen ergaben sich Membrankapazitäten zwischen 2 und 6 nF, was ebenfalls deutlich über der oben erwähnten Streukapazität des Systems liegt.

Die Beziehung zwischen Membranpotential und Kraftentwicklung (Kontraktion) der untersuchten Muskelfaser folgte einem sigmoiden Verlauf. Eine derartige Beziehung zwischen Kraft und Membranpotential wurde auch schon in anderen Systemen beschrieben (Meerassel: (Weiss et al., 2001), Seepocke: (Atwater et al., 1974), Flusskreb: (Dudel et al., 1968)). Während die Daten aus der Publikation von Weiss et al. (2001) aus Experimenten mit der Zweielektroden-Spannungsklemme stammten, wurde das Membranpotential in den von mir durchgeführ-

ten Versuchen mit der Einzelelektroden-Spannungsklemme kontrolliert. Die Zweielektroden-Spannungsklemme ist der Variante mit nur einer Elektrode aus mehreren Gründen überlegen: Zum einen wird kontinuierlich Strom injiziert und das Membranpotential gemessen was bedeutet, dass nicht zwischen beiden Modi gewechselt werden muss, wie es bei der Einzelelektroden-Spannungsklemme der Fall ist. Gerade der schnelle Wechsel dieser Operationsmodi bedingt hierbei die eingeschränkte Kontrolle schneller Ströme. Zudem kann mit der Zweielektrodenklemme in der Regel mehr Strom injiziert werden und somit auch das Membranpotential großer Zellen wie zum Beispiel Muskelfasern über einen weiten Bereich hinweg kontrolliert werden. Dass sich die Ergebnisse meiner Versuche und der von Weiss et al. (2001) dargestellten Ergebnisse in ihrem Verlauf und ihrer Aussage entsprachen, spricht für die Güte der von mir eingesetzten Einzelelektroden-Spannungsklemme. Die Kontraktionsmessungen zeigten eine deutliche Streuung schon innerhalb einer Versuchstiergruppe. Diese Variation der Kontraktionskräfte wurde sowohl in dieser Arbeit (Abbildung 4.4) als auch in anderen Studien (Rose et al., 2007, 2001; Weiss et al., 2001) gezeigt. In der letztgenannten Arbeit traten sogar Variationen der Muskelkraft von 1,5 bis zu 315 μN auf. Die Gründe für diese Variabilität sind weitestgehend unbekannt, könnten jedoch, die auch bei den Messungen der Kalziumströme beobachtete, Variabilität widerspiegeln. Zum anderen könnten auch verschiedene Modulationsszustände der Muskulatur durch Neuromodulatoren wie zum Beispiel Octopamin für die Unterschiedlichkeit der gemessenen Kräfte verantwortlich sein. Von mir durchgeführte, aber bislang nicht publizierte Ergebnisse, zeigten bei Anwendung dieser Methode, eine deutliche Kraftsteigerung der gemessenen Kontraktionen durch Octopamin. Ein vergleichbarer Effekt von Octopamin konnte auch in anderen Studien bereits gezeigt werden (Middleton et al., 2006; Zumstein et al., 2004). Ein Bezug der Kontraktionskräfte auf die Muskelfasermembran Kapazität (wie es zum Beispiel bei der Messung von transmembranen Ionenströmen gemacht wird (vergleiche zum Beispiel: Gielow et al., 1995)) zeigte weder eine Verkleinerung der Streuung der Daten noch eine eindeutige Korrelation zwischen beiden Parametern. Dies verdeutlicht, dass der Einstrom von extrazellulärem Kalzium durch die spannungsabhängigen Ionenkanäle zwar ausschlaggebend ist um eine Kontraktion auszulösen (wie es bei Weiss et al., 2001, gezeigt wurde), aber die anschließende Signalkaskade mit der kalziuminduzierten Freiset-

zung von Kalzium aus dem sarkoplasmatischen Retikulum eine gleichfalls essentielle Bedeutung hat. Dieser Teil der Erregungs-Kontraktionskopplung hat somit unabhängig vom Kalziumstrom durch die spannungsabhängigen Kanäle einen Einfluss auf die muskuläre Kontraktion (siehe zum Beispiel Bers, 2002; Fleischer und Inui, 1989). Also wurden, die Werte für die Kraft normiert, indem sie auf den Maximalwert der Kontraktionskraft (bei +20 mV, siehe Abbildung 4.27) bezogen wurden um sie untereinander vergleichbarer zu machen. Dadurch war es dann auch möglich die Daten durch ein sigmoides, durch die Boltzmann-Gleichung beschriebenes, Regressionsmodell anzunähern. Die aus dieser Gleichung berechneten Parameter dienten nun zum Vergleich der kontraktiven Eigenschaften der drei Versuchstiergruppen.

Im Modus der Spannungsklemme sollten alle auftretenden Ströme gleichermaßen kompensiert werden. Dies hätte zur Folge, dass das Membranpotenzial trotz auswärtsgerichteter Kaliumströme auf das jeweilige Niveau geklemmt würde. Das wiederum hätte auch eine Aktivierung der Kalziumkanäle mit einem definierten Kalziumeinstrom zur Folge, der wiederum eine Kontraktion auslösen würde. Im Vergleich mit den oben bereits erwähnten Versuchsreihen mit den Tieren der Gruppe Canton S wurde zum Beispiel ein nahezu identischer Wert für $V_{M0,5}$ bestimmt. Das bestätigte die Wiederholbarkeit der Experimente und die Vergleichbarkeit der Ergebnisse. Für die hier untersuchten Gruppen wäre demnach zu erwarten gewesen, dass auch der Effekt der EKO-Kanäle beziehungsweise der dadurch verursachten Ströme, durch die Spannungsklemme kompensiert werden sollten. Weil die MHC-Gal4-Tiere nur eine limitierte Zeitspanne für eine kompensatorische Erhöhung des Kalziumstromes zur Verfügung hatten, sollte dieser Strom demnach weitestgehend dem der Wildtypen entsprechen. In der hier durchgeführten Versuchsreihe sollten die Werte der MHC-Gal4- und der Canton S-Gruppe daher auf einem Niveau liegen, da die Kontraktionskraft, -schwelle und -kinetik erstrangig durch die spannungsabhängigen Kalziumkanäle bedingt wird. Die Ergebnisse aus der Messung der Kalziumströme mittels der Zweielektroden-Spannungsklemme zeigten ein in negative Richtung verschobenes Maximum der I/V-Kurve und eine deutliche generelle Erhöhung der Amplitude bei den Tieren der EKO-222 Gruppe. Daher war zu erwarten, dass die Kurve, die sich aus den Daten dieser Gruppe ergäbe, auch in weniger depolarisierte Richtung verschoben sein würde. Die Ergebnisse jedoch zeigten, eine Verschiebung der Daten und somit auch der Regressions-

modelle für die MHC-Gal4 Tiere in positive Richtung und eine nur teilweise Verlagerung der Daten in negative Richtung für die EKO. Dies legte den Verdacht nahe, dass die Klemme nicht ausreichte um den extrem starken EKO-Strom vollständig zu kompensieren. Um diesen Verdacht zu untermauern, wurden die Ströme untersucht, die notwendig waren um die Muskelfasern auf ein Potenzial von -20 mV zu klemmen. Hier sollte der EKO-Strom bereits deutlich aktiviert sein ohne, dass allzu große Kontraktionen ausgelöst würden. Diese gemessenen Ströme oder besser die Stromdichten waren ein Maß für den durch den EKO-Kanal verursachten Effekt. Im Vergleich zu den Canton S waren diese bei den MHC-Gal4-Tieren immerhin mehr als doppelt so groß und bei den EKO-222-Tieren mehr als viermal so groß. Da der EKO-Kanal bereits ab einem Membranpotential von -60 mV aktiviert wurde, spielte eine gesteigerte Ruheleitfähigkeit bei diesen Messungen eine untergeordnete Rolle. Die Amplitude des injizierten Stroms, der zum Erreichen eines Membranpotentials von -20 mV notwendig war, unterschied sich bei den EKO-222-Tieren von den MHC-Gal4 Tieren aufgrund verschiedener Expressionsstärken der verschiedenen Treiberlinien (vergleiche: Osterwalder et al., 2001; White et al., 2001). Kalziumströme hingegen waren nicht messbar, weil es durch die in der Badlösung gelösten Kalziumionen zu einer schnellen, kalziuminduzierten Inaktivierung der Kalziumkanäle kam, die mit der Einzelelektroden-Spannungsklemme nicht aufgelöst werden konnte. Insgesamt wurde durch diese Ergebnisse also der Verdacht, dass die Klemme nicht ausreichend war, um den EKO-Strom zu kompensieren, erhärtet. Wenn der EKO-Strom nicht mehr sauber geklemmt werden konnte, wurde auch nicht das gewünschte Membranpotential erreicht. Demnach wurden weniger spannungsabhängige Kalziumkanäle aktiviert, was einen geringeren Kalziumeinstrom mit dementsprechend schwächeren Kontraktionen zur Folge hatte. Daher wurde der Wert für $V_{M0,5}$ bei den MHC-Gal4 Tieren deutlich in positive Richtung verschoben. Aufgrund der Kompensation durch einen, in der Amplitude gesteigerten Kalziumstrom bei EKO-222-Tieren hingegen, waren die Kontraktionen nicht so drastisch beeinträchtigt. Neben diesen Effekten waren bei einer relativen Kontraktionsstärke in dem Bereich zwischen 0,4 und 0,6 deutliche Einbrüche in den Kontraktionen bei beiden Mutantengruppen zu erkennen. Das deutet darauf hin, dass durch die zunehmenden Kontraktionen, sich wahrscheinlich auch das dadurch verursachte Leck in der Muskelfasermembran vergrößerte. Dies hätte dann

für eine zusätzliche Verschlechterung der Spannungsklemme gesorgt, die bei den wildtypischen Canton S allerdings noch ausreichend gut war um das Membranpotential der Faser zu kontrollieren.

Obwohl in den Daten der zu erwartende Trend zumindest in Teilen widergespiegelt wurde und auch die statistische Überprüfung der $V_{M0,5}$ -Werte eine hohe Signifikanz aufwies, sind die Ergebnisse aufgrund der hier dargestellten Einschränkungen mit Vorsicht zu betrachten.

5.4.3 Lokalisation der Kalziumkanäle

Um die Kalziumkanäle zu lokalisieren und in weiteren Schritten zu quantifizieren, wurden Antikörperfärbungen gemacht. Der verwendete Antikörper wurde bereits erfolgreich verwendet, um α -Untereinheiten von Kalziumkanälen auf den malpighischen Gefäßen zu lokalisieren (MacPherson et al., 2001). Außer dieser Studie gab es keinen Hinweis auf kommerziell erhältliche Antikörper, die spezifisch gegen Kalziumkanäle gerichtet sind und bei *Drosophila melanogaster* angewendet wurden. Wie die Auswertung der so erhaltenen Färbungen zeigte (vergleiche Abbildung 4.33 und 4.34), waren die Ergebnisse derart inkonsistent, dass eine Quantifizierung unmöglich war. Während das in Abbildung 4.33 zu Tage getretene Muster eine Verteilung der Kanäle auf den sarkoplasmatischen Retikuli (Längstreifen) und den T-Tubuli (Querstreifung) andeutete, wiesen die anderen Färbungen eher auf ein Verteilung wie die in Rose et al. (2007) dargestellte Verteilung für einen Chloridionenkanal oder die immunozytochemische Lokalisation der mit den α -Untereinheiten aggregierten β -Untereinheiten bei Kaninchenmyozyten (Gao et al., 1997) hin. Der Grund für die Unterschiedlichkeit der Ergebnisse ist wahrscheinlich mit einer variierenden Eindringtiefe des Erst- und/oder Zweitantikörpers zu sehen. Da keine noch konstanteren Versuchsbedingungen, die auch nur eventuell zu einem besseren beziehungsweise konsistenteren Ergebnis geführt hätten, eingestellt werden konnten, wurde dieses Experiment nach einigen Versuchsreihen ohne eindeutige Aussagekraft beendet.

Eine deutliche Verbesserung könnte durch eine speziell gegen *Drosophila*-Kalziumkanäle gerichteten Antikörper mit bestätigter Reaktivität erbracht werden, der, wie bereits erwähnt, noch nicht kommerziell erhältlich ist und erst noch erzeugt werden müsste. Dieser zeit- und

geldaufwändige Prozess hätte die Aussagekraft der Ergebnisse bei weitem überstiegen und wurde daher nicht weiter in Betracht gezogen.

6 Literaturverzeichnis

Adams, M.; Celniker, S.; Holt, R.; Evans, C.; Gocayne, J.; Amanatides, P.; Scherer, S.; Li, P.; Hoskins, R.; Galle, R.; et al., 2000. The Genome Sequence of *Drosophila melanogaster*. *Science* 287 (5461), 2185.

Apostolakos, M.; Schuermann, W.; Frampton, M.; Utell, M.; Willey, J., 1993. Measurement of gene expression by multiplex competitive polymerase chain reaction. *Anal Biochem* 213 (2), 277–84.

Atwater, I.; Rojas, E.; Vergara, J., 1974. Calcium influxes and tension development in perfused single barnacle muscle fibres under membrane potential control. *The Journal of Physiology* 243 (2), 523–551.

Barclay, J.; Atwood, H.; Robertson, M., 2002. Impairment of central pattern generation in *Drosophila* cysteine string protein mutants. *Journal of Comparative Physiology A: Sensory, Neural, and Behavioral Physiology* 188 (1), 71–78.

Baro, D.; Levini, R.; Kim, M.; Willms, A.; Lanning, C.; Rodriguez, H.; Harris-Warrick, R., 1997. Quantitative Single-Cell-Reverse Transcription-PCR Demonstrates That A-Current Magnitude Varies as a Linear Function of *shal* Gene Expression in Identified Stomatogastric Neurons. *Journal of Neuroscience* 17 (17), 6597.

Begenisich, T., 1983. Hydrogen ion block of the sodium pore in squid giant axons. *The Journal of General Physiology* 82 (5), 599–618.

Beramendi, A.; Peron, S.; Megighian, A.; Reggiani, C.; Cantera, R., 2005. The

inhibitor[κ]B-ortholog Cactus is necessary for normal neuromuscular function in *Drosophila melanogaster*. *Neuroscience* **134** (2), 397–406.

Bernstein, S.; Hansen, C.; Becker, K.; Wassenberg, D.; Roche, E.; Donady, J.; Emerson Jr, C., 1986. Alternative RNA splicing generates transcripts encoding a thorax-specific isoform of *Drosophila melanogaster* myosin heavy chain. *Molecular and Cellular Biology* **6** (7), 2511–9.

Bers, D., 2002. Cardiac excitation- contraction coupling. *Nature* **415**, 198–205.

Betz, A.; Lampen, N.; Martinek, S.; Young, M.; Darnell Jr, J., 2001. A *Drosophila* PIAS homologue negatively regulates stat92E. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **98** (17), 9563.

Bhattacharya, A.; Gu, G.; Singh, S., 1999. Modulation of dihydropyridine-sensitive calcium channels in *Drosophila* by a cAMP-mediated pathway. *Journal of Neurobiology* **39** (4), 491–500.

Bichet, D.; Cornet, V.; Geib, S.; Carlier, E.; Volsen, S.; Hoshi, T.; Mori, Y.; De Waard, M., 2000. The I-II Loop of the Ca²⁺ Channel α 1 Subunit Contains an Endoplasmic Reticulum Retention Signal Antagonized by the β Subunit. *Neuron* **25** (1), 177–190.

Brand, A.; Perrimon, N., 1993. Targeted gene expression as a means of altering cell fates and generating dominant phenotypes. *Development* **118**, 401–415.

Brose, N.; Petrenko, A.; Sudhof, T.; Jahn, R., 1992. Synaptotagmin: a calcium sensor on the synaptic vesicle surface. *Science* **256** (5059), 1021–1025.

Budnik, V.; Zhong, Y.; Wu, C., 1990. Morphological plasticity of motor axons in *Drosophila* mutants with altered excitability. *Journal of Neuroscience* **10** (11), 3754.

Burgoyne, R.; Weiss, J., 2001. The neuronal calcium sensor family of Ca²⁺-binding proteins. *The Biochemical Journal* **353**, 1–12.

-
- Caldwell, J.; Miller, M.; Wing, S.; Soll, D.; Eberl, D.**, 2003. Dynamic analysis of larval locomotion in *Drosophila* chordotonal organ mutants. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **100** (26), 16053–16058.
- Cannon, W.**, 1929. ORGANIZATION FOR PHYSIOLOGICAL HOMEOSTASIS. *Physiological Reviews* **9** (3), 399–431.
- Catsch, A.**, 1948. Eine Erbliche Störung Des Bewegungsmechanismus Bei *Drosophila Melanogaster*. *Molecular Genetics and Genomics* **82** (1), 64–66.
- Cattaert, D.; Birman, S.**, 2001. Blockade of the central generator of locomotor rhythm by noncompetitive NMDA receptor antagonists in *Drosophila* larvae. *Journal of Neurobiology* **48** (1), 58–73.
- Catterall, W.**, 2000. Structure and regulation of voltage-gated Ca^{2+} channels. *Annual Review of Cell and Developmental Biology* **16**, 521–555.
- Chin, D.; Means, A.**, 2000. Calmodulin: a prototypical calcium sensor. *Trends in Cell Biology* **10** (8), 322–328.
- Davis, G.; Bezprozvanny, I.**, 2001. MAINTAINING THE STABILITY OF NEURAL FUNCTION: A Homeostatic Hypothesis. *Annual Review of Physiology* **63** (1), 847–869.
- Davis, G.; Goodman, C.**, 1998. Genetic analysis of synaptic development and plasticity: homeostatic regulation of synaptic efficacy. *Current Opinion in Neurobiology* **8** (1), 149–156.
- Desai, N.; Rutherford, L.; Turrigiano, G.**, 1999. Plasticity in the intrinsic excitability of cortical pyramidal neurons. *Nature Neuroscience* **2** (6), 515–20.
- Dudek, S.; Bear, M.**, 1992. Homosynaptic long-term depression in area CA1 of hippocampus and effects of N-methyl-D-aspartate receptor blockade. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **89** (10), 4363.

- Dudel, J.; Morad, M.; Rüdell, R.**, 1968. Contractions of single crayfish muscle fibers induced by controlled changes of membrane potential. *Pflügers Archiv European Journal of Physiology* **299** (1), 38–51.
- Duffy, J.**, 2002. GAL4 system in Drosophila: a fly geneticist's Swiss army knife. *Genesis* **34** (1-2), 1–15.
- Eberl, D.; Ren, D.; Feng, G.; Lorenz, L.; Van Vactor, D.; Hall, L.**, 1998. Genetic and Developmental Characterization of Dmca1D, a Calcium Channel α 1 Subunit Gene in Drosophila melanogaster. *Genetics* **148** (3), 1159–1169.
- Eckert, R.; Randall, D.; Burggren, W.; French, K.**, 2000. Tierphysiologie 3. Auflage 2000.
- Fleischer, S.; Inui, M.**, 1989. Biochemistry and Biophysics of Excitation-Contraction Coupling. *Annual Review of Biophysics and Biophysical Chemistry* **18** (1), 333–364.
- Foster, W.; Ungar, L.; Schwaber, J.**, 1993. Significance of conductances in Hodgkin-Huxley models. *Journal of Neurophysiology* **70** (6), 2502–2518.
- Fox, L.; Soll, D.; Wu, C.**, 2006. Coordination and Modulation of Locomotion Pattern Generators in Drosophila Larvae: Effects of Altered Biogenic Amine Levels by the Tyramine beta Hydroxylase Mutation. *Journal of Neuroscience* **26** (5), 1486.
- Freeman, W.; Walker, S.; Vrana, K.**, 1999. Quantitative RT-PCR: pitfalls and potential. *Biotechniques* **26** (1), 112–122.
- Gao, T.; Puri, T.; Gerhardstein, B.; Chien, A.; Green, R.; Hosey, M.**, 1997. Identification and Subcellular Localization of the Subunits of L-type Calcium Channels and Adenylyl Cyclase in Cardiac Myocytes. *Journal of Biological Chemistry* **272** (31), 19401–19407.
- Gielow, M.; Gu, G.; Singh, S.**, 1995. Resolution and pharmacological analysis of the voltage-dependent calcium channels of Drosophila larval muscles. *Journal of Neuroscience* **15** (9), 6085.

-
- Gim, B.; Park, J.; Yoon, J.; Kang, C.; Kim, Y.**, 2001. *Drosophila* Med6 is required for elevated expression of a large but distinct set of developmentally regulated genes. *Molecular and Cellular Biology* **21** (15), 5242–5255.
- Goldman, M.; Golowasch, J.; Marder, E.; Abbott, L.**, 2001. Global Structure, Robustness, and Modulation of Neuronal Models. *Journal of Neuroscience* **21** (14), 5229.
- Golowasch, J.; Goldman, M.; Abbott, L.; Marder, E.**, 2002. Failure of Averaging in the Construction of a Conductance-Based Neuron Model. *Journal of Neurophysiology* **87** (2), 1129–1131.
- Gregg, R.; Messing, A.; Strube, C.; Beurg, M.; Moss, R.; Behan, M.; Sukhareva, M.; Haynes, S.; Powell, J.; Coronado, R.; et al.**, 1996. Absence of the beta subunit (cchb1) of the skeletal muscle dihydropyridine receptor alters expression of the alpha 1 subunit and eliminates excitation-contraction coupling. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **93** (24), 13961.
- Haghighi, A.; McCabe, B.; Fetter, R.; Palmer, J.; Hom, S.; Goodman, C.**, 2003. Retrograde Control of Synaptic Transmission by Postsynaptic CaMKII at the *Drosophila* Neuromuscular Junction. *Neuron* **39** (2), 255–267.
- Hanwell, D.; Ishikawa, T.; Saleki, R.; Rotin, D.**, 2002. Trafficking and Cell Surface Stability of the Epithelial Na⁺ Channel Expressed in Epithelial Madin-Darby Canine Kidney Cells. *Journal of Biological Chemistry* **277** (12), 9772–9779.
- Haugland, F.; Wu, C.**, 1990. A voltage-clamp analysis of gene-dosage effects of the Shaker locus on larval muscle potassium currents in *Drosophila*. *Journal of Neuroscience* **10** (4), 1357.
- Hebb, D.**, 1949. The organization of behavior: A neuropsychological Theory. *New York: John Wiley&Sons* .
- Hewes, R.; Snowdeal III, E.; Saitoe, M.; Taghert, P.**, 1998. Functional Redundancy of

- FMRamide-Related Peptides at the *Drosophila* Larval Neuromuscular Junction. *Journal of Neuroscience* **18** (18), 7138.
- Hille, B.**, 2001. Ion channels of excitable membranes, 3. Auflage. Sinauer Sunderland, Massachusetts.
- Hoang, B.; Chiba, A.**, 2001. Single-Cell Analysis of *Drosophila* Larval Neuromuscular Synapses. *Developmental Biology* **229** (1), 55–70.
- Iijima, T.; Ciani, S.; Hagiwara, S.**, 1986. Effects of the External pH on Ca Channels: Experimental Studies and Theoretical Considerations Using a Two-Site, Two-Ion Model. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **83** (3), 654–658.
- Jan, L.; Jan, Y.**, 1976a. L-Glutamate as an excitatory transmitter at the *Drosophila* larval neuromuscular junction. *Journal of Physiology* **262**, 215–236.
- Jan, L.; Jan, Y.**, 1976b. Properties of the larval neuromuscular junction in *Drosophila melanogaster*. *Journal of Physiology* **262**, 189–214.
- Josephson, I.; Varadi, G.**, 1996. The beta subunit increases Ca²⁺ currents and gating charge movements of human cardiac L-type Ca²⁺ channels. *Biophysical Journal* **70** (3), 1285–1293.
- Jugloff, D.; Khanna, R.; Schlichter, L.; Jones, O.**, 2000. Internalization of the Kv1.4 Potassium Channel Is Suppressed by Clustering Interactions with PSD-95. *Journal of Biological Chemistry* **275** (2), 1357–1364.
- Kaplan, W.; Trout, W.**, 1969. THE BEHAVIOR OF FOUR NEUROLOGICAL MUTANTS OF *DROSOPHILA*. *Genetics* **61** (2), 399–409.
- Katz, B.; Thesleff, S.**, 1957. On the factors which determine the amplitude of the miniature end-plate potential. *The Journal of Physiology* **137** (2), 267.
- Kim, H.; Kim, J.; Lee, Y.; Yang, J.; Han, K.**, 2006. Transcriptional regulation of the methuselah gene by dorsal protein in *Drosophila melanogaster*. *Molecules and Cells* **21** (2), 261–8.

-
- Klockner, U.**, 1994. Intracellular pH modulates the availability of vascular L-type Ca^{2+} channels. *The Journal of General Physiology* **103** (4), 647–663.
- Li, H.; Peng, X.; Cooper, R.**, 2002. Development of *Drosophila* larval neuromuscular junctions: maintaining synaptic strength. *Neuroscience* **115** (2), 505–513.
- Littleton, J.; Ganetzky, B.**, 2000. Ion Channels and Synaptic Organization Analysis of the *Drosophila* Genome. *Neuron* **26** (1), 35–43.
- Liu, Z.; Golowasch, J.; Marder, E.; Abbott, L.**, 1998. A Model Neuron with Activity-Dependent Conductances Regulated by Multiple Calcium Sensors. *Journal of Neuroscience* **18** (7), 2309.
- Lnenicka, G.; Mellon, D.**, 1983. Changes in electrical properties and quantal content of identified musclefibres in the crayfish. *Journal of Physiology* **345**, 261–284.
- MacLean, J.; Zhang, Y.; Johnson, B.; Harris-Warrick, R.**, 2003. Activity-Independent Homeostasis in Rhythmically Active Neurons. *Neuron* **37** (1), 109–120.
- MacPherson, M.; Pollock, V.; Broderick, K.; Kean, L.; O’Connell, F.; Dow, J.; Davies, S.**, 2001. Model organisms: new insights into ion channel and transporter function: L-type calcium channels regulate epithelial fluid transport in *Drosophila melanogaster*. *American Journal of Physiology. Cell Physiology* **280**, C394–C407.
- Marder, E.; Goaillard, J.**, 2006. Variability, compensation and homeostasis in neuron and network function. *Nature Reviews Neuroscience* **7** (7), 563–74.
- Marrus, S.; DiAntonio, A.**, 2005. Investigating the safety factor at an invertebrate neuromuscular junction. *Journal of Neurobiology* **63** (1), 62–69.
- McCabe, B.; Marqués, G.; Haghighi, A.; Fetter, R.; Crotty, M.; Haerry, T.; Goodman, C.; O’Connor, M.**, 2003. The BMP Homolog *Gbb* Provides a Retrograde Signal that Regulates Synaptic Growth at the *Drosophila* Neuromuscular Junction. *Neuron* **39** (2), 241–254.

- Mee, C.; Pym, E.; Moffat, K.; Baines, R.**, 2004. Regulation of Neuronal Excitability through Pumilio-Dependent Control of a Sodium Channel Gene. *Journal of Neuroscience* 24 (40), 8695.
- Middleton, C.; Nongthomba, U.; Parry, K.; Sweeney, S.; Sparrow, J.; Elliott, C.**, 2006. Neuromuscular organization and aminergic modulation of contractions in the *Drosophila* ovary. *BMC Biol* 4 (1), 17.
- Mioduszevska, B.; Jaworski, J.; Kaczmarek, L.**, 2003. Inducible cAMP early repressor (ICER) in the nervous system—a transcriptional regulator of neuronal plasticity and programmed cell death. *Journal of Neurochemistry* 87 (6), 1313–20.
- Mülhardt, C.**, 2002. *Der Experimentator: Molekularbiologie, Genomics*, 5. Auflage. Spektrum, Akademischer Verlag.
- Mullis, K.; Falloona, F.**, 1987. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods in enzymology* 155, 335–350.
- O'Brien, R.; Kamboj, S.; Ehlers, M.; Rosen, K.; Fischbach, G.; Huganir, R.**, 1998. Activity-dependent modulation of synaptic AMPA receptor accumulation. *Neuron* 21 (5), 1067–78.
- O'Connell, P.; Rosbash, M.**, 1984. Sequence, structure, and codon preference of the *Drosophila* ribosomal protein 49 gene. *Nucleic Acids Research* 12 (13), 5495–5513.
- Osterwalder, T.; Yoon, K.; White, B.; Keshishian, H.**, 2001. A conditional tissue-specific transgene expression system using inducible GAL4. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 98 (22), 12596.
- Paradis, S.; Sweeney, S.; Davis, G.**, 2001. Homeostatic Control of Presynaptic Release Is Triggered by Postsynaptic Membrane Depolarization. *Neuron* 30 (3), 737–749.
- Pastalkova, E.; Serrano, P.; Pinkhasova, D.; Wallace, E.; Fenton, A.; Sacktor, T.**, 2006. Storage of Spatial Information by the Maintenance Mechanism of LTP. *Science* 313 (5790), 1141–1144.

-
- Petersen, S.; Fetter, R.; Noordermeer, J.; Goodman, C.; DiAntonio, A.**, 1997. Genetic Analysis of Glutamate Receptors in *Drosophila* Reveals a Retrograde Signal Regulating Presynaptic Transmitter Release. *Neuron* **19** (6), 1237–1248.
- Petersen, S.; Fetter, R.; Noordermeer, J.; Goodman, C.; DiAntonio, A.**, 2004. Genetic Analysis of Glutamate Receptors in *Drosophila* Reveals a Retrograde Signal Regulating Presynaptic Transmitter Release. *Current Biology* **14** (11), R413–R415.
- Prinz, A.; Bucher, D.; Marder, E.**, 2004. Similar network activity from disparate circuit parameters. *Nature Neuroscience* **7** (12), 1345–1352.
- Ren, D.; Xu, H.; Eberl, D.; Chopra, M.; Hall, L.**, 1998. A Mutation Affecting Dihydropyridine-Sensitive Current Levels and Activation Kinetics in *Drosophila* Muscle and Mammalian Heart Calcium Channels. *Journal of Neuroscience* **18** (7), 2335.
- Rose, U.; Derst, C.; Wanischek, M.; Marinc, C.; Walther, C.**, 2007. Properties and possible function of a hyperpolarisation-activated chloride current in *Drosophila*. *Journal of Experimental Biology* **210** (14), 2489.
- Rose, U.; Ferber, M.; Hustert, R.**, 2001. Maturation of muscle properties and its hormonal control in an adult insect. *Journal of Experimental Biology* **204** (20), 3531–3545.
- Sakai, T.; Kidokoro, Y.**, 2002. Overexpression of a CREB Repressor Isoform Enhances the Female Sexual Receptivity in *Drosophila*. *Behavior Genetics* **32** (6), 413–422.
- Saraswati, S.; Fox, L.; Soll, D.; Wu, C.**, 2004. Tyramine and octopamine have opposite effects on the locomotion of *Drosophila* larvae. *Journal of Neurobiology* **58** (4), 425–41.
- Sassone-Corsi, P.**, 1995. TRANSCRIPTION FACTORS RESPONSIVE TO CAMP. *Annual review of cell biology* **11**, 355–377.
- Schulz, D.; Baines, R.; Hempel, C.; Li, L.; Liss, B.; Misonou, H.**, 2006. Cellular Excitability and the Regulation of Functional Neuronal Identity: From Gene Expression to Neuromodulation. *Journal of Neuroscience* **26** (41), 10362.

- Singh, S.**, 1990. Properties of potassium currents and their role in membrane excitability in *Drosophila* larval muscle fibers. *Journal of Experimental Biology* **152** (1), 59–76.
- Singh, S.; Wu, C.**, 1989. Complete separation of four potassium currents in *Drosophila*. *Neuron* **2** (4), 1325–9.
- Smith, L.; Wang, X.; Peixoto, A.; Neumann, E.; Hall, L.; Hall, J.**, 1996. A *Drosophila* calcium channel $\alpha 1$ subunit gene maps to a genetic locus associated with behavioral and visual defects. *Journal of Neuroscience* **16** (24), 7868–7879.
- Song, W.**, 2002. Genes responsible for native depolarization-activated K^+ currents in neurons. *Neuroscience Research* **42** (1), 7–14.
- Souaze, F.; Ntodou-Thome, A.; Tran, C.; Rostene, W.; Forgez, P.**, 1996. Quantitative RT-PCR: limits and accuracy. *Biotechniques* **21** (2), 280–5.
- Sun, X.; Tso, J.; Lis, J.; Wu, R.**, 1988. Differential regulation of the two glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase genes during *Drosophila* development. *Molecular and Cellular Biology* **8** (12), 5200.
- Suster, M.; Bate, M.**, 2002. Embryonic assembly of a central pattern generator without sensory input. *Nature* **416** (6877), 174–8.
- Suster, M.; Karunanithi, S.; Atwood, H.; Sokolowski, M.**, 2004. Turning behavior in *Drosophila* larvae: a role for the small scribbler transcript. *Genes, Brain and Behavior* **3** (5), 273–286.
- Swensen, A.; Bean, B.**, 2003. Ionic Mechanisms of Burst Firing in Dissociated Purkinje Neurons. *Journal of Neuroscience* **23** (29), 9650.
- Tejedor, F.; Bokhari, A.; Rogero, O.; Gorczyca, M.; Zhang, J.; Kim, E.; Sheng, M.; Budnik, V.**, 1997. Essential Role for *dlg* in Synaptic Clustering of Shaker K^+ Channels In Vivo. *Journal of Neuroscience* **17** (1), 152.

-
- Tkatch, T.; Baranauskas, G.; Surmeier, D.**, 2000. Kv4. 2 mRNA abundance and A-type K current amplitude are linearly related in basal ganglia and basal forebrain neurons. *Journal of Neuroscience* **20**, 579–588.
- Trimmer, J.**, 1998. Regulation of ion channel expression by cytoplasmic subunits. *Current Opinion in Neurobiology* **8** (3), 370–374.
- Tso, J.; Sun, X.; Wu, R.**, 1985. Structure of two unlinked *Drosophila melanogaster* glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase genes. *Journal of Biological Chemistry* **260** (13), 8220–8228.
- Turrigiano, G.**, 1999. Homeostatic plasticity in neuronal networks: the more things change, the more they stay the same. *Trends in Neurosciences* **22** (5), 221–227.
- Turrigiano, G.; Leslie, K.; Desai, N.; Rutherford, L.; Nelson, S.**, 1998. Activity-dependent scaling of quantal amplitude in neocortical neurons. *Nature* **391** (6670), 892–6.
- Turrigiano, G.; Nelson, S.**, 2000. Hebb and homeostasis in neuronal plasticity. *Current Opinion in Neurobiology* **10** (3), 358–364.
- Turrigiano, G.; Nelson, S.**, 2004. Homeostatic plasticity in the developing nervous system. *Nature Reviews Neuroscience* **5** (2), 97–107.
- Wang, J.; Soll, D.; Wu, C.**, 2002. Morphometric Description of the Wandering Behavior in *Drosophila* Larvae: A Phenotypic Analysis of K⁺ Channel Mutants. *Journal of Neurogenetics* **16** (1), 45–63.
- Wang, J.; Sylwester, A.; Reed, D.; Wu, D.; Soll, D.; Wu, C.**, 1997. Morphometric description of the wandering behavior in *Drosophila* larvae: aberrant locomotion in Na⁺ and K⁺ channel mutants revealed by computer-assisted motion analysis. *Journal of Neurogenetics* **11** (3-4), 231–54.
- Weiss, T.; Erxleben, C.; Rathmayer, W.**, 2001. Voltage-clamp analysis of membrane currents and excitation–contraction coupling in a crustacean muscle. *Journal of Muscle Research and Cell Motility* **22** (4), 329–344.

- West, A.; Chen, W.; Dalva, M.; Dolmetsch, R.; Kornhauser, J.; Shaywitz, A.; Takasu, M.; Tao, X.; Greenberg, M.**, 2001. Calcium regulation of neuronal gene expression. *Proceedings of the National Academy of Science* **98** (20), 11024–11031.
- White, B. H.; Osterwalder, T. P.; Yoon, K. S.; Joiner, W. J.; Whim, M. D.; Kaczmarek, L. K.; Keshishian, H.**, 2001. Targeted Attenuation of Electrical Activity in *Drosophila* Using a Genetically Modified K⁺ Channel. *Neuron* **31** (5), 699–711.
- Whitlock, J.; Heynen, A.; Shuler, M.; Bear, M.**, 2006. Learning Induces Long-Term Potentiation in the Hippocampus. *Science* **313** (5790), 1093–1097.
- Wickman, K.; Nemeč, J.; Gendler, S.; Clapham, D.**, 1998. Abnormal Heart Rate Regulation in GIRK4 Knockout Mice. *Neuron* **20** (1), 103–114.
- Wu, C.; Ganetzky, B.; Haugland, F.; Liu, A.**, 1983. Potassium currents in *Drosophila*: different components affected by mutations of two genes. *Science* **220** (4601), 1076–1078.
- Xu, K.; Bogert, B.; Li, W.; Su, K.; Lee, A.; Gao, F.**, 2004. The fragile X-related Gene Affects the Crawling Behavior of *Drosophila* Larvae by Regulating the mRNA Level of the DEG/ENaC Protein Pickpocket1. *Current Biology* **14** (12), 1025–1034.
- Yin, J.; Wallach, J.; Wilder, E.; Klingensmith, J.; Dang, D.; Perrimon, N.; Zhou, H.; Tully, T.; Quinn, W.**, 1995. A *Drosophila* CREB/CREM homolog encodes multiple isoforms, including a cyclic AMP-dependent protein kinase-responsive transcriptional activator and antagonist. *Molecular and Cellular Biology* **15** (9), 5123.
- Zhang, Y.; Oliva, R.; Gisselmann, G.; Hatt, H.; Guckenheimer, J.; Harris-Warrick, R.**, 2003. Overexpression of a Hyperpolarization-Activated Cation Current (I_h) Channel Gene Modifies the Firing Activity of Identified Motor Neurons in a Small Neural Network. *Journal of Neuroscience* **23** (27), 9059.
- Zhao, J.; Araki, N.; Nishimoto, S.**, 1995. Quantitation of matrix Gla protein mRNA by competitive polymerase chain reaction using glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase as an internal control. *Gene* **155** (2), 159–165.

- Zheng, W.; Feng, G.; Ren, D.; Eberl, D.; Hannan, F.; Dubald, M.; Hall, L.,** 1995. Cloning and characterization of a calcium channel alpha 1 subunit from *Drosophila melanogaster* with similarity to the rat brain type D isoform. *Journal of Neuroscience* **15** (2), 1132.
- Zito, K.; Fetter, R.; Goodman, C.; Isacoff, E.,** 2002. Synaptic Clustering of Fasciclin II and Shaker: Essential Targeting Sequences and Role of Dlg. *Developmental Cell* **2** (4), 425–436.
- Zordan, M.; Cisotto, P.; Benna, C.; Agostino, A.; Rizzo, G.; Piccin, A.; Pegoraro, M.; Sandrelli, F.; Perini, G.; Tognon, G.; et al.,** 2006. Post-transcriptional Silencing and Functional Characterization of the *Drosophila melanogaster* Homolog of Human Surf1. *Genetics* **172** (1), 229–241.
- Zumstein, N.; Forman, O.; Nongthomba, U.; Sparrow, J.; Elliott, C.,** 2004. Distance and force production during jumping in wild-type and mutant *Drosophila melanogaster*. *Journal of Experimental Biology* **207** (20), 3515–3522.

7 Abstract

It is essential for excitable cells to keep their activity within a physiological and appropriate range independently from changes in synaptic efficacy or cellular excitability which can occur during phases of learning and/or development. Recently shown results indicated that excitable cells like neurons and muscles are capable of regulating their own activity. Most of those studies, however showed compensatory effects at the level of synaptic efficacy. Those showing changes in ion channel expression to maintain cellular excitability are rare and therefore less understood. Using the advantages of the *Drosophila* Gal4/UAS-System I generated muscle-specific mutant larvae that expressed a modified Shaker-potassium channel leading to a dramatically decreased cellular excitability. The aim of this work was to detect possible compensatory changes at the level of ion channels and study the underlying cellular mechanisms.

Measurements of muscle performance did not display severe impairments in the contractile properties (tension and kinetics) when mutants were compared with wildtypes thus suggesting some kind of compensatory changes. Additional experiments excluded changes of motor synaptic transmission and/or motoneuronal output. On the level of ion channels, an increased calcium current amplitude of about 30% was detected in mutant muscle cells, which was accompanied by an up-regulation of the corresponding calcium channel β -subunit expression rate. Finally a different mutant was tested, which expressed the Shaker gene late in development and thus had only a limited time for possible compensation. In contrast to the "early" shaker-mutant, this "late" mutant showed impaired muscle performance. This experiment suggested that the expression of the genetically modified potassium channel leads to severe impairments of contractile properties if the effect had no time to be compensated by an increased calcium current.

A Anhang

A.1 Physiologische Salzlösung

Standard

Tabelle A.1: Rezeptur der physiologischen Salzlösung: Standard

- CaCl	0,5 mM
- MgCl ₂	15 mM
- KCl	24,8 mM
- NaHCO ₃	10 mM
- NaCl	23,7 mM
- 2-Hydroxyethansulfon Natriumsalz	20 mM
- BES	5 mM
- Trehalose	80 mM
- pH Wert	7,2

Kontraktionsmessungen

Tabelle A.2: Rezeptur der physiologischen Salzlösung: Kontraktionsmessungen

- CaCl	1,5 mM
- MgCl ₂	10 mM
- KCl	15 mM
- NaHCO ₃	10 mM
- NaCl	45 mM
- BES	5 mM
- Trehalose	80 mM
- pH Wert	7,2

Spannungsklemme

Tabelle A.3: Rezeptur der physiologischen Salzlösung: Spannungsklemme

- CaCl	0,2 mM
- MgCl ₂	20 mM
- KCl	5 mM
- NaHCO ₃	10 mM
- NaCl	45 mM
- BES	5 mM
- Saccharose	110 mM
- Trehalose	5 mM
- 4AP	4mM
- Quinidin	0,1mM
- TEA	20 mM
- pH Wert	7,2

A.2 Medien

A.2.1 NZY - Medium

- 22 g NZY - Medium in 1 l H₂O bidest., steril
- autoklavieren
- 12,5 ml 1M MgCl₂
- 10 ml 2M Glukose

A.2.2 LB - Agarplatten

- 22 g LB - Agar in 600 ml H₂O bidest., steril
- autoklavieren

Direkt vor dem Ausplattieren der Bakterien - 20 µl X- Gal - 100 µl Ampicillin

A.2.3 LB - Medium

- 22 g LB in 600 ml H₂O bidest., steril
- autoklavieren
- 60 mg Ampicillin

A.3 Programme zur Auswertung

A.3.1 Auswertung des Rampenprotokolls

Verändert nach Dr. Uwe Rose

```

1 #pragma rtGlobals=1          // Use modern global access method.
2
3 Menu "Analysis"
4     SubMenu "My Analysis"
5         "Ramp_Data", wave_average("current")
6
7     End
8 End
9 //=====
10 Function wave_average (strcont)
11
12     string strcont                //input string, determines "current" or "voltage" wave
13     string wnc, wnv
14     string wc, wv
15     variable nc, nv
16     variable index = 0
17     wc = WaveList("*C01*", ";", "") // lists all current (C01) waves
18     wv = WaveList("*C00*", ";", "") // lists all voltage (C00) waves
19     nc = ItemsInList(wc)
20     nv = ItemsInList(wv)
21     if (cmpstr (strcont, "current" ) == 0) // Makes a wave named "wave_average.current"
22         wave winit = WaveRefIndexed("",1,4) // and set its value = 0
23         Duplicate /O winit, wave_average.current
24         wave_average.current = 0
25
26     do
27         wnc = StringFromList(index, wc)
28         if (strlen(wnc) == 0)
29             break
30         endif
31
32         wave w1 = $wnc
33         wave_average.current += w1 // Adds all "current" waves to "w.a.c"
34         index += 1
35     while (1)
36         wave_average.current /= nc //divides sum of waves by wave number (nc)
37 Smooth/B 11, wave_average.current
38 capacity() //call function capacity
39 conductance() //call function conductance
40
41 // now the same procedure for voltage waves
42 else
43     wave winit = WaveRefIndexed("",0,4) // Makes a wave named "wave_average.voltage"
44     Duplicate /O winit, wave_average.voltage // and set ist value = 0
45     wave_average.voltage = 0
46
47     do
48         wnv = StringFromList(index, wv)
49         if (strlen(wnv) == 0)
50             break
51         endif
52
53         wave w2 = $wnv
54         wave_average.voltage += w2 // Adds all "current" waves to "w.a.c"
55         index += 1
56     while (1)
57         wave_average.voltage /= nv
58
59     endif
60
61 End
62 //=====
63 static Function conductance()
64     variable c1, c2
65     variable G, R
66
67     CurveFit/Q line wave_average.current(220,280)
68     wave W.coef = W.coef
69     c1 = W.coef[1]
70     CurveFit/Q line wave_average.current(420,480)
71     c2 = W.coef[1]
72     G=(-c1+c2)*2
73     R = 1/G
74     print "conductance: G[μS] = ", G
75     print "resistance: R[MΩ] =", R
76 end
77 //=====
78 static Function capacity()
79     variable m1, m2
80     variable Cm
81     m1 = mean(wave_average.current, 240, 260)
82     m2 = mean(wave_average.current, 440, 460)
83     Cm = 2*(m2-m1)/2
84     print "capacity=" ", Cm, "nF"

```

```

88     print m1, m2
89
90 end

```

A.3.2 Korrektur des linearen Stroms und Darstellung der Messung

```

1
2 #pragma rtGlobals=1           // Use modern global access method.
3
4 Function MyResults()
5   String voltagelist, currentlist, nc_currentlist, nv_voltagelist
6   voltagelist = WaveList("C00*", ";", ",")
7   currentlist = WaveList("C01*", ";", ",")
8   String meldung = "Input value for linear current to be subtracted"
9   Variable i, x, lin_cur, numitem_nc, z
10  Prompt lin_cur, meldung
11  i=0
12  x=0
13  Print (" Alle Waves erfolgreich in WaveLists verpackt. Guckst Du hier!")
14  Print(voltagelist)
15  Print(currentlist)
16  //Jetzt wird es Zeit was mit den Dinger anzustellen. Dazu muss man auf die Waves über den Namensstring zugreifen
17
18  Variable numitem_v = ItemsInList(voltagelist)
19  Variable numitem_c = ItemsInList(currentlist)
20  x=0
21  Print numitem_v
22  Print numitem_c
23
24  do
25      String a = num2str(x)
26      String newName_v = StringFromList(x, voltagelist)+"nv"+a
27      Print newName_v
28      Duplicate /O $StringFromList(x, voltagelist), $newName_v
29      Smooth/B 11, $newName_v
30      x+=1
31  while (x<numitem_v)
32
33  Print ("Voltage traces were first copied to ++index and are smoothed now")
34
35  i=0
36  do
37      String b = num2str(i)
38      String newName_c = StringFromList(i, currentlist)+"nc"+b
39      Print newName_c
40      Duplicate /O $StringFromList(i, currentlist), $newName_c
41      Smooth/B 11, $newName_c
42      i+=1
43  while (i<numitem_c)
44
45  Print(" Current traces were first copied to *nc+index and are smoothed now")
46
47  nc_currentlist = WaveList("nc*", ";", ",")
48
49  DoPrompt meldung, lin_cur // getting the value for the linear current which should be subtracted from the traces
50  print lin_cur
51  numitem_nc=ItemsInList(nc_currentlist)
52  z=0
53  do
54      wave w = $StringFromList(z, nc_currentlist)
55      w[600,6000]-=z*lin_cur
56      Duplicate /O w, $StringFromList(z, nc_currentlist)
57      if (z==0)
58          Display w
59      elseif (z>0)
60          AppendToGraph w
61      endif
62      z+=1
63  while(z<numitem_nc)
64
65
66  i=0
67  nv_voltagelist = WaveList("nv*", ";", ",")
68  Variable q = ItemsInList(nv_voltagelist)
69  do
70      wave v = $StringFromList(i, nv_voltagelist)
71      AppendToGraph/L=left_2 v
72      i+=1
73      while(i<q)
74          ModifyGraph axisEnab( left )={0.55,1}, axisEnab( left_2 )={0,0.45}, freePos( left_2)=0
75          KillWaves/A/Z$
76  END

```

A.3.3 Multiple Bestimmung der Regressionskoeffizienten

```

1 #pragma rtGlobals=1           // Use modern global access method.
2 function act_fitting_proc()
3 string c_traces=WaveList("Can*", ";", "WIN:")
4 string actWave, y0, y1, tau1, y2
5 string coef="W_coef.act"
6 variable i=1, t1=0, t2=0, a1=0, a2=0, KO, K1
7 //MAKE/O/D tempwave
8 Make/T/O W_actcoef= {"base" , "max" , "xhalf" , "rate" }
9 Make /O/N=4 tempwave
10 edit /N=Activation W_actcoef
11
12     do
13         actWave=StringFromList(i, c_traces)
14         Print i
15         if (strlen(actWave) ==0)
16             break
17         endif
18         Make/D/O/N=4 $(coef+actWave)
19         Print("Habe die Wave mit 4 Punkten kreiert")
20
21         Print KO
22         Print K1
23
24         CurveFit/C/X=1/NTHR=1/TBOX=0 Sigmoid kwCWave=$(coef+actWave),
25         $actWave[pcsr(A),pcsr(B)] /X=ColumnA /D/C=textWave0
26
27         AppendToTable /W=Activation $(coef+actWave)
28         Make /O/N=4 tempwave
29         wave tempwave=$(coef+actWave)
30
31         i+=1
32     while (1)
33
34
35 End

```

A.3.4 Berechnung der Daten aus der Bewegungsanalyse

```

1
2 #pragma rtGlobals=1           // Use modern global access method.
3 Menu "Analysis"
4 "Movement Analysis", MyMove()
5 End
6
7 Function MyMove()
8
9 Variable a, i, j, f, k, l, m, n, o, p, q, x, y, z, s
10 Wave XWave, X1, X2, Y1, Y2
11 i=0
12 j=0
13 f=0
14 s=0
15 k=0
16 m=0
17 l=0
18 o=0
19 x=0
20 y=0
21 Make /O/D/N=(numpts(X1)/2) Tempwave_x
22 Make /O/D/N=(numpts(X1)) wave_x
23 Make /O/D/N=(numpts(X1)/2) Tempwave_y
24 Make /O/D/N=(numpts(X1)) wave_y
25 Make /O/D/N=(numpts(X1)) Distance
26 Make /O/D/N=((numpts(Distance)/10)-1) Speed
27 Make /O/D/N=5 Results
28 Make /O/D M.WaveStats
29 Distance=0
30 if (numpts(X2)==numpts(X1))
31
32 else
33 endif
34 Print "Breakpoint 1 reached: No Problem"
35     do
36         Distance[j]=sqrt((X1[j]-X1[j+1])^2)+((Y1[j]-Y1[j+1])^2)
37
38         x=0
39         y=0
40
41         j+=1
42     while (j<(numpts(X1)))
43
44     do
45         for (z=0;z<10;z+=1)
46             s=s+Distance[z+p]
47         endfor
48         Speed[f]=s*0.35
49         s=0
50         p+=10
51         f+=1
52     while (f<(numpts(Distance)/10)
53

```

```

54
55
56
57     l=sum( Distance )*0.35
58
59     Print l
60
61 WAvestats /Q/W Speed
62 Results [0]= l
63 Results [1]=M.WaveStats [3]
64
65 Results [2]=M.WaveStats [12]
66 AppendToTable Results
67
68 ENd

```

A.4 Verwendete Chemikalien, Geräte, etc.

A.4.1 Chemikalien

Alle Chemikalien stammen, soweit nicht anders angegeben von der Sigma-Aldrich Chemie GmbH München, Deutschland.

A.4.2 Herstellernachweise

Tabelle A.4: Herstellernachweise

Typ	Bezeichnung	Hersteller	Firmensitz	Land
Brutschrank	KBD 240	Binder GmbH	Tuttlingen	Deutschland
SEVC-Verstärker	SEC-10L	npi	Thamm	Deutschland
TEVC-Verstärker	Turbo TEC-10	npi	Thamm	Deutschland
Kraftmesser	KG 4	SI-Scientific Instruments	Heidelberg	Germany
A/D-D/A-Wandler	CED 1401Plus	Cambride Elcetricon Devices	Cambridge	England
Reizisolationseinheit	ISOFlex	A.M.P.I.	Jerusalem	Israel
Mikroskop	Axioskop I	Zeiss	Oberkochen	Deutschland
	Axiovert 35M			
Zentrifuge		Eppendorf	Hamburg	Deutschland
Thermocycler	ThermoHybaid	Thermo Scientific	Waltham	USA
Geldokumentation	GeneFlash	Synoptics Ltd.	Cambridge	England
Mikroskopkamera	VDS 1300B	VDS Vosskühler GmbH	Osnabrück	Deutschland
Gelkammer	Perfect Blue Mini L	Peqlab Biotechnologie GmbH	Erlangen	Deutschland
Plastikware	Petrischalen	Greiner Bio-One GmbH	Frickenhausen	Deutschland
	Zuchtgefäße			
Sylgard	Elastosil	Wacker Chemie AG	Burghausen	Deutschland
Elektroden	GC-100TF-10	Harvard Apparatus Ltd.	Kent	England
Software	IGOR 6.02	WaveMetrics	Lake Oswego	USA
	Spike2 5.11	CED	Cambridge	England
	Lucia 5.0	LIM	Prag	Tschechien
	ImageJ 1.38x	NIH	Bethesda	USA
	CellWorks 3.6	npi	Thamm	Deutschland
	SigmaStat 3.11	Systat Software Inc.	San Jose	USA
Kit	RNeasy Mini Kit QIAshredder QIAprep Spin Miniprep Kit QIAquick Gel Extraction Kit	Qiagen	Hilden	Deutschland
	pGEM-T Easy Vector System I	Promega	Wisconsin	USA
	SuperScriptII	Invitrogen	Carlsbad	USA
	Taq DNA Polymerase	Roche	Mannheim	Deutschland
Medium	LB NZY LB-Agar	Carl Roth GmbH + Co. KG	Karlsruhe	Deutschland
	Drosophila Instant Medium	Carolina Biological Supply	Burlington	USA

A.4.3 Primer

Die angegebenen Primer wurden anhand der Datenbank Flybase BLAST r4.3 bis r5.4 ausgewählt und von Biomers, Ulm, Deutschland synthetisiert.

A.4.3.1 L - Typ Calciumkanäle

Sinn-Richtung: 5'- CGAGTTATGCGACTCGTCAA -3'

Gegensinn-Richtung: 5'- GCAATGTGACCACATCCAAG -3'

A.4.3.2 T - Typ Calciumkanäle

Sinn-Richtung: 5'- CGAGAAGGGAGAAGAACACG -3'

Gegensinn-Richtung: 5'- AGCTGGATTCGTGCTACAT -3'

A.4.3.3 rp49

Sinn-Richtung: 5'- TACAGGCCCAAGATCGTGAA -3'

Gegensinn-Richtung: 5'- ACGTTGTGCACCAGGAACTT -3'

A.4.3.4 β -Untereinheit

Sinn-Richtung: 5'- GGGTATGAAGCCCACATCAC -3'

Gegensinn-Richtung: 5'- CTGCCGACTCGAACTACTCA -3'

A.4.4 Antikörper

A.4.4.1 Primärantikörper

Name: Anti-Ca_vpan α 1

Hersteller: Alomone Labs

Erkanntes Epitop: DNFD YLTRD WSILG PPHLD

Gewonnen in: Kaninchen

A.4.4.2 Sekundärantikörper

Hersteller: Jackson Laboratories

Gerichtet gegen: Kaninchen

Gewonnen in: Ziege

Fluorophor: Cy3

Danksagung

Ich bedanke mich bei Dr. Uwe Rose für...

...die wunderbarste Betreuung die man sich für eine Doktorarbeit nur wünschen kann.

...das interessante Thema

...die vielen anregenden Gespräche und Diskussionen.

...die guten Tipps die ihm nie ausgingen.

...seine unermessliche Geduld.

...die Freundschaft die sich in den letzten Jahren entwickelt hat.

...die vielen schönen (und auch anstrengenden) Stunden auf den zahlreichen, gemeinsam erlebten Tagungen.

...noch vieles mehr.

Natürlich möchte ich mich auch bei Prof. Dr. Harald Wolf bedanken, dass er mir die Möglichkeit gab diese Arbeit in seinem Labor anzufertigen und für seine Bemühungen die zu meiner Aufnahme in die Studienstiftung des deutschen Volkes führten.

Den Wolfgang danke ich für Ihre Hilfe in allen Hard- und Softwarefragen. Ebenfalls möchte ich an dieser Stelle Prof. Dr. Günter Kämper für die Übernahme des Zweitgutachtens danken. Ein herzliches Dankeschön an die Ursula, Andrea und Alexander für alles bei dem Ihr mir geholfen habt oder mir viel Arbeit erspart habt. Dem Rest der Abteilung, den ich namentlich leider nicht im Einzelnen erwähnen kann gebührt ebenfalls mein Dank für die freundliche Atmosphäre.

Ich danke auch der Studienstiftung des deutschen Volkes, die mich sowohl finanziell als auch ideell unterstützt hat und mir viele neue Freundschaften beschert hat.

Meiner lieben Andreja, die neben der Eigenschaft meine Partnerin zu sein zugleich meine beste Freundin, Trösterin, Kritikerin und viel mehr ist, gebührt mein größter Dank und Respekt. Neben ihrem ohnehin anstrengenden Arbeitstag, schaffte sie es täglich nach München und zurückzupendeln um sich dann abends meine Klagen und Probleme anzuhören und diese gemeinsam mit mir zu diskutieren und zu lösen.

Ich kann Dir dafür nicht oft genug danken und Dir sagen wie sehr ich das alles zu schätzen weiß!

Ich möchte meinen Eltern danken, die mir geholfen haben meinen Weg zu finden und ohne die mein Studium in Ulm nicht möglich gewesen wäre. Meiner Mutter, Dorothee Heesen, danke ich für die Liebe, Zuneigung und Geduld, die nur eine Mutter aufbringen kann. Meinem Vater, Berthold Wanischeck, danke ich unter anderem für die Ratschläge, die herrlichen Diskussionen und die Wesenszüge die mich mit ihm verbinden. Auch möchte ich mich noch ganz herzlich bei Beate Wanischeck und Winfried Heesen bedanken, die mich ebenfalls immer unterstützt und mir mit Rat und Tat zur Seite standen.

Meinen Geschwistern Clarissa und Thomas danke ich für Ihr offenes Ohr in allen Lebenslagen, unser wunderbares Verhältnis zueinander, das hoffentlich für immer bestehen bleibt. Meinen Großeltern, die immer Interesse für meine Studium und meine Doktorarbeit hatten und mich auf so viele verschiedene Weisen unterstützt haben. Meinen "Schwagers", Iris und Ante, danke ich für die vielen schönen Stunden die wir zusammen hatten und hoffentlich auch weiterhin haben werden. Zudem möchte ich Iris Bekarska (M.A.) an dieser Stelle vielmals für Ihre Arbeit als Lektorin dieser Dissertationsschrift danken. Ohne Sie wäre es nur halb so gut geworden.

Meinen "Schwiegers", Dragica und Vasil danke ich für alles was sie für Andreja und mich getan haben, das viele gute Essen und die kulturelle Bereicherung, die sie mir gebracht haben.

Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die Arbeit selbständig und nur mit den angegebenen Hilfsmitteln angefertigt habe.

Weiterhin sind alle Stellen, die dem Wortlaut oder dem Sinne nach anderen Werken entnommen sind, durch Angabe der Quellen als Entlehnung kenntlich gemacht worden.

Mario Wanischeck

Curriculum vitae

Persönliche Daten

Mario Wanischeck
Augsburger Straße 42
89231 Neu-Ulm

0731-4037163
mario.wanischeck@gmx.de

17.12.1979 Wesel
ledig

Ausbildung

Promotion

seit 2005 Promotion am Institut für Neurobiologie der Universität Ulm

Hochschulstudium

2000 - 2005 Studium der Biologie, Universität Ulm
2002 Vordiplom: Note 1,6
2005 Diplom: Hauptfach: Neurobiologie (1,8),
Diplomarbeit bei Prof. Dr. Harald Wolf, Note: 1,0
Gesamtnote Diplom: 1,3

Schulbildung

1986 - 1990 Adolf - Reichwein Grundschule, Moers
1990 - 1999 Gymnasium in den Filder Benden, Moers

Berufliche Tätigkeiten

Zivildienst

1999 - 2000 Evangelisches Altenwohnheim Rudolf - Schloer - Stift

Wissenschaftliche Hilfskraft

2002 - 2003 Abteilung Spezielle Botanik: SysTax: Datenbankpflege und Gestaltung der Internetpräsenz
2002 - 2008 Abteilung Neurobiologie: Betreuung des tierphysiologischen Anfängerpraktikums
2004 - 2008 Betreuung des Neurobiologischen Praktikums für Fortgeschrittene
2004 - 2005 Abteilung Molekulare Botanik: Betreuung des pflanzenphysiologischen Anfängerpraktikums
2004 - 2005 Tutor im tierphysiologischen Anfängerpraktikum (Teil: Neurobiologie)

2004 - 2008 Abteilung allg. Zoologie u. Endokrinologie: Betreuung des Praktikums
Biologie für Humanmediziner

Stipendien

2004 Reisestipendium der National Institutes of Health (USA) für einen Poster-
beitrag zum ICN 2004

2005 - heute Promotionsstipendium der Studienstiftung des deutschen Volkes

2006 Reisestipendium der Studienstiftung des deutschen Volkes
Heiligenberg Student Travel Award für einen Posterbeitrag zum SfN Kon-
gress 2006

2007 Reisestipendium der Studienstiftung des deutschen Volkes
ISN Congress Award für zwei Posterbeiträge zum ICN Kongress 2007

Publikationen

1. **Wanischek, M.; Rose, U.**, 2005. Unusual tension reception in an insect 2005, *Journal of Neurobiology* **65** (2), 114-125.
2. **Rose, U.; Derst, C.; Wanischek, M.; Marinc, C.; Walther, C.** 2007. Properties and possible function of a hyperpolarisation-activated chloride current in *Drosophila*, *Journal of Experimental Biology* **210**, 2489-500

Abstracts

3. **Wanischek, M.; Rose, U.** 2004. Unusual tension receptors in an insect and how they compare to the Golgi tendon organ of mammals, *International Congress for Neuroethology*, Nyborg
4. **Wanischek, M.; Rose, U.** 2005. Unusual tension receptors on an insect skeletal-muscle, *30th Neurobiology Conference*, Göttingen
5. **Wanischek, M.; Rose, U.** 2006. Contraction measurements in body wall muscles of *Drosophila* larvae reveal differences in modulatory effects of octopamine and its precursor tyramine, *Neurofly Meeting*, Leuven
6. **Wanischek, M.; Rose, U.** 2006. Contraction measurements in body wall muscles of *Drosophila* larvae reveal differences in modulatory effects of octopamine and its precursor tyramine, *Society for Neuroscience Meeting*, Atlanta
7. **Wanischek, M.; Rose, U.** 2007. Contraction measurements in body wall muscles of *Drosophila* larvae reveal differences in modulatory effects of octopamine and its precursor tyramine, *31th Neurobiology Conference*, Göttingen
8. **Rose, U.; Derst, C.; Wanischek, M.; Marinc, C.; Walther, C.** Properties and functional relevance of a hyperpolarisation-activated chloride current in the *Drosophila* muscle, *31th Neurobiology Conference*, Göttingen
9. **Wanischek, M.; Rose, U.** 2007. Contraction measurements in body wall muscles of *Drosophila* larvae, *International Congress for Neuroethology*, Vancouver
10. **Wanischek, M.; Rose, U.** 2007. Homeostatic regulation in muscle cells of larval *Drosophila melanogaster*, *International Congress for Neuroethology*, Vancouver
11. **Rose, U.; Derst, C.; Wanischek, M.; Walther, C.** 2007. Properties and functional relevance of a hyperpolarisation-activated chloride current in the *Drosophila* muscle, *International Congress for Neuroethology*, Vancouver

Vorträge

12. **Wanischek, M.** 2003. Uncommon sensory-cells on an uncommon muscle *Arthropodenseminar 2003*, Kleinwalsertal

13. **Wanischek, M.** 2005. Homeostatic plasticity in the neuromuscular system of the fruitfly *Drosophila melanogaster*, *Neurobiologischer DoktorandenWorkshop*, Kaiserslautern
14. **Wanischek, M.** 2005. Homeostatic plasticity in the neuromuscular system of the fruitfly *Drosophila melanogaster*, *Arthropodenseminar 2005*, Bielefeld
15. **Wanischek, M.** 2006. Homeostatic plasticity in the neuromuscular system of the fruitfly *Drosophila melanogaster*, *Zoologisches Kolloqium*, Bonn
16. **Wanischek, M.** 2006. Contraction measurements of single muscle fibers in *Drosophila* larvae, *Arthropodenseminar 2006*, Schwandlpe (Allgäu)
17. **Wanischek, M.** 2007. Homöostatische Plastizität im neuromuskulären System der Taufliege *Drosophila melanogaster*, *Arthropodenseminar 2007*, Weidach (Ulm)
18. **Wanischek, M.** 2008. Homeostatic regulation of cellular excitability in the neuromuscular system of the fruitfly *Drosophila melanogaster*, *Vorstellungsvortrag MPI*, München