



Institut für Biologische Informationsverarbeitung

*Klonierung und Charakterisierung
der Promotorregion eines
Dopamin D1-Rezeptorgens aus
Drosophila melanogaster*

Verena Kehren

***Klonierung und Charakterisierung
der Promotorregion eines
Dopamin D1-Rezeptorgens aus
Drosophila melanogaster***

Verena Kehren

Berichte des Forschungszentrums Jülich ; 3665
ISSN 0944-2952
Institut für Biologische Informationsverarbeitung Jül-3665
D38 (Diss. Universität Köln, 1999)

Zu beziehen durch : Forschungszentrum Jülich GmbH · Zentralbibliothek
D-52425 Jülich · Bundesrepublik Deutschland
☎ 02461/61-6102 · Telefax: 02461/61-6103 · e-mail: zb-publikation@fz-juelich.de

Inhaltsverzeichnis

	Inhaltsverzeichnis	I
	Abkürzungsverzeichnis	V
1.	Einleitung	1
1.1	Die Familie der G-Protein gekoppelten Rezeptoren (GPCR)	1
1.2	Signalwege G-Protein gekoppelter Rezeptoren	4
1.3	Dopamin und Dopaminrezeptoren	6
1.4	Regulation der Rezeptor-Genexpression	8
1.5	Zielsetzung der Arbeit	9
2.	Material und Methoden	10
2.1	Chemikalien und Enzyme	10
2.2	Stämme und Medien	10
2.2.1	Bakterienstämme	10
2.2.2	Medien zur Anzucht von Bakterien	11
2.2.3	α -Komplementation	11
2.3	Zelllinien und Medien	11
2.3.1	Zelllinien	11
2.3.2	Medien zur Anzucht von Zelllinien	12
2.4	Fliegenstämme (<i>Drosophila melanogaster</i>)	12
2.5	Fliegenhaltung	12
2.6	Plasmide	12
2.7	Genbibliotheken	13
2.8	Größenstandards	13
2.9	Synthese und Reinigung von Oligonukleotiden	13
2.10	Quantifizierung von Nukleinsäuren	14
2.10.1	Photometrische Bestimmung	14
2.10.2	Ethidiumbromid-Fluoreszenz	14
2.11	Präparation von Nukleinsäuren	14
2.11.1	Präparation von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i>	14
2.11.1.1	Mini-Präparation	14
2.11.1.2	Midi-Präparation	15
2.11.2	Präparation von λ -Phagen-DNA	15
2.11.2.1	Herstellung von Mg^{2+} -Zellen	15
2.11.2.2	Anzucht von λ -Phagen auf NZY-Platten	15

2.11.2.3	Präparation von λ -Phagen-DNA aus kleinen Lysaten	16
2.11.3	Präparation von Gesamt-RNA aus <i>Drosophila melanogaster</i> Gewebe	16
2.11.4	Anreicherung von poly (A) ⁺ -RNA aus Gesamt-RNA von <i>Drosophila melanogaster</i>	16
2.12	Modifizierung von DNA-Fragmenten	17
2.12.1	Glätten überhängender Enden von DNA-Fragmenten	17
2.12.2	Phosphorylierung der 5'-Enden von DNA-Fragmenten	17
2.12.3	Dephosphorylierung von DNA-Fragmenten	17
2.13	Analyse von DNA	17
2.13.1	Restriktionen	17
2.13.2	DNA-Sequenzierung	18
2.13.3	Agarose-Gelelektrophorese	18
2.13.4	Isolierung von DNA aus Agarosegelen	18
2.14	Klonierung von DNA-Fragmenten	19
2.14.1	Ligation von DNA	19
2.14.2	Herstellung kompetenter Zellen	19
2.14.3	Transformation von <i>E.coli</i>	19
2.14.4	Subklonierung von genomischer DNA aus λ -Phagen	19
2.15	Amplifizierung von DNA mittels Polymerase-Ketten Reaktion (PCR)	20
2.16	Herstellung von cDNA aus poly (A) ⁺ -RNA aus <i>Drosophila melanogaster</i> Geweben	20
2.17	Amplifizierung von cDNA-Enden („RACE“)	21
2.17.1	Amplifizierung von 5'-Enden mittels „5'-RACE“	21
2.17.2	Amplifizierung von 3'-Enden mittels „3'-RACE“	22
2.18	<i>In situ</i> Hybridisierung an Gewebeschnitten von <i>Drosophila melanogaster</i>	23
2.18.1	Herstellung von Sonden mittels <i>in vitro</i> Transkription	23
2.18.2	Anfertigung von Gewebeschnitten	23
2.18.3	Hybridisierung der Gewebeschnitte	23
2.19	Hybridisierungen an Quetschpräparaten polytärer Speicheldrüsen-Chromosomen	24
2.19.1	Chromosomenpräparation	24
2.19.2	Markierung von DNA mit Digoxigenin gekoppeltem Desoxyuridin-triphosphat	24
2.19.3	Hybridisierungsreaktion mit DIG-dUTP markierter DNA	24
2.19.4	Nachweis der Hybride	25
2.20	Identifizierung von spezifischen Nukleinsäuren	25
2.20.1	Markierung von Nukleinsäuren	25
2.20.2	Transfer von DNA („Southern-Blot“)	25
2.20.3	Hybridisierung und Detektion	26

2.20.4	Transfer von poly (A) ⁺ -RNA („Northern-Blot“)	27
2.20.5	Dentaaurierende Agarose-Gelelektrophorese	27
2.21	„Primer-Extension“-Analyse	27
2.22	Immunologischer Nachweis von Proteinen („Western-Blot“)	28
2.22.1	Expression von Fusionsproteinen	28
2.22.2	Gesamtzellextrakt und Fraktionierung von <i>E.coli</i> Zellen	28
2.22.3	Gelelektrophorese und Transfer von Proteinen	28
2.22.4	Immunologischer Nachweis der Fusionsproteine	29
2.23	Zellkultur	30
2.23.1	Kultivierung der Zellen	30
2.23.2	Lagerung von Zelllinien in flüssigem Stickstoff	30
2.23.3	Transiente Expression (CaPO ₄ -Methode)	31
2.24	Herstellung von Zellextrakten	32
2.25	Aktivitätsbestimmung der Reporterenzyme	32
2.25.1	Chloramphenicol-Acetyltransferase (CAT)-Assay	32
2.25.2	β-Galaktosidase (β-Gal)-Assay	32
2.26	Isolierung von Kern-Proteinen aus Säugerzellen	33
2.27	Gelshift-Assay	33
3.	Ergebnisse	35
3.1	Identifizierung des DmDop1-Promotors	35
3.1.1	Northern-Blot-Analyse	35
3.1.2	Isolierung der 3'-nicht-translatierten Region des DmDop1-Gens mit der 3'-RACE-Methode (Frohman, 1994)	36
3.1.3	Isolierung der fehlenden 5'-nicht-translatierten Region des DmDop1-Gens mit der 5'-RACE-Methode (Frohman, 1994)	39
3.1.4	Vergleich der Sequenz der 5'-RACE-Klone mit der genomischen Sequenz des Phagen λ 32	42
3.1.5	Identifizierung des DmDop1-Transkriptionsstarts	45
3.1.6	Sequenzierung und Charakterisierung der Promotorregion des DmDop1-Rezeptorgens	46
3.1.7	Isolierung von genomischen Phagen zur Charakterisierung weiterer „stromaufwärts“ liegender Promotorbereiche	50
3.2	Bestimmung der Promotoraktivität des DmDop1-Gens	51
3.2.1	Herstellung der pCAT ^R 3-Promotorkonstrukte	51
3.2.2	Bestimmung der CAT-Aktivität	58
3.2.2.1	Messung der CAT-Aktivität in der menschlichen SK.N.SH-Neuroblastom-Zelllinie	58

3.2.2.2	Messung der CAT-Aktivität in der Maus-Neuroblastom-Zelllinie Neuro2a	60
3.2.2.3	Messung der CAT-Aktivität in der menschlichen Nierenzelllinie HEK293	61
3.3	Nachweis der Protein-Promotorwechselwirkungen des DmDop1-Gens durch Gelshift-Assays (Hendrickson, 1985; Manley et al., 1980)	64
3.4	Entwicklungs- und gewebespezifische Lokalisation der DmDop1-mRNA	67
3.4.1	RT (Reverse Transkriptase)-PCR Analyse der DmDop1-mRNA	67
3.4.2	<i>In situ</i> Hybridisierung an Gefrierschnitten von <i>Drosophila melanogaster</i>	70
3.5	Herstellung eines spezifischen DmDop1-Antikörpers	74
3.5.1	Anfügen des His-TAGs an die DmDop1-Sequenz	74
3.5.2	Expression des pQEDmDOP1-Fusionsproteins	74
4.	Diskussion	76
4.1	Identifizierung des Promotorbereichs eines Dopamin D1-Rezeptorgens aus <i>Drosophila melanogaster</i>	76
4.2	Promotorstruktur des DmDop1-Gens	77
4.3	Bestimmung der Promotoraktivitäten in neuronalen und nicht-neuronalen Zelllinien	79
4.4	Zelltypspezifische Expression des DmDop1-Rezeptorgens	80
4.5	Ein Modell für die Regulation des DmDop1-Rezeptorgens	81
5.	Zusammenfassung	85
6.	Literaturverzeichnis	86
A.	Anhang	99

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
ATP	Adenosintriphosphat
B	Basen
Bp	Basenpaare
bspw.	beispielsweise
°C	Temperatur in Grad Celsius
cAMP	3',5'-zyklisches Adenosinmonophosphat
cDNA	„copy“-DNA
CAT	Chloramphenicol-Acetyltransferase
Ci	Curie
cpm	Zerfallereignisse pro Minute
C-Terminus	Carboxylterminus einer Polypeptidkette
CTP	Cytidintriphosphat
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
dCTP	Desoxycytosintriphosphat
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DIG-UTP	Digoxigenin-11-uridin-5'-triphosphat
DMSO	Dimethylsulfoxid
DmDOP1	Dopamin D1-Rezeptor aus <i>Drosophila melanogaster</i>
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
DTT	1,4-Dithiothreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamin-tetraessigsäure
EGTA	[Ethylen-bis(oxyethylen-nitrilo)]-tetraessigsäure
g	Gramm
g	Normal-Fallbeschleunigung ($9,81 \text{ m}\cdot\text{s}^{-2}$)
GPCR	G-Protein-gekoppelte(r) Rezeptor(en)
GTP	Guanosintriphosphat
hDOP1	humaner Dopamin D1-Rezeptor
H ₂ O	Wasser
HEK293	embryonale Nierenzelllinie des Menschen
HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinethan-sulfonsäure
IBMX	3-Isobutyl-1-methyl-xanthine
KAc	Kalium-Acetat
kB(p)	1000 Basen(paare)
l	Liter

M	molar
min	Minute(n)
MCS	multiple Klonierungsstelle
MOPS	4-Morpholinpropansulfonsäure
NaAc	Natrium-Acetat
N-Terminus	Aminoterminal einer Polypeptidkette
Neuro2a	Maus-Neuroblastom-Zelllinie
o.a.	oben angegeben
OD	Extinktion bei der im Index in nm angegebenen Wellenlänge und einer Schichtdicke von 1 cm
PCR	Polymerase-Ketten Reaktion
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde
SDS	Natriumdodecylsulfat
SK.N.SH	menschliche Neuroblastom-Zelllinie
Tab.	Tabelle
TM	transmembranale Region
Tris	2-Amino-2-(hydroxymethyl)1,3-propandiol
u.a.	unter anderem
U	Enzymeinheit (unit)
üN	über Nacht
UTP	Uridintriphosphat

Die einzelnen Nukleotide innerhalb einer Nukleinsäuresequenz werden durch den Anfangsbuchstaben der Base bezeichnet (A: Adenin, C: Cytosin, G: Guanin, T: Thymin, U: Uracil).

1. Einleitung

Alle Lebewesen sind einer sich ständig ändernden Umwelt ausgesetzt. Das Überleben eines Organismus hängt deshalb besonders von seiner Fähigkeit ab, auf Umweltreize oder -signale reagieren zu können. Extrazelluläre Signale werden von spezifischen Rezeptoren auf der Zelloberfläche aufgenommen und bewirken biochemische und morphologische Reaktionen der Zelle. Die Umsetzung extrazellulärer Informationen in intrazelluläre Signale wird als Signaltransduktion bezeichnet.

Bei höheren Eukaryonten erfolgt die Wahrnehmung, Verarbeitung und schnelle Reaktion auf Reize durch das Nervensystem. In Nervenzellen (Neuronen) werden Informationen als elektrische Impulse (Aktionspotentiale) kodiert. Für die Entstehung und Weiterleitung eines Aktionspotentials sind spannungsgesteuerte Ionenkanäle verantwortlich (Hille 1992, Catterall, 1995). Damit Nervenzellen miteinander kommunizieren können, wird der elektrische Impuls in ein chemisches Signal umgewandelt. Die Umwandlung geschieht an der Synapse, dem Bereich der Nervenzelle, der den Kontakt in den jeweiligen Zielzellen herstellt. Das chemische Signal wird von Neurotransmittern übertragen. Die Neurotransmitter sind in der präsynaptischen Endigung in Vesikeln gespeichert und werden bei Erregung der Nervenzelle in den synaptischen Spalt ausgeschüttet. Die Transmitter binden an membranständige Rezeptoren der postsynaptischen Nervenzelle. Die Aktivierung von Rezeptoren, die selbst einen Ionenkanal bilden können, bspw. Acetylcholin-Rezeptoren oder Glutamat-Rezeptoren (Galzi et al., 1991; Hollmann & Heinemann 1994), erzeugt eine Potentialänderung in dem postsynaptischen Neuron. Das postsynaptische Potential kann ein Aktionspotential in der Zelle auslösen. Dadurch wird die Weiterleitung der Information auf die nächste nachgeschaltete Zelle gewährleistet.

Die zahlenmäßig weitaus größte Gruppe von Neurotransmitter-Rezeptoren sind die sogenannten G-Protein gekoppelten Rezeptoren (GPCR). Die Eigenschaften dieser Membranproteine werden im Folgenden näher beschrieben.

1.1 Die Familie der G-Protein gekoppelten Rezeptoren (GPCR)

GPCR werden durch so unterschiedliche extrazelluläre Signale, wie bspw. Licht, Geruchsstoffe, Peptide und Neurotransmitter aktiviert (Dohlman et al., 1991). Bis heute sind über 500 verschiedene GPCR bekannt. Sie sind an der Signalweiterleitung in Sinnes- und Nervenzellen beteiligt und kommen auch im Hormonsystem vor (Probst et al, 1992; Strader et al., 1995; Baldwin et al., 1997).

Die Rezeptoren werden in drei Unterfamilien eingeteilt. Dies sind:

1. die Rhodopsin-ähnlichen Rezeptoren, bspw. biogene Amin-Rezeptoren,
2. die peptidergen Rezeptoren, bspw. Sekretin/Vasointestinal Peptid- (VIP) Rezeptoren und
3. die metabotropen Glutamaterezeptoren (Strader et al., 1995).

Obwohl die Aktivierung der Rezeptoren durch strukturell sehr unterschiedliche Liganden erfolgt, beruht die Umsetzung in ein zelluläres Signal auf einem gemeinsamen Funktionsprinzip. Die Bindung der Liganden bewirkt eine Konformationsänderung der Rezeptoren. Diese Strukturänderung wird auf trimere, GTP-bindende (G)-Proteine übertragen (Simon et al., 1991), die dann die Aktivität verschiedener Zielproteine in der Zelle modulieren. Wegen der Wechselwirkung der Rezeptoren mit G-Proteinen bezeichnet man sie als GPCR.

Es wird angenommen, daß GPCR eine ähnliche transmembranale Topologie wie das Bakteriorhodopsin besitzen (Dixon, 1987). Elektronen-Cryo-mikroskopische Untersuchungen an Rhodopsin-Präparationen aus verschiedenen Spezies (Baldwin, 1993, Baldwin et al., 1997; Unger & Schertler, 1995; Unger et al., 1997) haben gezeigt, daß GPCR die Zellmembran sieben Mal durchspannen. Die transmembranalen Segmente (TM) bestehen aus 20-30 hydrophoben Aminosäuren und sind durch drei intrazelluläre und drei extrazelluläre hydrophile Schleifen verbunden. Eine vierte intrazelluläre Schleife wird vermutlich durch Palmitoylierung eines im Carboxyterminus liegenden Cysteins gebildet (Mumby, 1997; O'Dowd, 1992; Papac et al., 1992). Der Aminoterminus befindet sich auf der extrazellulären- und der Carboxyterminus auf der cytoplasmatischen Seite der Membran (Abb. 1).

In der Gruppe der Rhodopsin-ähnlichen Rezeptoren, zu der auch der β -adrenerge Rezeptor gehört, erfolgt die Bindung der Liganden in einer Bindetasche, die von den transmembranalen Segmenten geformt wird (Strader et al., 1989). An der Wechselwirkung mit dem Liganden sind Aminosäuren beteiligt, die sich in den transmembranalen Segmenten befinden. Durch Mutageneseuntersuchungen wurde gezeigt, daß bspw. bei α - und β -adrenergen-Rezeptoren (Strader et al., 1988; Wang et al., 1991) und bei muskarinischen Acetylcholin-Rezeptoren (Fraser, 1989) das Aspartat 113 in TM 3 die Aminogruppe des Liganden bindet. Das Aspartat hat hier die Funktion eines Gegenions zur positiv geladenen Aminogruppe des Liganden. Außerdem wurde gezeigt, daß zwei Serine in TM 5, Ser 204 und Ser 207, an der Bindung biogener Amine beteiligt sind. Sie bilden Wasserstoffbrücken mit den Hydroxylgruppen des Katecholrings aus (Wang et al., 1991).

Im Gegensatz zur Rhodopsin-ähnlichen Familie der G-Protein gekoppelten Rezeptoren binden peptiderge- und metabotrope Glutamat-Rezeptoren ihre Liganden nicht innerhalb einer von den transmembranalen Segmenten ausgebildeten Bindetasche sondern mit dem N-Terminus und teilweise auch mit Aminosäuren in den extrazellulären hydrophilen Schleifen (Baldwin, 1994). Peptiderge Rezeptoren enthalten im N-Terminus viele Cysteine. Es wird vermutet, daß die Cysteine Disulfidbrücken ausbilden und so die Struktur des Rezeptors stabilisieren (Sprengel et al., 1990). Im N-Terminus der G-Protein gekoppelten Rezeptoren befinden sich meist mehrere Konsensussequenzen (N-X-S/T) für N-Glykosylierungen (Kornfeld & Kornfeld, 1985; Dohlman et al., 1987). Die Glykosylierung ist weder für die Ligandenbindung noch für die G-Protein Kopplung notwendig (Strader et al., 1989). Es wird angenommen, daß die Glykosylierung für die richtige Anordnung des Rezeptors in der

Zellmembran benötigt wird (Rands et al., 1990). Die Länge des N-Terminus ist in G-Protein gekoppelten Rezeptoren sehr variabel. Sie reicht von 7 Aminosäuren, bspw. im Adenosin A₂-Rezeptor, bis zu mehr als 300 Aminosäuren, bspw. im Glykoprotein Hormonrezeptor. In der dritten intrazellulären Schleife und im C-Terminus enthalten GPCR viele Serine und Threonine, die potentielle Phosphorylierungsstellen für Proteinkinasen wie bspw. PKA (cAMP abhängige Proteinkinase A), PKC (Proteinkinase C) und CaM-Kinase (Ca²⁺/Calmodulin-abhängige Kinase), aber auch rezeptorspezifische Kinasen wie Rhodopsin-Kinase (Lorenz et al., 1991) oder β -adrenerge Rezeptorkinasen (β ARK) (Benovic et al., 1989; Benovic et al., 1991) darstellen. Die Phosphorylierung der Rezeptoren führt zu einer Desensitisierung, d.h. die Empfindlichkeit des Systems gegenüber länger anhaltenden Reizen wird vermindert (Dohlman et al., 1991). An phosphorylierte Rezeptoren bindet ein intrazelluläres Protein, Arrestin, mit hoher Affinität und inhibiert die Wechselwirkung zwischen Rezeptor und G-Protein (Freedman & Lefkowitz, 1996). Arrestin kann in diesem Komplex aber auch als Adapterprotein die Kopplung GPCR an die Tyrosinkinase c-src ermöglichen und dadurch die Aktivierung des MAP-Kinase-Wegs stimulieren (Luttrell et al., 1999).

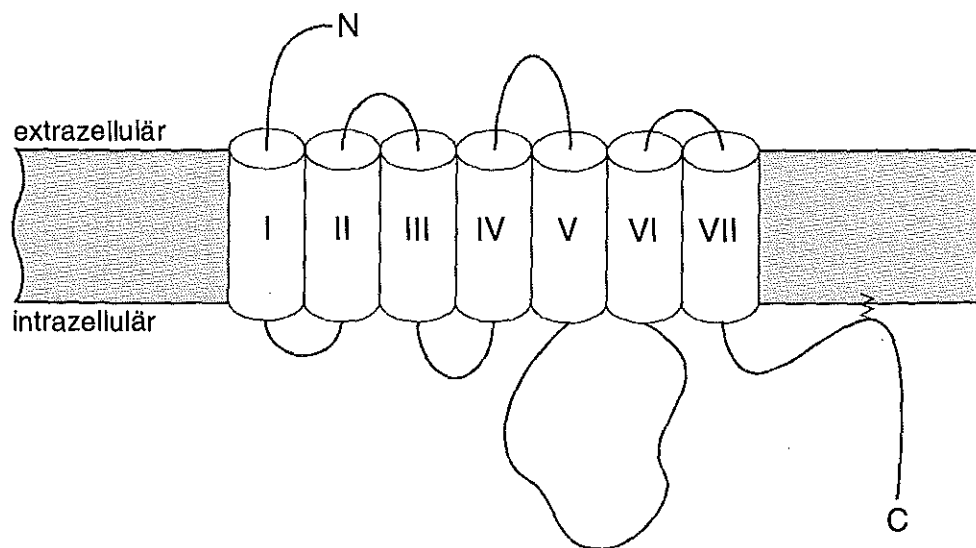


Abb.1: Darstellung eines G-Protein gekoppelten Rezeptors. GPCR bestehen aus sieben hydrophoben transmembranalen Regionen, die mit drei hydrophilen extrazellulären und drei intrazellulären Schleifen verbunden sind. Der N-Terminus ist extrazellulär, der C-Terminus intrazellulär lokalisiert. Die dritte intrazelluläre Schleife und der C-Terminus sind an der Kopplung mit heterotrimeren G-Proteinen beteiligt.

1.2 Signalwege G-Protein gekoppelter Rezeptoren

Wie bereits anfangs erwähnt, führt die Bindung eines Liganden an einen G-Protein gekoppelten Rezeptor zu einer Konformationsänderung des Rezeptorproteins. Diese Konformationsänderung wird auf der intrazellulären Seite auf GTP-bindende (G)-Proteine übertragen. G-Proteine sind durch „Lipidgruppen“ in der Plasmamembran verankert und bestehen aus drei Untereinheiten: einer α -, einer β - und einer γ -Untereinheit. Die α -Untereinheit des G-Proteins hat in der inaktiven Form GDP gebunden. Inzwischen sind die Gene von 23 verschiedenen α -Untereinheiten, 5 β - und 11 γ -Untereinheiten kloniert worden (Gudermann et al., 1997). Die Aktivierung dieser G-Proteine ist mit einem Austausch des gebundenen Guanosindiphosphat (GDP) gegen Guanosintriphosphat (GTP) an der α -Untereinheit verbunden. Die aktivierte α -Untereinheit und die $\beta\gamma$ -Untereinheiten der G-Proteine dissoziieren vom Rezeptor ab. Sowohl die α -Untereinheit als auch die $\beta\gamma$ -Untereinheiten stimulieren oder inhibieren die Aktivität verschiedener Effektorproteine. Die bekanntesten Effektoren sind Enzyme wie bspw. Adenylatzyklasten, Phosphodiesterasen, Phospholipasen und Phosphatasen, aber auch Ionenkanäle (Johnson & Dhanasekaran, 1989; Birnbaumer et al., 1990). Zunächst wurde angenommen, daß ein bestimmter G-Protein gekoppelter Rezeptor nur mit einem G-Protein wechselwirkt und deshalb auch nur einen einzigen Effektor aktiviert. Inzwischen wurde jedoch gezeigt, daß die Rezeptoren verschiedene G-Proteine in einer Zelle aktivieren können (Birnbaumer et al., 1990; Milligan, 1993). So aktiviert der α_2 -adrenerge Rezeptor beispielsweise sowohl inhibitorische (G_i) G-Proteine (Kurose et al., 1991) als auch G_o -Proteine (Okuma & Reisine, 1992). Die Aktivierung der G_i -Proteine bewirkt eine Inhibierung der Adenylatzyklase, d.h. die intrazelluläre Konzentration des *second messengers* cAMP sinkt (Sidhu, 1998). Die Aktivierung des G_o -Proteins führt zu einer Stimulierung der Phospholipase C-Aktivität. Das Enzym spaltet membranständiges Phosphatidyl-Inositol in die Botenstoffe Inositol-1,4,5-Trisphosphat (IP_3) und Diacylglycerol (DAG). IP_3 bindet an Rezeptoren im endoplasmatischen Retikulum und bewirkt eine Freisetzung von Ca^{2+} aus intrazellulären Speichern. Die Erhöhung der Ca^{2+} -Konzentration ist für die Regulation weiterer Enzyme, bspw. Ca^{2+} /Calmodulin abhängige Adenylatzyklasten, wichtig und wird in vielen Fällen über Ca^{2+} -bindende Proteine vermittelt. DAG aktiviert Proteinkinase C (PKC). Die Kinase kann verschiedene Zielproteine, u.a. Rezeptoren und Ionenkanäle, phosphorylieren. Durch die Phosphorylierung werden die Eigenschaften der Membranproteine moduliert.

An der Wechselwirkung zwischen G-Protein gekoppelten Rezeptoren und den α -Untereinheiten von G-Proteinen sind verschiedene Proteinabschnitte beteiligt. Durch viele Mutagenesestudien an Rezeptoren wurde inzwischen gezeigt, daß Aminosäuren in der 2. und 3. intrazellulären Schleife, die die transmembranalen Segmente TM 3/4 und TM 5/6 flankieren, für die Wechselwirkung notwendig sind (O'Dowd et al., 1989; Gudermann et al., 1997). Zusätzlich wurde beschrieben, daß die C-terminale Sequenz des Rezeptors, die sich

vom Ende der TM7 bis zur Palmitoylierungsstelle erstreckt, die Rezeptorbeweglichkeit beeinflusst (Findlay & Eiopoulos, 1990) und auch an der G-Protein-Kopplung beteiligt ist (O'Dowd et al., 1989). Das G-Protein bindet mit dem C-Terminus der α -Untereinheit an den Rezeptor (Gudermann et al., 1997).

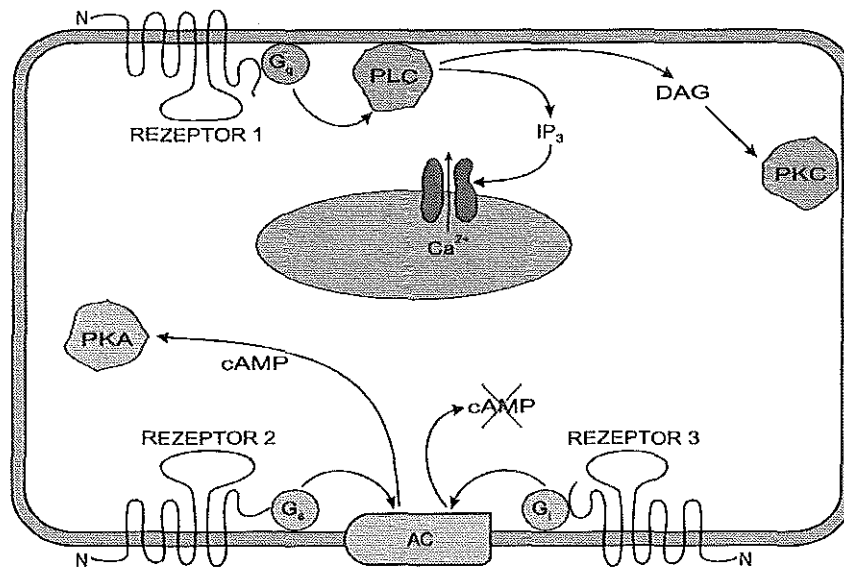


Abb. 2: Schematische Darstellung der wichtigsten Signalwege G-Protein gekoppelter Rezeptoren. Rezeptor 1 aktiviert nach Bindung des Liganden die G_q - α -Untereinheit des heterotrimeren G-Proteins. Diese aktiviert die Phospholipase C, die 1-Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP_2) zu Inositoltrisphosphat (IP_3) und Diacylglycerol (DAG) umsetzt. Inositoltrisphosphat bindet an intrazelluläre Rezeptoren, die die Öffnung von Ca^{2+} -Kanälen bewirken. Rezeptor 2 aktiviert die G_s - α -Untereinheit des heterotrimeren G-Proteins. Diese aktiviert die Adenylatzyklase, was zu einem Anstieg der cAMP-Konzentration in der Zelle führt. cAMP aktiviert die cAMP-abhängige Proteinkinase A, die daraufhin z.B. Ionenkanäle und Transkriptionsfaktoren phosphoryliert. Rezeptor 3 aktiviert die G_i - α -Untereinheit des G-Proteins. Dies führt zur Inaktivierung der Adenylatzyklase und zu einer Abnahme der cAMP-Konzentration in der Zelle.

Ein wesentlicher Aspekt der Rezeptor-G-Protein vermittelten Signalübertragung liegt in dem enormen Verstärkungsgrad, den dieses System leistet. Dies ist besonders gut für die lichtabhängige Enzymkaskade in Photorezeptorzellen untersucht (Stryer, 1986). Das Sehpigment Rhodopsin kann bis zu 1000 G-Proteine aktivieren. Diese Photorezeptor-spezifischen Transducin-Moleküle aktivieren in einer $\sim 1:1$ Stöchiometrie Phosphodiesterasen. Ein aktiviertes Phosphodiesterase-Enzym spaltet bis zu zweitausend cGMP-Moleküle/sec. Die Abnahme der intrazellulären cGMP-Konzentration führt zum Schließen der zyklisch Nukleotid-gesteuerten Ionenkanäle in der Plasmamembran des Photorezeptors.

Die Zelle wird hyperpolarisiert und die Freisetzung von Neurotransmittern aus der synaptischen Endigung des Photorezeptors unterbrochen. Der Amplifikationsgrad, der durch die Aktivierung eines einzelnen Rhodopsin-Moleküls erreicht wird, beträgt 10^5 - 10^6 (Kaupp & Koch, 1992; Pugh & Lamb, 1993).

1.3 Dopamin und Dopaminrezeptoren

Eine Gruppe von Neurotransmittern und -rezeptoren, die im Nervensystem von Vertebraten und Evertrebraten verschiedene Funktionen haben, sind die biogenen Amine (Amin-Rezeptoren). Zu diesen Substanzen gehören die Katecholamine Adrenalin, Noradrenalin und Dopamin sowie Serotonin, Histamin, Tyramin und Octopamin. Die biogenen Amine werden aus den Aminosäuren Histidin, Tryptophan und Tyrosin in ein- bis mehrstufigen Reaktionen synthetisiert. Dopamin ist das am häufigsten vorkommende Katecholamin im Gehirn von Vertebraten. Dopamin ist an verschiedenen Prozessen wie bspw. der Bewegungskontrolle, Steuerung von Empfindungen, der neuroendokrinen und kardiovaskulären Regulation (Jaber et al., 1996) und der Prolactin-Sekretion beteiligt (Arnt, 1987; Seeman, 1987a,b; Carlsson, 1988). Störungen in der dopaminergen Neurotransmission sind die Ursache für verschiedene pathologische Zustände wie bspw. Schizophrenie (Seeman et al., 1987), Parkinson'sche Krankheit (Seeman et al., 1987), Gilles de la Tourette Syndrom (Peterson, 1996), Huntington'sche Krankheit (Ginovart et al., 1997) und bei Bewegungsstörungen wie der tardiven Dyskinesie (Kane et al., 1988; Youssef & Waddington, 1987).

Der Ausfall dopaminerger Übertragungswege in einzelnen Hirnbereichen führt zu unterschiedlichen Krankheitsbildern:

- Der Nigro-striatale Weg kontrolliert Bewegungen. Die Zerstörung dopaminerger Neurone im Striatum führt zur Parkinson'schen Krankheit (Hornykiewicz, 1966, Seeman et al., 1987).
- Das Meso-Cortico-Limbische System ist an der emotionalen Stabilität beteiligt. Eine Störung innerhalb dieses Weges führt zur Schizophrenie. Darüberhinaus wurde beschrieben, daß diese Hirnbereiche auch das Suchtverhalten bspw. bei der Abhängigkeit von verschiedenen Drogen wie Alkohol, Kokain, Amphetamine und Opiate steuern (Koob & Bloom, 1988; Koob, 1992a,b; Di Chiara, 1995; White, 1996). Der mesocorticolare dopaminerge Weg ist für emotionale motivierende und kognitive Funktionen wichtig und steuert Lern- und Gedächtnisleistungen (Le Moal & Simon, 1991; Civelli et al., 1993).
- Der Tuberoinfundibuläre Weg reguliert die Prolactin-Sekretion und hat einen Einfluß auf die Fruchtbarkeit.

Die Neurotransmitter Dopamin und Serotonin spielen eine wichtige Rolle bei Entwicklungs-, Lern- und Gedächtnisprozessen sowohl bei Vertebraten als auch bei Evertrebraten (Davis, 1996; Bailey et al., 1994; Byrne et al., 1993; Restifo & White, 1990). Ein Schlüsselenzym für die Biosynthese von Serotonin und Dopamin ist die Dopa-Decarboxylase. *Drosophila*-Mutanten, deren Gen für die Dopa-Decarboxylase defekt ist, sterben meist schon im

Embryonal- und frühen Larvalstadium aufgrund eines erhöhten Verzweigungsmusters der Nervenzellen. Wird dem Futtermedium Dopamin zugesetzt, entwickeln sich die Tiere normal. Im Gegensatz zu Dopamin ist die Zugabe von Serotonin wirkungslos (Budnik et al., 1989). Es wird vermutet, daß die Dopaminfreisetzung während der Entwicklung für die Wegfindung der Nervenendigungen notwendig ist. Unterbleibt die Freisetzung des Neurotransmitters, wachsen die Nervenfasern unkontrolliert weiter und führen schließlich zum Tod des Tieres. Alternativ könnte die Dopaminfreisetzung auch den Zelltod (Apoptose) einzelner Neurone einleiten.

Für die Einleitung einer zellulären Reaktion auf die Dopamin-Freisetzung sind spezifische Dopamin-Rezeptoren in der Zellmembran verantwortlich. Dopamin-Rezeptoren gehören zur Familie der Rhodopsin-ähnlichen Rezeptoren (Hepler & Gilman, 1992; Exton, 1994; Neer 1994). Bei Vertebraten sind sieben Dopamin-Rezeptor Subtypen bekannt. Die D1, D1_C, D1_D und D5-Rezeptoren bilden die Gruppe der D1-Rezeptoren. Die D2, D3 und D4-Rezeptoren bilden die Gruppe der D2-Rezeptoren (Gingrich & Caron, 1993; O'Dowd, 1993; Sugamori et al., 1994; Demchyshyn et al., 1995). Für alle Dopamin D1-Rezeptoren wurde beschrieben, daß sie Adenylatzyklasen stimulieren. Inzwischen wurde aber auch gezeigt, daß D1-Rezeptoren weitere Signalwege aktivieren, wie bspw. die Stimulierung von Phospholipasen, die zur Bildung von IP₃ und Ca²⁺-Freisetzung aus intrazellulären Speichern (Mahan et al., 1990; Undie et al., 1994), aber auch zur Aktivierung des Arachidonsäurestoffwechsels führen (Piomelli et al., 1991). Darüberhinaus wurde beschrieben, daß D1-Rezeptoren auch die Aktivität von Ca²⁺-, K⁺- und Na⁺-Ionenkanälen regulieren können (Laitinen 1993, Sidhu 1998). Im Gegensatz zu D1-Rezeptoren können die D2-Rezeptoren Adenylatzyklasen nicht aktivieren. D2-Rezeptoren inhibieren entweder die Adenylatzyklase oder verwenden andere Signalwege (Ginrich & Caron, 1993; O'Dowd, 1993).

Bei *Drosophila melanogaster* wurden bisher zwei Dopamin-Rezeptorgene identifiziert. Sowohl der DmDOP1, als auch der DAMB-Rezeptor gehören funktionell zur Familie der D1-Rezeptoren (Gotzes et al., 1994; Han et al., 1996). Die Aktivierung der Rezeptoren führt zu einer Steigerung der Adenylatzyklase-Aktivität und somit zur Erhöhung der intrazellulären cAMP-Konzentration. Der DmDOP1-Rezeptor wird im zentralen Nervensystem, in der Retina und in den Antennen exprimiert (Gotzes et al., 1994). Der DAMB-Rezeptor wird vor allem in den Pilzkörpern exprimiert, in denen die olfaktorische Wahrnehmung bei Insekten stattfindet. Im Gegensatz zu den Vertebraten D1-Rezeptorgenen, ist das DmDop1-Gen von Introns unterbrochen. Es kodiert für ein Protein von 511 Aminosäuren Länge mit einem Molekulargewicht von 55,9 kDa. Obwohl die funktionellen und pharmakologischen Eigenschaften der *Drosophila* Dopamin-Rezeptoren bereits gut charakterisiert sind, ist über die entwicklungs- und zellspezifische Regulation der Rezeptor-Genexpression bisher nichts bekannt.

1.4 Regulation der Rezeptor-Genexpression

Mit molekularbiologischen Methoden sind inzwischen die Sequenzen von mehr als 20 biogenen Amin-Rezeptoren aufgeklärt worden (Donnelly et al., 1994). Im Gegensatz dazu sind die Sequenzen der Promotoren dieser Gene bisher nur selten aufgeklärt und untersucht worden. Die meisten Rezeptoren werden gewebs- und entwicklungsspezifisch exprimiert. Um die Funktion der Rezeptoren zu unterschiedlichen Entwicklungsphasen bzw. in bestimmten Zelltypen besser verstehen und untersuchen zu können, ist es notwendig, die regulatorischen Bereiche der Rezeptorgene zu charakterisieren. Die Struktur eukaryontischer Promotoren der Klasse II, d.h. Promotoren von Genen, die von RNA-Polymerase II transkribiert werden, ist sehr komplex aufgebaut. Sie besitzen alle einen zentralen (Core)-Bereich, sowie weitere regulatorische Sequenzen, die in unterschiedlicher Entfernung in 5'- und 3'- Richtung vom Transkriptionsstartpunkt liegen (Abb. 3). An das Core-Element binden die Transkriptionsfaktoren wie bspw. TFII D, A, sowie I, B, F und E. Sie bilden mit der RNA-Polymerase II einen Präinitiationskomplex (Roeder, 1991). Einige Promotoren besitzen im Bereich des Transkriptionsstarts (+1) ein INR-Element. Im Bereich von -25 bis -30 bp vor dem Transkriptionsstart befindet sich in vielen, sogenannten Haushaltsgenen, eine TATA-Box. Im Bereich zwischen -150 und + 50 bp vom Transkriptionsstart werden häufig CAAT- und GC-reiche Elemente gefunden. An diese regulatorischen Sequenzen binden spezifische Transkriptionsfaktoren. Neben den zuletzt beschriebenen Sequenzmotiven wurden in Promotoren darüberhinaus Sequenzen identifiziert, die die Transkription herabsetzen (Silencer-Elemente) oder erhöhen (Enhancer-Elemente). Die Position der „Enhancer“ und „Silencer“-Sequenzen ist sehr variabel. Sie können sowohl im 5'- und 3'- Bereich vom Transkriptionsstart bzw. in Exons und Introns oder sogar in der transkribierten RNA (Ogbourne & Antalıs, 1998) liegen.

Es ist bekannt, daß die Transkription einer Vielzahl von Genen durch cAMP-abhängige Transkriptionsfaktoren wie CREB und AP2 reguliert wird (Mitchell & Tjian, 1989). Transkriptionsfaktoren wie bspw. CREB (cAMP-responsive element binding protein) werden im Zellkern von Proteinkinase A phosphoryliert. Erst in der aktivierten, d.h. phosphorylierten Form kann CREB an CRE-Sequenzen (cAMP-responsive element) bestimmter Promotoren binden und die Transkription des Gens regulieren (Sassone-Corsi, 1995). Rezeptoren, die die intrazelluläre cAMP-Konzentration erhöhen, können durch Aktivierung von CREB die eigene Genexpression steuern. Diese Autoregulation ist bspw. für den menschlichen Dopamin D1-Rezeptor gezeigt worden (Minowa et al., 1996).

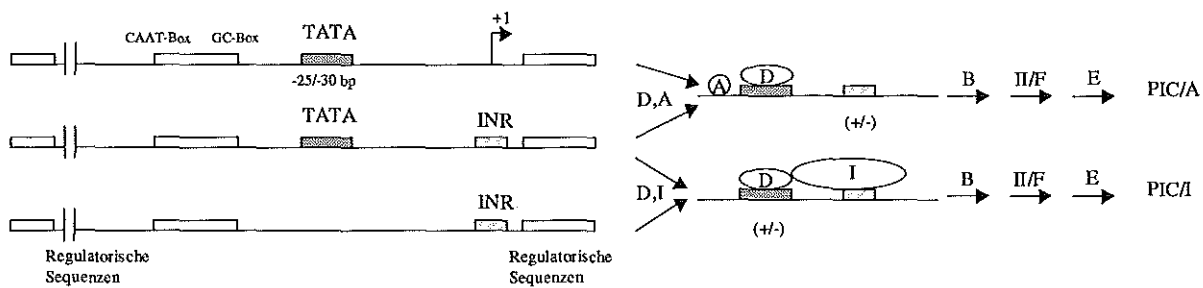


Abb. 3.: Schematische Darstellung eukaryontischer Promotoren und ihre Transkriptionskomplexe (aus Roeder, 1991). Es werden drei Typen eukaryontischer Promotoren der Klasse II unterschieden: Die TATA⁺INR⁻ (oberste Abb.), die TATA⁺INR⁺ (mittlere Abb.) und die TATA⁻INR⁺ (untere Abb.) Promotoren. An die zentralen Sequenzen binden Transkriptionsfaktoren wie bspw. TFII D, A bzw. I, B, F und E und bilden zusammen mit der RNA-Polymerase II den Präinitiationskomplex (PIC)/A bzw. PIC/I. TATA⁺INR⁺-Promotoren sind in der Lage, sowohl den PIC/A als auch PIC/I zu bilden.

1.5 Zielsetzung der Arbeit

Bisher wurden die Promotoren des menschlichen Dopamin D1- und D5-Rezeptors (Minowa et al., 1993; Lee et al., 1996; Beischlag et al., 1995) sowie des Dopamin D2-Rezeptors aus der Ratte (Minowa et al., 1992) kloniert. Über die Struktur und Funktion der Promotoren der Evertrebraten-Rezeptoren ist nichts bekannt. Ziel dieser Arbeit ist es, den Promotor des DmDOP1-Rezeptors zu klonieren. F. Gotzes hat das Gen in seiner Doktorarbeit kloniert und den Rezeptor pharmakologisch charakterisiert. Die cDNA ist 2538 Bp lang und besitzt einen offenen Leserahmen von 1533 Bp. Vermutlich ist der 5'- und 3'-nicht-translatierte Bereich unvollständig. Für die Klonierung und Charakterisierung des Promotors ist es wichtig, die noch fehlenden Sequenzabschnitte zu isolieren. Danach sollen einige Fragen beantwortet werden:

- 1.) Wird das DmDop1-Gen von einem starken oder schwachen Promotor reguliert?
- 2.) Ist der Promotor nur in neuronalen Zellen aktiv?
- 3.) Können regulatorische Bereiche bzw. Transkriptionsfaktoren identifiziert werden, die Rückschlüsse auf die gewebspezifische oder ggf. entwicklungsspezifische Regulation zulassen?
- 4.) Kann das Rezeptorgen durch cAMP-abhängige Transkriptionsfaktoren reguliert werden?

2. Material und Methoden

2.1. Chemikalien und Enzyme

Die in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien wurden von den Firmen Biomol (Hamburg), Merck (Darmstadt), Pharmacia (Freiburg), Qiagen (Hilden), Serva (Heidelberg) und Sigma (Deisenhofen) bezogen. Chemikalien zur Synthese von Oligonukleotiden wurden von der Firma MWG (Ebersberg) geliefert.

Enzyme und die dazugehörigen Puffer wurden von Ambion (Austin, Texas, USA), Biometra (Göttingen), Boehringer (Mannheim), GIBCO BRL (Eggenstein), NEB (Schwalbach), Pharmacia (Freiburg), Promega (Heidelberg), Stratagene (Heidelberg) und USB (Bad Homburg) bezogen. Das LB-Medium wurde von der Firma Sigma (Deisenhofen) geliefert.

[α -³⁵S]dATP mit einer spezifischen Aktivität von >1000 Ci/mmol, [α -³²P]dCTP mit einer spezifischen Aktivität von >6000 Ci/mmol und [γ -³²P]ATP mit einer spezifischen Aktivität von >5000 Ci/mmol wurden von der Firma Amersham (Braunschweig) bezogen. Die Autoradiographien wurden unter Verwendung von X-OMATTMAR-Filmen der Firma Kodak (Rochester) durchgeführt. Nylonmembranen für den Transfer von Nukleinsäuren wurden von der Firma Qiagen (Hilden) geliefert.

Falls nicht anders angegeben, wurden die hier beschriebenen Methoden aus Sambrook et al. (1989) übernommen oder in Anlehnung daran modifiziert.

2.2 Stämme und Medien

2.2.1 Bakterienstämme

Im Rahmen dieser Arbeit wurden folgende *Escherichia coli* K12 Bakterienstämme eingesetzt:

Der Stamm XL1-Blue (Bullock et al., 1987) (*recA1*, *endA1*, *gyrA96*, *thi-1*, *hsdR17*, *supE44*, *relA1*, *lac*, [*F**proAB*, *lacI*^q*Z* Δ M15, Tn10(*tet*^r)]]) wurde zur Anreicherung von pBluescript-Derivaten verwendet.

Der Stamm K 802 (Biolabs) (*e14*⁻(*McrA*⁻), *mcrB1*, *hsdR2*, *galK2*, *galT22*, *supE44*, *metB1*) wurde zur Anreicherung von λ Charon 4A-Phagen eingesetzt (Blattner et al., 1977).

Für die Expression der pQE-Fusionsproteine wurde der *E.coli* Stamm M15 (pREP4) verwendet.

2.2.2 Medien zur Anzucht von Bakterien

Bakterienkulturen wurden in LB-Medium (10g/l Bacto-Trypton, 5g/l Hefeextrakt, 10g/l Natriumchlorid) bei 37°C kultiviert. LB-Agar enthielt zusätzlich 1,5 % Agar. Flüssigkulturen wurden in einem Rotationsinkubator (New Brunswick, Nürtingen) oder in einem Warmluftschüttler (Braun-Dissel, Melsungen) angezogen. Für die Selektion auf plasmidkodierte Antibiotikaresistenz wurde dem Medium Ampicillin in einer Konzentration von 100 µg/ml zugesetzt. Für Plasmid-Präparationen wurden Kulturen verwendet, die mindestens 8 Stunden bei 37°C inkubiert wurden.

2.2.3 α -Komplementation

Zur Identifizierung rekombinanter Plasmide wurde dem Agar 40 µg/ml X-Gal (5 Bromo-4 Chlor-3-Indolyl/ β -D-Galaktopyranosid) in Dimethylformamid und 20 µg/ml IPTG (Isopropyl- β -D-thiogalaktosid) in Wasser zugesetzt.

Plasmide, die das *lacZ* Gen tragen, kodieren für das α -Peptid der β -Galaktosidase. Das IPTG induziert die Bildung der β -Galaktosidase, die das Substrat X-Gal spaltet. Durch die Klonierung eines DNA-Fragmentes in die kodierende Region des α -Peptids, geht die Fähigkeit zur α -Komplementation verloren. Dadurch kann der Stamm XL1-Blue keine enzymatisch aktive β -Galaktosidase bilden. Kolonien, in denen enzymatisch aktive β -Galaktosidase gebildet wird, sind blau gefärbt. Kolonien mit rekombinanten Plasmiden sind deshalb weiß.

2.3 Zelllinien und Medien

2.3.1 Zelllinien

Im Rahmen dieser Arbeit wurden folgende Zelllinien verwendet:

HEK293-Zellen, menschliche embryonale Nierenzelllinie (Fa. ECACC Nr. 85120602, UK)
SK.N.SH-Zellen, menschliche Neuroblastom-Epithelzellen (Fa. ECACC Nr. 86012802, UK)
Neuro2a-Zellen, Maus-Albino Neuroblastom-Tumorzellen (Fa. ECACC Nr. 89121404, UK)
Drosophila Schneider2-Zellen (S2-Zellen), embryonale *Drosophila melanogaster* Zelllinie (Invitrogen Lot 702868, Schneider 1972).

2.3.2 Medien zur Anzucht von Zelllinien

HEK293- und Neuro2a-Zellen wurden mit „Minimal Essential Medium“ (MEM, Gibco), das mit 10% fötalem Kälberserum (Gibco), 10 ml/l Antibiotika/Antimykotika Lösung (100x, Gibco), 10 ml/l 0,2 M L-Glutamin (Gibco), sowie 10 ml/l nicht essentiellen Aminosäuren (100x Gibco) versetzt war, kultiviert (Laborbezeichnung M10).

SK.N.SH-Zellen wurden mit „Dulbecco's modified Eagles medium with 4,5g/l glucose“ (DMEM, Sigma), das 10% fötales Kälberserum (Gibco), 10 ml/l Antibiotika/Antimykotika Lösung (100x Gibco) und 10 ml/l 0,2 M L-Glutamin (Gibco) erhielt, kultiviert (Laborbezeichnung DM+).

Die Anzucht der aufgeführten Zelllinien erfolgte bei 5% CO₂, 95% Luftfeuchtigkeit und 37°C in einem Brutschrank (Heraeus Instruments BB6060).

Schneider2-Zellen wurden mit DESTM Expressionsmedium, dem 10% hitzeinaktiviertes fötales Kälberserum, 50U Penicillin G/l und 50 µg Streptomycinsulfat/l hinzugefügt wurde (Laborbezeichnung DES+), bei 24°C in einem Brutschrank kultiviert.

2.4 Fliegenstämme (*Drosophila melanogaster*)

Zur Isolierung von RNA wurde der *Drosophila melanogaster* Stamm *Oregon R* (Wildtyp) benutzt.

2.5 Fliegenhaltung

Etwa 500 Fliegen wurden in Polystyrol-Zuchtröhrchen (Greiner, Ø 50 mm) gehalten, die zu 5-10 % mit Nährmedium (7g/l Agar, 7,5 g/l Bäckerhefe, 60g/l Kristallzucker, 100g/l Maisgrieß, 1,25 g/l Nipagin (4-Hydroxy Benzoessäure-Methylester), 1 g/l Vitamin C) gefüllt waren. Die Aufzucht der Fliegen erfolgte bei 25 °C, 80 % Luftfeuchtigkeit und 12-stündigem Tag/Nacht-Rhythmus in einem Brutschrank (RUMED, Rubarth Apparate GmbH).

2.6 Plasmide

Für Subklonierungen wurde das Plasmid pBluescript I SK – (Stratagene, Short et al., 1988) benutzt. Die Transfektionen zur Bestimmung der CAT-Reportergenaktivitäten erfolgten mit den Vektoren pCAT^R3-Basic, pCAT^R3-Enhancer, pCAT^R3-Control und pCAT^R3-Promotor (Groskreutz et al. 1995, Promega Notes). Die Transfektionseffizienz wurde durch

Cotransfektion des Plasmides pSV- β -Galactosidase (Promega) mit den oben genannten CAT-Vektoren bestimmt.

Die Herstellung der DmDop1-Fusionsproteine erfolgte mit dem Vektor pQE30 (Qiagen, 1997).

2.7 Genbibliotheken

Die verwendete genomische Bibliothek aus *Drosophila melanogaster* wurde von T. Maniatis (Maniatis et al., 1978) aus Embryonen des Wildtyp-Stamms *Canton S* hergestellt. Die DNA wurde mechanisch gesichert und mit synthetischen Eco RI-Linkern versehen.

2.8 Größenstandards

DNA-Größenstandard

λ (c1857*ind1Sam7*)-DNA, EcoRI/HindIII geschnitten: 500 ng/7,5 μ l

Fragmentgrößen: 21.226, 5.148, 4.973, 4.268, 3.530, 2.027, 1.904, 1.584, 1.375, 947, 831, 564, 125 Bp

Protein-Größenstandard

LMW-Größenstandard (Proteine mit niedriger Molmasse; Pharmacia): 1,2 μ g/ μ l in 1x SDS-Probenpuffer.

Bandengrößen: 94 kDa (Phosphorylase b aus Kaninchenmuskel), 67 kDa (Albumin aus Rinderserum), 43 kDa (Ovalbumin aus Hühnereiweiß), 30 kDa (Carboanhydrase aus Rinder-Erythrozyten), 20 kDa (Trypsin-Inhibitor aus Sojabohne), 14 kDa (α -Lactalbumin aus Kuhmilch).

2.9 Synthese und Reinigung von Oligonukleotiden

Oligonukleotide wurden mit einem DNA-Synthesizer (Applied Biosystems 391) synthetisiert. Für die Reinigung der Oligonukleotide wurde das Säulenmaterial in Ammoniak überführt und in H_2O bei 55°C inkubiert. Nach Evaporation des Ammoniaks wurden die Oligonukleotide in H_2O resuspendiert und mit Ethanol gefällt.

Die Sequenzen der in dieser Arbeit verwendeten Oligonukleotide sind im Anhang aufgeführt.

2.10 Quantifizierung von Nukleinsäuren

2.10.1 Photometrische Bestimmung

Für die photometrische Bestimmung wurde die Extinktion der DNA-Lösung bei 260 und 280 nm (Schichtdicke: 1 cm) bestimmt. Eine Absorption $A_{260} = 1$ entspricht 50 µg/ml doppelsträngiger DNA, 40 µg/ml RNA bzw. 33 µg/ml einzelsträngiger Oligonukleotide. Der Quotient der Extinktionen bei 260 und 280 nm beträgt bei einer reinen DNA-Lösung 2.

2.10.2 Ethidiumbromid-Fluoreszenz

Für die Konzentrationsbestimmung mit Hilfe der Ethidiumbromid-Fluoreszenz wurde die DNA-Lösung und ein DNA-Standard bekannter Konzentration (2.8) in einem Agarosegel (2.13.3) in Gegenwart von Ethidiumbromid (Endkonzentration 1 µg/ml) aufgetrennt. Ein Vergleich der Fluoreszenz-Intensitäten der Banden unter UV-Licht (302 nm) erlaubte eine Konzentrationsabschätzung.

2.11 Präparation von Nukleinsäuren

2.11.1 Präparation von Plasmid-DNA aus *E. coli*

2.11.1.1 Mini-Präparation

Plasmid-Präparationen wurden durch alkalische Lyse nach der Methode von Birnboim und Doly (1979) durchgeführt. Die pelletierten Bakterienzellen aus 1,5 ml Kulturvolumen wurden in 100 µl Lösung I (50 mM Glucose, 25 mM Tris/HCl pH 8,0, 10 mM EDTA) resuspendiert und mit 200 µl Lösung II (0,2 M NaOH, 1% SDS) lysiert. SDS, Proteine und bakterielle DNA wurden nach Zugabe von 150 µl Lösung III (3 M K-Acetat, pH 4,8) gefällt.

Nach Zentrifugation (18.000 x g, 10 min, 4°C) wurde der Überstand einmal mit Phenol/Chloroform (1:1) und einmal mit Chloroform extrahiert und die Nukleinsäuren durch Zugabe von 1 ml Ethanol gefällt. Die Nukleinsäuren wurden mit 70% Ethanol gewaschen, getrocknet und in 20 µl TE-Puffer (10 mM Tris/HCl pH 7,4, 1 mM EDTA pH 8,0) resuspendiert.

2.11.1.2 Midi-Präparation

Bakterienzellen aus 50 ml Kulturvolumen wurden sedimentiert (5.000 x g, 10 min, 4°C), in 5 ml Lösung I (2.11.1.1) resuspendiert und mit 10 ml Lösung II lysiert. SDS, Proteine sowie bakterielle DNA wurden mit 10 ml Lösung III gefällt. Nach Zentrifugation (5.000 x g, 10 min, 4°C) wurde der Überstand filtriert und mit 15 ml Isopropanol versetzt. Die gefällten Nukleinsäuren wurden durch Zentrifugation sedimentiert (5.000 x g, 10 min, 4°C). Das Pellet wurde in 1,45 ml H₂O gelöst und die RNA durch Zugabe von 2,5 ml 4 M LiCl-Lösung und 50 µl 1 M Tris/HCl pH 7,5 gefällt. Nach erneuter Zentrifugation (5.000 x g, 10 min, 4°C) wurde der Überstand mit 10 ml Ethanol versetzt und 1 h bei -20°C inkubiert. Die Nukleinsäuren wurden sedimentiert (5.000 x g, 10 min, 4°C), in 500 µl TE-Puffer (2.11.1) resuspendiert und die restliche RNA durch Zugabe von 2 µl RNase-Cocktail (Ambion) 30 min bei 37°C verdaut. Die Lösung wurde zweimal mit Phenol/Chloroform (1:1) und zweimal mit Chloroform extrahiert. Die wässrige Phase wurde mit 50 µl 3 M LiCl und 1,6 ml Ethanol versetzt und die DNA durch Zentrifugation sedimentiert (18.000 x g, 5 min, RT). Der Niederschlag wurde mit 70% Ethanol gewaschen, getrocknet und in 100 µl TE-Puffer resuspendiert.

2.11.2 Präparation von λ-Phagen-DNA

2.11.2.1 Herstellung von Mg²⁺-Zellen

Für die Herstellung von Mg²⁺-Zellen wurde der *E.coli*-Bakterienstamm Y1090 und K802 verwendet.

50 ml LB-Medium, das zusätzlich 10-20 mM MgCl₂ und 0,2% Maltose enthielt, wurden mit einer Einzelkolonie des *E.coli* Stamms beimpft und 6-8 h bei 37°C inkubiert. Die Suspension wurde zentrifugiert (5000 x g, 15 min, 4°C) und die sedimentierten Zellen in 10 mM MgSO₄ resuspendiert, so daß die Lösung eine OD₆₀₀ von 10 aufwies.

2.11.2.2 Anzucht von λ-Phagen auf NZY-Platten

Mg²⁺-Zellen (2.11.2.1) wurden mit dem benötigten Volumen der Phagensuspension versetzt und 15 min bei 37°C inkubiert. Nach Zugabe von 3-10 ml vorgewärmtem (50°C) NZY-Top-Medium (NZY: 10 g/l NZ-Amine, 5g/l Hefeextrakt, 5 g/l NaCl, 2 g/l MgSO₄ x 7 H₂O; für Top-Medium zusätzlich 7 g/l Agarose) wurde der Ansatz auf NZY-Platten (NZY mit 15 g/l Agar) verteilt und üN bei 37°C inkubiert.

2.11.2.3 Präparation von λ -Phagen-DNA aus kleinen Lysaten

Die Präparation erfolgte nach der von Santos (1991) beschriebenen Methode. 50 μl Mg^{2+} -Zellen des benötigten Bakterienstammes wurden mit 2-5 μl des Phageneluats versetzt. Der Ansatz wurde 15 min bei 37°C inkubiert, anschließend in 5 ml NZY-Medium überführt und bis zur Lyse der Bakterien im Rotationsinkubator bei 37°C inkubiert. Das Phagenlysat wurde mit 2 μl DNaseI (1 mg/ml) und 2 μl RNase-Cocktail (Ambion) 20 min bei 37°C inkubiert. Nach Zugabe von 100 μl 2 M ZnCl_2 -Lösung wurde die Inkubation für weitere 5 min bei 37°C fortgesetzt. Die Lösung wurde zentrifugiert (5000 x g, 10 min, 4°C). Der Niederschlag wurde in 500 μl TES-Puffer (0,1 M Tris/HCl pH 8,0, 0,1 M EDTA pH 8,0, 0,3% SDS) resuspendiert und 15 min bei 60°C inkubiert. Nach Zugabe von 60 μl 3 M KAc pH 4,8 erfolgte eine 5 min. Zentrifugation (18.000 x g, 5 min, 4°C). Der Überstand wurde zweimal mit Phenol/Chloroform (1:1) und zweimal mit Chloroform extrahiert. Die wässrige Phase wurde mit dem 2,5-fachen Volumen Ethanol versetzt. Die Nukleinsäuren wurden abzentrifugiert (18.000 x g, 5 min, 4°C) und nach einmaligem Waschen mit 70% Ethanol in 50-100 μl TE-Puffer aufgenommen.

2.11.3 Präparation von Gesamt-RNA aus *Drosophila melanogaster* Gewebe

Die RNA aus Embryonen, Larven, Puppen und adulten Fliegen wurde mit der LiCl/Harnstoff-Methode isoliert.

Etwa 1 g Gewebe wurde in 7 ml Lösung I (5 M Harnstoff, 3 M LiCl) homogenisiert und die Zelltrümmer durch Zentrifugation (5000 x g, 15 min, RT) abgetrennt. Nach einer Inkubation von mindestens 4 h bei 4°C wurde die RNA sedimentiert (18.000 x g, 15 min, 4 °C) und in 500 μl Lösung II (50 mM Tris/HCl pH 7,5, 100 mM EDTA pH 8,0, 1 % SDS) resuspendiert. Nach zweimaliger Phenol/Chloroform- und Chloroform-Extraktion wurde die RNA mit Ethanol gefällt und in 50 μl TE-Puffer aufgenommen.

2.11.4 Anreicherung von poly (A)⁺-RNA aus Gesamt-RNA von *Drosophila melanogaster*

Die Anreicherung polyadenylierter RNA wurde mit OligotexTM von Qiagen nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Die Ausbeute wurde photometrisch bestimmt (2.10.1). Die poly (A)⁺-RNA wurde mit Ethanol gefällt und bei -20 °C gelagert.

2.12 Modifizierung von DNA-Fragmenten

2.12.1 Glätten überhängender Enden von DNA-Fragmenten

Zum Auffüllen überhängender 5'-Enden wurde 500 ng DNA mit 2 U Klenow-Fragment [EC 2.7.7.7] und 0,1 mM dNTPs in Restriktions-Puffer B (Boehringer) 30 min bei 37°C inkubiert. Das Klenow-Fragment der DNA-Polymerase I besitzt eine 3'→5'Exonuklease-Aktivität, so daß überhängende 3'-Enden ebenfalls entfernt werden.

2.12.2 Phosphorylierung der 5'-Enden von DNA-Fragmenten

Da PCR-Fragmente keine endständigen 5'-Phosphat-Gruppen besitzen, wurden sie vor der Ligation in Vektoren phosphoryliert. Die DNA wurde mit 5-10 U T4-Polynukleotidkinase [EC 7.1.78] (Boehringer) in dem mitgelieferten Puffer und 1 mM ATP 30 min bei 37°C inkubiert. Nach 10 min. Hitze-Inaktivierung der Kinase bei 65°C wurden die Fragmente für die Ligation eingesetzt. Wurde vor der Phosphorylierungsreaktion eine Klenow-Reaktion durchgeführt, mußten die Desoxynukleotide entweder durch Ethanol-Fällung oder durch Agarosegel-Gelelektrophorese (2.13.3) entfernt werden.

2.12.3 Dephosphorylierung von DNA-Fragmenten

Für die Dephosphorylierung wurden 5 µg linearisierte DNA mit 1 U alkalischer Phosphatase [EC 3.1.3.1] (Boehringer) in dem mitgelieferten Puffer 1 h bei 37°C inkubiert. Die Phosphatase wurde durch Zugabe von 0,1 Volumen 250 mM EGTA und 30 min Inkubation bei 65°C inaktiviert. Nach zweimaliger Phenol/Chloroform- und Chloroform-Extraktion wurde die DNA entweder ethanolgefällt oder in einem Agarosegel aufgetrennt (2.13.3).

2.13 Analyse von DNA

2.13.1 Restriktionen

1 µg Plasmid-DNA wurde mit einem 2 bis 3-fachen Überschuß an Enzymeinheiten eine Stunde in dem vom Hersteller gelieferten Puffer und der angegebenen Temperatur inkubiert. Die Proben wurden entweder in einem Agarosegel (2.13.3) aufgetrennt oder mit Phenol/Chloroform (1:1) extrahiert und mit Ethanol gefällt.

2.13.2 DNA-Sequenzierung

Die Sequenzierung wurde nach der Didesoxy-Kettenabbruch-Methode von Sanger et al. (1977) durchgeführt. Es wurde das Sequenase Kit Version 2.0 (USB) nach Angaben des Herstellers benutzt. Die doppelsträngige DNA wurde vor der Reaktion alkalisch denaturiert. Zur radioaktiven Markierung wurde pro Reaktion 2,5 μCi [α - ^{35}S]dATP eingesetzt.

Zur Auflösung von Kompressionen wurden einige Proben z.T. mit dem Deaza G/A $^{77}\text{Sequencing}^{\text{TM}}$ Mix der Firma Pharmacia sequenziert.

Die Sequenzierreaktionen wurden in 0,4 mm dicken, denaturierenden Polyacrylamid-Gelen (6% Acrylamid/Bisacrylamid 19:1, 8 M Harnstoff, 1x TBE) in einer S2 Sequenzierkammer von Gibco BRL aufgetrennt. Als Laufpuffer diente 1x TBE. Die Elektrophorese wurde bei 60 W etwa 2,5 bis 3 h durchgeführt. Für die Analyse von DNA-Bereichen, die sich in weiterem Abstand zum Sequenzierprimer befanden, wurde die Elektrophorese bei 60 W für 5,5 bis 6 h oder bei 20 W für 15-18 h durchgeführt.

Das Gel wurde 15 min fixiert (5 % Ethanol, 5 % Essigsäure), auf ein Filterpapier (Whatman 3MM) übertragen und 45 min im Vakuum bei 80°C getrocknet (Gel Dryer 583, Biorad). Der Nachweis der Fragmente erfolgte durch Autoradiographie über Nacht (RT).

2.13.3 Agarose-Gelelektrophorese

Zur Auftrennung von DNA-Fragmenten wurden horizontale Agarosegele benutzt. Die Konzentration der Agarose variierte zwischen 0,5 % (Auftrennung von Fragmenten >5000 Bp) und 2% (Auftrennung von Fragmenten <500 Bp). Die Ethidiumbromid-Konzentration im Gel und Puffer betrug 1 $\mu\text{g/ml}$. Vor dem Auftragen wurden die Proben mit 1/5 Volumen Probenpuffer (100 mM EDTA, 20% Ficoll400, 0,01% Bromphenolblau, 0,01% Xylencyanol) versetzt. Die Elektrophorese wurde bei 60 bis 140 V durchgeführt. Als Puffersystem diente 1x TBE (50 mM Tris/Borat pH 7,8, 1 mM EDTA pH 8,0).

2.13.4 Isolierung von DNA aus Agarosegelen

Die Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen wurde mit der Zentrifugationsmethode (Heery et al., 1990) durchgeführt. Hierzu wurde das obere Drittel eines Eppendorfreaktionsgefäßes entfernt, der Boden mit einer Kanüle durchstoßen und mit silanisierter Glaswatte gefüllt. Das Agarosestück, das das gewünschte DNA-Fragment enthielt, wurde auf die Glaswatte gelegt. Das Reaktionsgefäß wurde in ein zweites Gefäß gesetzt und in einer Eppendorfzentrifuge bei 9000 x g, 10 min bei RT zentrifugiert. Das Eluat enthielt das DNA-Fragment.

2.14 Klonierung von DNA-Fragmenten

2.14.1 Ligation von DNA

Für Ligationen wurden die zu ligierenden Fragmente in einem molaren Verhältnis von 3:1 bis 10:1 (Insert:Vektorfragment) eingesetzt. Der Reaktionsansatz wurde mit T4-DNA-Ligase (1 U/ μ l) [EC 6.5.1.1] und dem vom Hersteller (Pharmacia) gelieferten Inkubationspuffer 1 h bis 16 h bei 16°C inkubiert.

2.14.2 Herstellung kompetenter Zellen

50 ml LB-Medium wurde mit einer Bakterienkultur angeimpft und bis zu einer OD₆₀₀ von 0,4 bei 37°C inkubiert und 10 min auf Eis abgekühlt. Die Zellen wurden zentrifugiert (3000 x g, 10 min, 4°C), in 25 ml 100 mM CaCl₂ resuspendiert und 20 min auf Eis inkubiert. Nach erneuter Zentrifugation wurden die Zellen in 5 ml kaltem 100 mM CaCl₂/30% Glycerin resuspendiert und 2 bis 4 h auf Eis inkubiert. Die Zellen wurden aliquotiert und bei -80°C gelagert.

2.14.3 Transformation von *E. coli*

Der Ligationsansatz wurde mit 100 μ l kompetenter Zellen versetzt und 30 min auf Eis inkubiert. Die Zellen wurden auf LB-Agarplatten (LB-Medium mit 15 g/l Agar), die das benötigte Antibiotikum enthielten, ausplattiert.

Für Retransformationen von Plasmiden wurde eine Pipettenspitze in die Plasmid-Lösung getaucht und mit den kompetenten Zellen gemischt. Der Ansatz wurde für 30 min auf Eis inkubiert und ausplattiert (s.o).

Alternativ hierzu wurde der Retransformatiosansatz direkt in 50 ml LB-Medium (mit dem entsprechenden Antibiotikum) pipettiert. Die Kulturen wurden für mindestens 8 h bei 37°C im Warmluftschüttler inkubiert (2.2.2).

2.14.4 Subklonierung von genomischer DNA aus λ -Phagen

DNA-Inserts wurden mit Restriktionsendonukleasen aus λ Charon 4A-Phagen isoliert (2.11.2.3) und gelelektrophoretisch von den Vektor-Fragmenten getrennt (2.13.3). Anschließend wurden die Fragmente aus dem Gel eluiert (2.13.4) und in den Vektor pBlueskript SK- ligiert (2.14.1).

2.15 Amplifizierung von DNA mittels Polymerase-Ketten Reaktion (PCR)

Die Polymerase-Ketten Reaktion (PCR) wurde in Geräten von Perkin Elmer oder Biometra durchgeführt. Die für die PCR eingesetzten Oligonukleotide werden als Primer bezeichnet. Ein Standard-Ansatz (100 µl) hatte folgende Zusammensetzung:

Plasmid-DNA: 20 pg
Primer: 10 ng/Base (d.h. für einen Primer mit 17 B 170 ng/µl)
1x PCR-Puffer (Biometra)
0,2 mM dNTPs
2,5 U PrimeZyme (Biometra)

Die Amplifikation der DNA erfolgte mit 7-45 Zyklen.

Reaktionsbedingungen:

Denaturierung: 94°C, 40 s (bei der ersten Denaturierung 2,5 min)

Hybridisierungsreaktion: Schmelztemperatur (T_m der Primer minus 2°C) (wobei jeweils die niedrigere Schmelztemperatur der beiden Primer als T_m benutzt wurde), 40 s

Berechnung von T_m : $T_m = (G+C) \times 4^\circ\text{C} + (A+T) \times 2^\circ\text{C} - \text{Fehlbasenpaarung} \times 4^\circ\text{C}$

Polymerasereaktion: 72°C, 40 s

Die Ansätze wurden mit Phenol/Chloroform und Chloroform extrahiert und die DNA mit Ethanol gefällt.

Zum Einfügen von Schnittstellen wurden Oligonukleotide benutzt, deren Sequenz so verändert war, daß die gewünschte Mutation bei der PCR generiert wurde.

2.16 Herstellung von cDNA aus poly (A)⁺-RNA aus *Drosophila melanogaster* Geweben

Für die Durchführung von PCR-Reaktionen auf poly (A)⁺-RNA mußte zunächst der komplementäre DNA-Strang synthetisiert werden. Ein 20 µl Ansatz hatte folgende Zusammensetzung:

poly (A)⁺-RNA: ca. 400 – 800 ng
Primer: genspezifisch oder oligo-dT-anchor-Primer (5'-RACE-Kit von Boehringer)

1x cDNA Synthese-Puffer

1mM Desoxynukleotid-Gemisch

19,5 U RNA-guard

20 U AMV Reverse Transkriptase bzw. M-MLV Reverse Transkriptase

Der Annealing-Ansatz (poly (A)⁺-RNA und Primer) wurde 10 min bei 65 °C inkubiert, direkt auf Eis abgekühlt und kurz zentrifugiert, bevor die weiteren Komponenten zugefügt wurden. Die cDNA-Synthese erfolgte für 1 h bei 48 °C. Anschließend wurde die Reverse Transkriptase für 10 min bei 65 °C inaktiviert.

2.17 Amplifizierung von cDNA-Enden („RACE“)

2.17.1 Amplifizierung von 5'-Enden mittels „5'-RACE“

Die 5'-RACE (rapid amplification of cDNA-ends)-Methode ermöglicht die Identifizierung von unbekannten 5'-Enden eukaryontischer Gene. Im ersten Schritt erfolgt die Synthese von cDNA aus poly(A)⁺-RNA. Durch zwei sich anschließende PCR-Reaktionen wurde das gewünschte 5'-Ende amplifiziert. Die Experimente wurden nach Angaben des Herstellers unter Verwendung des 5'-RACE-Kits (Fa. Boehringer) durchgeführt.

cDNA-Synthese:

Für die cDNA-Synthese (2.16) wurde ca. 400 ng poly(A)⁺-RNA aus *Drosophila melanogaster* Köpfen, ein genspezifischer Primer (#1631, s. Anhang, 0,03 µM) und die AMV-Reverse Transkriptase eingesetzt.

Reinigung der cDNA:

Vor der „Tailing“-Reaktion (s.u.) wurden nicht eingebaute Nukleotide und Primer aus dem cDNA-Syntheseansatz entfernt. Die Reinigung erfolgte mit dem „High-Pure PCR-Product Purification-Kit“ der Firma Boehringer.

„Tailing“-Reaktion:

Poly (A)⁺-RNA besitzt am 5'-Ende keinen poly(A)⁺-Sequenzabschnitt, wie am 3'-Ende des Moleküls. Damit der oligo-dT-anchor-Primer in der 1. PCR an das 5'-Ende hybridisieren konnte, mußte ein künstliches poly(A)⁺-Ende mit Hilfe der Terminalen Transferase angefügt werden. Hierfür wurde 19 µl der gereinigten cDNA, 1x Reaktionspuffer und 0,2 mM dATP eingesetzt. Der Ansatz wurde 3 min bei 94 °C inkubiert, direkt auf Eis abgekühlt und kurz zentrifugiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 10 U Terminaler Transferase gestartet und erfolgte für 10 min bei 37 °C. Die Terminale Transferase wurde 10 min bei 68 °C inaktiviert. Die modifizierte cDNA konnte direkt für die 1. PCR eingesetzt werden.

1. PCR:

Die 1. PCR wurde, wie in 2.15 beschrieben durchgeführt. Für die PCR wurde 10 % der dA-„getailten“ cDNA, 0,75 µM oligo-dT-anchor-Primer, 0,01 µM des genspezifischen Primers #1630 (s. Anhang) eingesetzt.

Die Amplifikation der DNA erfolgte mit 7 Zyklen und einer Annealing-Temperatur von 37 °C (oligo-dT-anchor-Primer), dann mit 35 Zyklen und einer Annealing Temperatur bei 62 °C (genspezifischer Primer #1630).

2. PCR:

Da nach der 1. PCR häufig kein spezifisches Produkt erhalten wird, wurde eine 2. PCR mit einem weiteren genspezifischen Primer, sowie dem sogenannten PCR anchor-Primer (s. Anhang) durchgeführt (2.15). Hierfür wurde 1 µl des 1. PCR Ansatzes, 0,25 µM des PCR anchor- Primers und 0,01 µM des genspezifischen Primers #1636 (s. Anhang) eingesetzt. Die Amplifikation der DNA erfolgte mit 35 Zyklen und einer Annealing Temperatur von 64 °C (genspezifischer Primer #1636). Das amplifizierte Fragment wurde mit (1:1) Phenol/Chloroform und Chloroform extrahiert, geleluert (2.13.4) und für die Klonierung in einen pBluescript SK- Vektor eingesetzt.

2.17.2 Amplifizierung von 3'-Enden mittels „3'-RACE“

Die 3'-RACE-Methode ermöglicht die Identifizierung von unbekannten 3'-Enden eukaryontischer Gene. Für das Experiment wurde das 3'-RACE-Kit von Boehringer verwendet. Die cDNA-Synthese erfolgte mit 800 ng poly(A)⁺-RNA aus *Drosophila melanogaster* Köpfen und dem oligo-dT-anchor-Primer (1,9 µM). Sie wurde wie in (2.16) beschrieben, durchgeführt. Im Anschluß an die Synthese erfolgte eine PCR mit dem PCR anchor-Primer (0,25 µM) und dem genspezifischen Primer # 265 (s. Anhang).

Die Amplifikation der DNA wurde mit 45 Zyklen und einer Annealing Temperatur von 46 °C (genspezifischer Primer #265) durchgeführt. Die Aufarbeitung des PCR-Produktes erfolgte analog zur 5'-RACE (2.17.1).

2.18 In situ Hybridisierung an Gewebeschnitten von *Drosophila melanogaster*

2.18.1 Herstellung von Sonden mittels *in vitro* Transkription

5 µg der Plasmid-Konstrukte wurden linearisiert und mit 40 U T3- oder T7-RNA-Polymerase (Promega) [EC 2.7.7.6] transkribiert (Melton et al., 1984).

Die Inkubation erfolgte für 2 h bei 37°C in 40 mM Tris/HCl pH 7,2, 6 mM MgCl₂, 10 mM DTT, je 0,5 mM ATP, CTP, GTP, sowie 0,21 mM UTP, 0,56 mM DIG-UTP, 0,5 U/µl und RNAGuard (Pharmacia)

Die DNA-Matrize wurde durch 30 min. Inkubation mit 10 U DNase I (RNase frei, Boehringer) abgebaut. Die RNA wurde mit Ethanol präzipitiert und in H₂O resuspendiert. Die Konzentration und Markierungseffizienz der Transkripte wurde durch einen "Tüpfeltest" (Boehringer-Protokoll, 1992) und eine Southern-Blot Hybridisierung ermittelt. Die Transkripte wurden bei -20°C gelagert.

2.18.2 Anfertigung von Gewebeschnitten

Die Köpfe adulter Tiere wurden in Einbettmedium (Tissue-TEK, Miles Inc., USA) überführt und in flüssigem Stickstoff eingefroren. Von den Köpfen wurden 10 µm dicke Horizontalschnitte in einem Kryostaten (2800 Frigocut E, Reichert/Jung/Leica) bei einer Umgebungstemperatur von -32°C und einer Objekttemperatur von -28°C angefertigt.

Die Schnitte wurden auf silanisierte Objektträger (s.u.) überführt und 5 min bei 40°C inkubiert. Sie wurden 20 min in 4 % Paraformaldehyd in PBS fixiert und dann 5 min in PBS gewaschen. Anschließend wurde je 2 min in 30% Ethanol, 50% Ethanol, 70% Ethanol und 90% Ethanol bei RT inkubiert. Die Präparate wurden in absolutem Ethanol bis zu ihrer Verwendung bei 4 °C gelagert. Für die Silanisierung wurden die Objektträger 5 min in 0,2 % Pollfix 100 (3-Methacryloxypropyl-trimethoxysilan) in 50% Ethanol inkubiert und dann üN bei 80 °C getrocknet.

2.18.3 Hybridisierung der Gewebeschnitte

Vor der Hybridisierung wurden die Gewebeschnitte 5 min in 2x SSC (20x SSC = 3 M NaCl, 0,3 M Na-Citrat pH 7,0) bei RT, 30 min in 2x SSC bei 70°C und 1 min in H₂O bei RT inkubiert. Danach wurde 2 min bei RT in einer Proteinase K-Lösung (4µg/ml) inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 0,2% Glycin in PBS abgestoppt. Die Schnitte wurden erneut fixiert (2.18.2) und an der Luft getrocknet. Die Hybridisierung erfolgte in 50% Formamid, 5x SSC, 0,1% Tween-20, 100 µg/ml Heringssperma-DNA und 50 µg/ml Heparin und 500 ng DIG-markierter RNA (2.18.1) für 12-14 h bei 42°C. Die Präparate wurden 3x 2 h

bei 37°C in 50% Formamid, 2x SSC gewaschen. Der Nachweis der Hybride erfolgte nach den Angaben des Herstellers (Boehringer).

2.19 Hybridisierungen an Quetschpräparaten polytärer Speicheldrüsen-Chromosomen

2.19.1 Chromosomenpräparation

Die Quetschpräparate polytärer Speicheldrüsenchromosomen wurden nach einer von Pardue (1985) beschriebenen Methode angefertigt und in absolutem Ethanol gelagert. Zur Rehydratisierung wurde jeweils 2 min in 95% Ethanol, 70% Ethanol, 50% Ethanol, 30% Ethanol und 0,1x SSC inkubiert.

Darauf folgte ein Hitzeschritt in 2x SSC für 30 min bei 65°C.

Danach wurden die Präparate 1,5 min in 0,1 M NaOH denaturiert, zweimal je 1 min in 2x SSC inkubiert und dann 2 min in einer aufsteigenden Alkoholreihe dehydratisiert (30%, 50%, 70%, 95% Ethanol).

2.19.2 Markierung von DNA mit Digoxigenin gekoppeltem Desoxyuridin-triphosphat

Die Markierungsreaktion wurde nach einem Originalprotokoll der Firma Boehringer durchgeführt.

Markierungsansatz:

- 1 µg DNA
- 2 µl Hexanukleotidgemisch
- 2 µl Markierungsmix (je 1 mM dATP, dCTP, dGTP,
0,65 mM dTTP, 0,35 mM DIG-dUTP)
- 1 µl Klenow
- ad 20 µl H₂O

Vor und nach der Markierungsreaktion wurde die DNA für 10 min bei 95°C denaturiert. Der denaturierte Markierungsansatz wurde auf 2x SSC, 0,1% SDS eingestellt und auf 200 µl aufgefüllt.

2.19.3 Hybridisierungsreaktion mit DIG-dUTP markierter DNA

Auf jeden Objektträger wurden 10 µl Digoxigenin-markierte DNA pipettiert. Ein Deckglas wurde aufgelegt und mit "Fixogum" (Marabu) abgedichtet. Die Hybridisierung erfolgte in bei 65°C in einer feuchten Kammer. Zur Entfernung der unspezifisch gebundenen DNA wurden die Präparate zweimal 10 min bei RT in 2x SSC und 2 min in 1x PBS gewaschen.

2.19.4 Nachweis der Hybride

Der Nachweis der Hybride wurde nach den Angaben des Herstellers unter Verwendung des Antikörperkonjugates <DIG>-AP (Anti-Digoxigenin-Alkalische-Phosphatase-Konjugat) durchgeführt. Die überschüssigen Reagenzien wurden durch eine Inkubation mit 1x PBS (5 min, RT) entfernt. Die Präparate wurden anschließend mit Glycerin/Gelatine eingebettet und lichtmikroskopisch ausgewertet.

2.20 Identifizierung von spezifischen Nukleinsäuren

2.20.1 Markierung von Nukleinsäuren

Die DNA-Fragmente, die als Sonde für Hybridisierungen eingesetzt werden sollten, wurden radioaktiv nach der "random priming" Methode (Feinberg & Vogelstein, 1983) markiert. Es wurde das "Megaprime DNA Labeling system" der Firma Amersham benutzt. Die Reaktionen wurden nach den Angaben des Herstellers durchgeführt. Nicht eingebaute Nukleotide wurden durch Gelfiltration (Sephadex G75, Pharmacia) abgetrennt. Die Einbaurate wurde in einem Szintillationszähler (Tricarb 2000 CA, United Technologies Packart) bestimmt.

2.20.2 Transfer von DNA („Southern-Blot“)

Der Transfer von Nukleinsäuren auf Membranen wurde, wie von Meinkoth & Wahl (1984) beschrieben, durchgeführt. Für einen Southern-Blot wurde die DNA, die auf die Nylonmembran übertragen werden sollte, zuerst in einem Agarosegel aufgetrennt (2.13.3). Das Gel wurde 5-15 min in Denaturierungslösung (0,5 M NaOH, 1,5 M NaCl) auf einem Taumler (GFL 3012, GFL) bei RT inkubiert, kurz in H₂O gewaschen und 5-15 min in Neutralisierungslösung (0,5 M Tris/HCl pH 7,5, 1,5 M NaCl) neutralisiert. Der Transfer auf die Nylonmembran (Qiabrane, Qiagen) erfolgte mit 20x SSC (3 M NaCl, 0,3 M Na-Citrat pH 7,0) in 3 bis 12 h.

Die Herstellung der Filterabzüge von cDNA bzw. genomischen DNA-Bibliotheken auf Nylonmembranen erfolgte in Anlehnung an die von Benton und Davis (1977) beschriebene Methode. Auf die abgekühlte NZY-Agarplatte wurde die Nylonmembran luftblasenfrei aufgelegt. Zur späteren Orientierung wurde die Position der Membran durch Einstiche mit einer heißen Kanüle markiert.

Die Filterabzüge wurden 5 min denaturiert (0,5 M NaOH, 1,5 M NaCl) und 5 min neutralisiert (0,5 M Tris/HCl pH 7,5, 1,5 M NaCl). Die transferierten Nukleinsäuren wurden durch UV-Quervernetzung (254 nm, 0,12 J/cm², Stratallinker, Stratagene) immobilisiert.

2.20.3 Hybridisierung und Detektion

Die Inkubationen wurden in einem Hybridisierungssofen (GFL 7601 bzw. Biometra APT line) in Spezialflaschen durchgeführt. Die Hybridisierungs- bzw. Waschbedingungen und die verwendeten Puffer sind in der folgenden Tabelle zusammengefasst.

Tab. 1: Hybridisierungsbedingungen. Die Prähybridisierung wurde in der jeweiligen Hybridisierungslösung (HL, Tab. 2) bei der angegebenen Temperatur für 1-3 h ohne markierte Sonde durchgeführt.

	stringent	stringent
Prähybridisierung	HL1	HL2
Hybridisierung	HL1	HL2
Sonde (cpm/ml)	10^6	10^6
Temperatur	42°C	65°C
Dauer	10-14 h	10-14 h
Waschpuffer	WP1	WP1
Temperatur	63-65°C	63-65°C
Dauer	2 x 30 min	2 x 30 min

Tab. 2: Hybridisierungslösungen (HL) und Waschpuffer (WP).

	HL1	HL2	WP1
SET* ¹	5x	5x	1x
Denhardts* ²	5x	5x	
SDS	0,1%	0,1%	0,1%
Heringssperma-DNA	0,1 mg/ml	0,1 mg/ml	
Formamid	50%		

*¹ 1x SET: 150 mM NaCl, 20 mM Tris/HCl pH 7,4, 1 mM EDTA pH 8,0.

*² 1x Denhardts: je 0,2 g/l BSA (Rinderserumalbumin), Ficoll400, Polyvinylpyrrolidon

Die auf den Membranen verbliebene Radioaktivität wurde durch Autoradiographie nachgewiesen. Der Nachweis von ^{32}P erfolgte für 4 bis 120 h bei -80°C mit Verstärkerfolien (Cronex Hi plus, Du Pont).

2.20.4 Transfer von Poly(A)⁺ RNA („Northern-Blot“)

Für einen Northern-Blot wurde die RNA, die auf die Nylonmembranen übertragen werden sollte, elektrophoretisch in denaturierenden Formaldehyd/Agarosegelen (2.20.5) aufgetrennt. Die Gele wurde zweimal 10 min in DEPC-behandeltem H_2O inkubiert, um das Formaldehyd zu entfernen. Der Transfer erfolgte mit 20x SSC für 4-12 h bei RT.

Die transferierten Nukleinsäuren wurden durch UV-Quervernetzung (254 nm, 0,12 J/cm², Stratalinker, Stratagene) oder 2 h Inkubation bei 80 °C immobilisiert.

2.20.5 Denaturierende Agarose-Gelelektrophorese

Für die Auftrennung von RNA-Molekülen wurden denaturierende, 0,75 % Agarosegele in 1x MOPS-Puffer (10 mM MOPS/Acetate pH 7,0, 1 mM EDTA), die 1,1 % Formaldehyd enthalten, benutzt. Die Elektrophorese wurde in 1 x MOPS-Laufpuffer durchgeführt. Die Proben sowie der Größenstandard wurden vor dem Auftragen in 1 x MOPS-Laufpuffer, 6,5 % Formaldehyd, 50 % Formamid aufgenommen und 5 min bei 60 °C denaturiert. Danach wurden 0,2 x Volumen RNA-Probenpuffer (50 % Glycerin, 10 mM Tris/HCl pH 7,8, je 0,01 % Bromphenolblau und Xylencyanol) zugegeben. Die Elektrophorese erfolgte für ca. 3-4 h bei 40 mV. Danach wurde das Gel zur Entfernung des Formaldehyds zweimal 10 min in DEPC-behandeltem H_2O inkubiert und mit Ethidiumbromidlösung (10 µg/ml) nachgefärbt. Wenn die RNA auf eine Nylonmembran transferiert werden sollte (Northern-Blot, 2.20.4), wurde keine Ethidiumbromidfärbung durchgeführt.

2.21 „Primer-Extension“-Analyse

Für die „Primer Extension“-Analyse wurde ein genspezifischer Primer von 33 Basen Länge (# 1894, s. Anhang) am 5'-Ende mit radioaktivem [γ - ^{32}P] ATP phosphoryliert. Die Reaktion erfolgte mit 100 ng des Oligonukleotides, 250 µCi [γ - ^{32}P] ATP, 10x Kinase-Puffer und 45 U T4- Polynukleotidkinase für 45 min bei 37 °C. Nach 10 min. Inaktivierung der Kinase bei 68 °C wurde nicht eingebautes [γ - ^{32}P] ATP über eine Sephadex-G25 Säule abgetrennt.

Die Hybridisierung erfolgte mit 10⁶ cpm des radioaktiv markierten Oligonukleotids und 5 µg poly (A)⁺-RNA aus *Drosophila melanogaster* Köpfen. Als Kontrollreaktion wurde statt der poly (A)⁺-RNA, 5 µg tRNA eingesetzt. Der Hybridisierungsansatz wurde 10 min mit Ethanol gefällt, das Pellet in 10 µl Puffer (200mM NaCl, 0,05 M Pipes, pH 6,4) aufgenommen und 6 h bei 60 °C inkubiert. Zum Hybridisierungsansatz wurde 5x cDNA-Synthesepuffer, 1mM DTT,

je 1 mM dNTPs, 19,5 U RNA-guard und 10 µg BSA hinzugegeben. Die Reaktion wurde mit 200 U M-MLV gestartet und erfolgte für 1 h bei 42 °C. Die Ansätze wurden 1:100 gefällt, mit Probenpuffer (2.13.2) versehen und auf ein denaturierendes Polyacrylamid-Sequenzgel (2.13.2) aufgetragen.

2.22 Immunologischer Nachweis von Proteinen („Western-Blot“)

2.22.1 Expression von Fusionsproteinen

Für die Expression der Fusionsproteine des Dopamin D1-Rezeptors aus *Drosophila melanogaster* (pQEDmDop1) wurde 250 ml LB-Medium mit Ampicillin (100 µg/ml) und Kanamycin (25 µg/ml) 2 ml einer Vorkultur frisch transformierte M15-Zellen beimpft und bei 37 °C bis zu einer OD₆₀₀ = 0,5 inkubiert. Die Expression der Fusionsproteine wurde mit 0,5 µM IPTG für 3h induziert. Die Zellen wurden 10 min bei 5000 rpm pelletiert, in 10 ml TE aufgenommen und 10x 30 sek sonifiziert. Nach erneuter Zentrifugation wurde der Überstand (lösliche Fraktion) und das Pellet (unlösliche Fraktion) getrennt aufbewahrt. Das Pellet wurde in 1,3 ml TE resuspendiert. Von beiden Fraktionen wurden 15 µl (0,12 % des Kulturvolumens) auf ein 12,5 % denaturierendes Polyacrylamidgel (2.22.3) aufgetragen. Das Fusionsprotein war zum größten Teil in der unlöslichen Fraktion. Deshalb erfolgte die Aufreinigung unter denaturierenden Bedingungen über eine Ni-NTA-Säule nach Protokoll 14 des Herstellers (Qiagen). Das Eluat wurde in einer Konzentration von 500 µg/ 2ml PBS für die Immunisierung eines Kaninchens eingesetzt.

2.22.2 Gesamtzellextrakt und Fraktionierung von *E. coli* Zellen

Für den Gesamtzellextrakt wurden gemäß einer OD₆₀₀-Bestimmung ca. 5 x 10⁸ Zellen in 25 µl 1 x SDS-Probenpuffer (0,8 % SDS, 0,5 % β-Mercaptoethanol, 25 mM Tris/HCl pH 7,6, 6,25 % Glycerin, 0,005 % Bromphenolblau) resuspendiert.

Die Fraktionierung von Zellen wurde, wie von Manoil & Beckwith (1986) beschrieben, durchgeführt.

Vor der Auftrennung der Proteine in PAA/SDS-Gelen wurden die Proben 10 min bei 95°C denaturiert.

2.22.3 Gelelektrophorese und Transfer von Proteinen

Die elektrophoretische Trennung der Proteine wurde nach Laemmli (1970) in 12,5%igen PAA/SDS-Gelen (Verhältnis Acrylamid:Bisacrylamid 37,5:1), die eine Dicke von 1mm hatten, durchgeführt. Hierfür wurde eine Minigel Twin Kammer (Biometra, Göttingen)

benutzt. Die Elektrophorese erfolgte bei 20 mA, bis die Bromphenolblau-Lauffront den unteren Gelrand erreicht hatte.

Der Transfer der Proteine wurde mit einer Biometra Fast Blot B33 Kammer nach den Angaben des Herstellers 30 min bei 5 mA/cm² Gelfläche durchgeführt. Als Blotfolie diente Immobilon P (Millipore).

Für die Gelshift-Assays wurde ein natives Polyacrylamidgel (Stratagene) verwendet. Die Elektrophorese erfolgte in einer Minigel Twin Kammer bei 25 mA, bis die Bromphenolblau-Lauffront 75 % der Laufstrecke erreicht hatte.

2.22.4 Immunologischer Nachweis der Fusionsproteine

Western-Blots wurden für 10 min bei RT in 1x PBS gewaschen. Die Membranen wurden für 1h bei 4°C in Blockierlösung (0,5 % (w/v) Magermilchpulver in PBS) inkubiert und anschließend für 5 min bei RT in Lösung I (0,02 % (v/v) Tween-20 in PBS) gewaschen. Die Membranen wurden mit 10 ml der Erstantikörper-Verdünnung (Immunserum, verdünnt in Lösung I) für 60 min bei RT inkubiert und danach viermal für 5 min bei RT in Lösung I gewaschen. Es erfolgte eine 10 min. Inkubation mit 10 ml der Zweitantikörper-Verdünnung (anti-rabbit-igG-HRP; 1:5000 verdünnt in Lösung II (0,02 % (v/v) Tween-20, 0,01 % (w/v) Magermilchpulver in PBS)). Die Membranen wurden 1x mit Lösung II und zweimal mit PBS für 5 min gewaschen. Zum Nachweis der gebundenen Antikörper wurden die Western Blot-Membranen 1 min bei RT in ECL-Inkubationslösung (Amersham) überführt und für 2-5 min ein Röntgenfilm aufgelegt. Die Laufstrecke der sichtbaren Banden wurde bestimmt und anhand des angefärbten Protein-Größenstandards (2.8) überprüft, ob das Fusionsprotein von den Erst-Antikörpern erkannt wurde.

2.23 Zellkultur

2.23.1 Kultivierung der Zellen

SK.N.SH-, HEK293-, Neuro2a- und S2-Schneider-Zellen wurden wie unter 2.3.2 beschrieben kultiviert. Die Teilungsrate der HEK293 Zellen war 24 h, der Neuro2a-Zellen 27 h und der SK.N.SH-Zellen 28 h. S2-Schneider-Zellen teilten sich in 34 h. Die Zellen wurden alle 3 bis 4 Tage neu ausgesät. Zur Ablösung der adherenten Zellen wurde 5 min mit Trypsin/EDTA bei 37°C inkubiert. Die Zellen wurden in M10 bzw. DM+-Medium (2.3.2) aufgenommen und 5 min bei 200 x g sedimentiert. Suspensionszellen (S2-Schneider Zellen) setzten sich nicht vollständig ab und wurden vor jedem Waschen mit PBS (pH 6,5) bei 1000 x g für 5 min zentrifugiert und das Pellet anschließend in DES+-Expressionsmedium (2.3.2) aufgenommen. Die exakte Zellzahl wurde mit einer Neubauer-Zählkammer bestimmt. Erhaltungsschalen wurden mit einer Dichte pro 90 mm Ø Schale von $5-10 \times 10^5$ Zellen (HEK 293), 23×10^5 (Neuro 2a), $5,8-17,5 \times 10^5$ bzw. 2×10^6 (S2-Schneider) ausgesät. Die Zellen wurden etwa 25 Passagen benutzt und dann durch ein neu aufgetautes Aliquot ersetzt.

2.23.2 Lagerung von Zelllinien in flüssigem Stickstoff

Langzeitlagerung:

Adherent wachsende Zellen:

Eine ca. 70 % konfluent bewachsene Petrischale (90 mm Ø) wurde zweimal mit 5 ml PBS gewaschen und die Zellen mit 1 ml Trypsin/EDTA bei 37°C abgelöst. Die Zellen wurden in 10 ml Medium (2.3.2) aufgenommen und bei 200 x g bzw. 1000 x g (S2-Schneider) für 5 min bei RT pelletiert. Das Zellpellet wurde in 1,8 ml Medium (2.3.2) resuspendiert und auf 2 Kryoröhrchen (Nunc) verteilt. Nach Zugabe von 0,1 ml DMSO wurde die Suspension sofort gemischt, über flüssigem Stickstoff eingefroren und anschließend in flüssigem Stickstoff gelagert.

Suspensionszellen:

S2-Schneider Suspensionszellen wurden bis zu einer Dichte von $1,5-2 \times 10^7$ Zellen/ml kultiviert, 5 min. bei 1000 x g zentrifugiert, das Pellet in 8 ml PBS gewaschen und erneut zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in 1,8 ml FBS (hitzeinaktiviert) resuspendiert und auf 2 Kryoröhrchen verteilt, die 0,1 ml DMSO enthielten. Das Einfrieren erfolgte wie bei adherenten Zellen.

Auftauen:

Die Zellen, die in flüssigem Stickstoff gelagert wurden, wurden bei 37 °C bzw. 30 °C (S2-Schneider-Zellen) aufgetaut. 1 ml Zellsuspension wurde tropfenweise in 10 ml Medium (2.3.2) gegeben, das auf 37 °C (bzw. 24°C) vorgewärmt war. Die Zellen wurden bei 200 x g bzw. 1000 x g (S2-Schneider-Zellen) für 5 min. bei RT sedimentiert und der Niederschlag in 3-5 ml Medium (2.3.2) resuspendiert. Diese Zellsuspension wurde auf zwei Petrischalen (90 mm Ø) verteilt, die bereits 8 ml Medium (2.3.2) enthielten. Die Zellen wurden wie unter 2.23.1 beschrieben kultiviert.

2.23.3 Transiente Expression (CaPO₄-Methode)

Die transiente Expression in SK.N.SH-, Neuro2a- und HEK293-Zellen erfolgte in Anlehnung an die von Chen und Okayama (1987) beschriebene Methode. Logarithmisch wachsende Zellen wurden 1-2 h vor der Transfektion mit frischem Medium (2.3.2) versetzt. Der Transfektionsansatz (siehe Tabelle 3) wurde 10-20 min bei RT inkubiert, dann tropfenweise auf die Zellen gegeben und durch vorsichtiges Schwenken der Schale gleichmäßig verteilt. HEK293- und Neuro 2a-Zellen wurden bei 35°C und 3% CO₂, SK.N.SH-Zellen bei 37°C und 5% CO₂, für 20-22 h inkubiert. Unter diesen Bedingungen entstand ein feines Präzipitat.

Tab. 3: Transfektionsansatz

Schalendurchmesser	50 mm
Fläche	20 cm ²
Zellzahl (HEK 293)	2 x 10 ⁵
Zellzahl (SK.N.SH, Neuro 2a)	5 x 10 ⁵
pCATEnh.-Promotorkonstrukt	6,5 µg
β-Galactosidase-Vektor	6,5 µg
H ₂ O	ad 124 µl
CaCl ₂	41,0 µl
2x BBS ^{*1}	165,0 µl
	330,0 µl

^{*1} 2x BBS pH 6,95: [50 mM BES (N,N-bis-(2-hydroxyethyl)-2-amino-ethansulfonsäure), 280 mM NaCl, 1,5 mM Na₂HPO₄ x 2H₂O]

Nach der Transfektion wurden die Zellen zweimal mit vorgewärmtem PBS gewaschen, um das CaPO₄-Präzipitat zu entfernen.

2.24 Herstellung von Zellextrakten

48 h nach der Transfektion (2.23) erfolgte die Herstellung der Zellextrakte aus SK.N.SH-, Neuro2a- und HEK293-Zellen. Hierfür wurde das CAT Enzym-Assay-System-Kit mit Reporter-Lysis-Puffer von Promega verwendet. Die Durchführung erfolgte nach den Angaben des Herstellers.

2.25 Aktivitätsbestimmung der Reporterenzyme

Für die Aktivitätsbestimmung der Reporterenzyme wurde ein konstantes Volumen der Zellextrakte (2.24) eingesetzt. Die Durchführung erfolgte mit dem CAT Enzym-Assay-System-Kit nach den Angaben der Firma Promega.

2.25.1 Chloramphenicol-Acetyltransferase (CAT)-Assay

Der CAT-Assay wurde durch Zugabe des Cofaktors (n-Butyryl Coenzym A) und 250 µCi [³H]-Chloramphenicol zu 50-100 µl der Zellextrakte (2.24) durchgeführt. Das Endvolumen betrug 125 µl. Die CAT-Reaktion erfolgte in N bei 37°C. n-Butyryl-[³H]-Chloramphenicol wurde von nicht umgesetzten [³H]-Chloramphenicol durch eine Xyloextraktion (Aldrich Cat.#24-764-2) abgetrennt und die Ausbeute im Flüssigkeits-Szintillationsmeßgerät bestimmt. Die CAT-Aktivität (mU) wurde mit Hilfe einer Standardkurve bestimmt.

CAT-Aktivität (mU) = cpm pCAT Enhancer/Promotorkonstrukt – cpm (gemessen in nicht transfizierte Zellen)

Die CAT-Aktivität wurde auf die in den gleichen Ansätzen mitbestimmte β-Galactosidase Aktivität (2.25.2) normiert.

2.25.2 β-Galaktosidase (β-Gal)-Assay

Für den β-Galactosidase-Assay wurden 50-100 µl der Zellextrakte (2.24) mit dem gleichen Volumen Assay 2x Puffer (Promega) verdünnt. Der Puffer enthielt das Substrat ONPG (o-Nitrophenyl-β-D-Galactopyranosid). Die Proben wurden 30 min bei 37 °C inkubiert. Während dieser Zeit wurde das farblose Substrat durch die β-Galactosidase zu gelbem o-Nitrophenol hydrolysiert. Die Reaktionen wurden mit 500 µl 1 M Natriumcarbonat gestoppt und die

Absorption im Photometer bei 420 nm bestimmt. Die β -Galactosidase Aktivitäten (mU) wurden mit Hilfe einer Standardkurve bestimmt.

2.26 Isolierung von Kern-Proteinen aus Säugerzellen

Die Isolierung der Kern-Proteine aus SK.N.SH-Zellen erfolgte nach der Methode von Dignam, 1983 modifiziert nach Hennighausen, 1987.

10^7 Zellen wurden für 10 min bei 200 x g, 4°C zentrifugiert. Die Zellen wurden in dem 10 fachen Pelletvolumen in Dulbecco's PBS (ohne Ca^{2+} und Mg^{2+}) resuspendiert und erneut zentrifugiert. Das Zellpellet wurde mit dem 5fachen Vol. 0,3 M Saccharose in Puffer A (10 mM HEPES-KOH pH 7,9, 10 mM KCl, 1,5 mM MgCl_2 , 0,1 mM EGTA, 0,5 mM DTT, 0,5 mM PMSF, 2 $\mu\text{g/ml}$ Pefablock und Benzamidin) resuspendiert. Die Zelllyse erfolgte in einem Dounce-Homogenisator (Kontes) (8-12 x mit Stößel B und 1-2 x nach Zugabe von 0,3-0,4 % Nonidet P-40). Das Homogenat wurde 10 min bei 1200 g zentrifugiert und die Kerne zweimal in 0,3 M Saccharose Puffer A ohne Nonidet P-40 gewaschen. Die Kerne wurden im Dounce-Homogenisator (10x, Stößel B) im 2,5fachen Volumen in Puffer B (400 mM NaCl, 10 mM HEPES-KOH pH 7,9, 1,5 mM MgCl_2 , 0,1 mM EGTA, 0,5 mM DTT, 5 % Glycerin, 0,5 mM PMSF) resuspendiert. Nach 30 min. Rühren bei 4 °C wurden die Kerne für 60 min zentrifugiert (100,000 g, Beckman, TL-45 Rotor), der Überstand abgenommen und für 2-4 h gegen 50 Volumen Puffer C (20 mM HEPES-KOH pH 7,9, 75 mM NaCl, 0,1 mM EDTA, 0,5 mM DTT, 20 % Glycerin, 0,5 mM PMSF) dialysiert. Der Kernextrakt wurde 15 min (25,000 g, 4°C Sigma) zentrifugiert. Der Extrakt wurde in kleinen Aliquots mit einer Proteinkonzentration von 3 mg/ml in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -70°C gelagert.

2.27 Gelshift-Assay

Protein-DNA Wechselwirkungen wurden durch Gelshift-Assays nachgewiesen. Hierfür wurde das GelShift™-Assay-Kit von Stratagene verwendet. Als Sonden dienten PCR bzw. Restriktionsfragmente aus dem DmDop1-Promotor. PCR-Fragmente wurden mit [γ - ^{32}P] ATP am 5'-Ende markiert. Für die Markierung (2.12.2) wurden 10 μCi [γ - ^{32}P] ATP und 10 ng des Fragmentes eingesetzt. Die Markierungsreaktion wurde mit 1 μl 0,5 M EDTA gestoppt und der Reaktionsansatz auf 100 μl mit TE aufgefüllt.

Nicht eingebaute Nukleotide wurden durch eine Fällung mit 5 M Ammoniumacetat und 2 Volumen Ethanol und einer nachfolgenden Fällung mit 1 M Ammoniumacetat abgetrennt. Das Pellet wurde in 100 μl TE gelöst und die Einbaurate des Nuklids im Szintillationsgerät bestimmt.

Die Restriktionsfragmente wurden mit dem Klenow-Fragment am 5'-Ende aufgefüllt (2.12.1). Für die Auffüllreaktion wurde 100 μCi [α - ^{32}P]dCTP eingesetzt. Die Trennung nicht

eingebauter Nukleotide erfolgte mit dem „High Pure PCR Produkt Purification Kit“ der Firma Boehringer.

Für den Gelshift Assay wurde 10,000-100,000 cpm des jeweiligen [³²P]-markierten Promotorfragments mit 1-5 µg Kernproteinextrakt sowie 17 µl Inkubationspuffer gemischt und mit H₂O auf 25 µl aufgefüllt. Für die Negativkontrollen wurde kein Proteinextrakt zugegeben. Die Proben wurden 10-30 min auf Eis inkubiert und nach Zugabe von 2 µl 0,1 % Bromphenolblau/100 % Glycerin auf ein natives Polyacrylamidgel (2.22.3) aufgetragen.

Das Gel wurde anschließend auf ein Filterpapier (Whatman 3MM) übertragen und 30 min im Vakuum bei 80°C getrocknet (Gel Dryer 583, Biorad). Der Nachweis der Fragmente erfolgte durch Autoradiographie über Nacht (-80°C).

3. Ergebnisse

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war die Klonierung und Charakterisierung der Promotorregion des Dopamin D1-Rezeptorgens aus *Drosophila melanogaster*. Das Rezeptorgen war von Florian Gotzes kloniert und pharmakologisch charakterisiert worden (Doktorarbeit von F. Gotzes, „Funktionelle Charakterisierung eines Dopamin-Rezeptors aus *Drosophila melanogaster*“). Die klonierte cDNA ist 2538 Bp lang und besitzt einen offenen Leserahmen von 1533 Bp. Am 3'-Ende der cDNA wurde kein poly (A)⁺-Bereich gefunden. Ein Polyadenylierungssignal (AATAAA) fehlt ebenfalls. Für eine weitere Charakterisierung des Rezeptorgens war es zunächst notwendig, die Transkriptgröße des DmDop1-Gens durch eine Northern-Blot-Analyse zu bestimmen.

3.1 Identifizierung des DmDop1-Promotors

3.1.1 Northern-Blot-Analyse

Die entwicklungsspezifische Transkription sowie die Transkriptgröße des DmDop1-Gens wurde mit einer Northern-Blot-Analyse (Abb. 4) aufgeklärt. Es wurden jeweils 5 µg poly (A)⁺-RNA (2.11.3/4) aus *Drosophila*-Embryonen, dem dritten Larvenstadium, späten Puppen sowie adulten Tieren (Kopf und Körper) in einem 0,75%igen denaturierenden Formaldehyd-Agarosegel gelelektrophoretisch aufgetrennt und auf eine Nylonmembran übertragen. Die Transkripte wurden mit einer 1865 Bp großen HindIII/XhoI-Sonde aus pKDmDop1, die vorher mit der „random primed“-Methode mit [α^{32} P]-dCTP markiert wurde (2.20.1), unter hoher Stringenz hybridisiert. pKDmDop1 wurde aus pBDmDop1, das die gesamte DmDop1-cDNA enthält, konstruiert (Dr. Arbeit, F. Gotzes). Dem Konstrukt fehlt im Gegensatz zu pBDmDop1 die 5'-nicht-translatierte Region des Gens vollständig. Es wurden Transkripte in der poly (A)⁺-RNA aus Embryonen, Puppen, Kopf und Körpern adulter Tiere mit einer Länge von ca. 11 kb, ca. 2,9 kb, ca. 2,3 kb und ca. 0,4 kb gefunden. Das ca. 11 kb große Transkript kommt nur in der poly (A)⁺-RNA aus Köpfen vor und ist vermutlich ein ungespleißtes Primärtranskript. Das ca. 2,9 kb große Transkript ist deutlich in der Spur zu erkennen, in der poly (A)⁺-RNA aus adulten Köpfen aufgetragen wurde. In der Original-Autoradiographie ist dieses Transkript auch in den Spuren zu erkennen, in denen poly (A)⁺-RNA aus Embryonen, Puppen und adulten Körpern aufgetragen wurde. Das 2,9 kb große Transkript ist wahrscheinlich das spezifische DmDop1-Transkript. Das 2,3 kb große Transkript könnte entweder ein alternatives Spleißprodukt des DmDOP1-Rezeptors sein, oder es könnte von einem weiteren, zum DmDop1-Gen sehr homologen Rezeptorgen stammen. Die 0,4 kb großen Transkripte sind zu klein, um einen vollständigen Rezeptor zu kodieren. Es wurde möglicherweise ein abgebautes Transkript oder ein Transkript, das der DmDop1-Sequenz sehr ähnliches ist, detektiert.

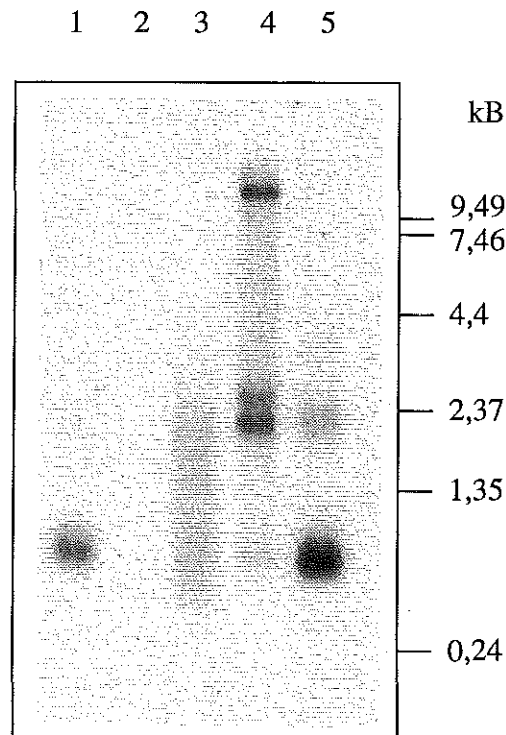


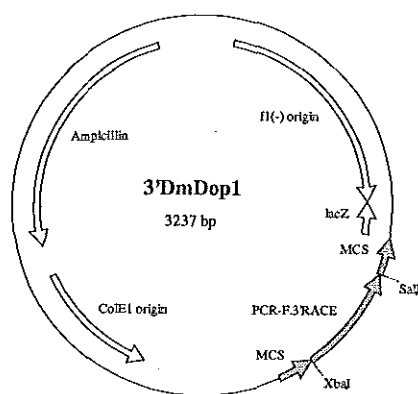
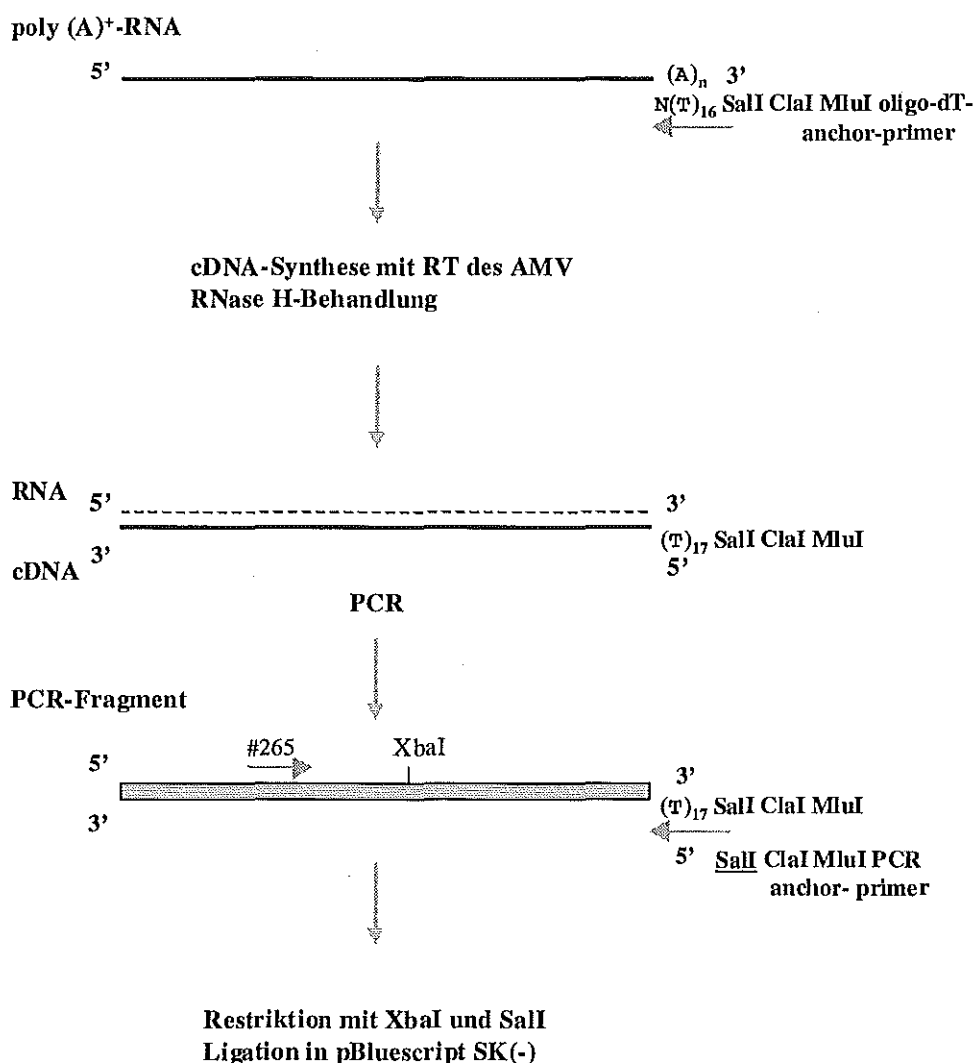
Abb. 4: Northern-Blot-Analyse der DmDop1 Transkripte. Es wurden jeweils 5 µg poly (A)⁺- RNA aufgetragen. Spur 1 = Embryo, Spur 2 = drittes Larvenstadium, Spur 3 = Puppe, Spur 4 = Kopf, Spur 5 = Körper. Die Transkripte wurden mit einer DmDop1-spezifischen Sonde hybridisiert. Die Fragmentgrößen des Größenstandards (eine 0,24-9,49 kB RNA-Leiter der Firma Gibco-BRL) sind rechts neben dem Autoradiogramm angegeben.

3.1.2 Isolierung der 3'-nicht-translatierten Region des DmDop1-Gens mit der 3'-RACE -Methode (Frohman, 1994)

In der Literatur wird beschrieben, daß cDNA-Bibliotheken, die mit oligo-dT-Primern hergestellt wurden, selten vollständige 5'- Enden enthalten (Carnici et al., 1996; Gibbons et al., 1991). Der Grund liegt in der Konstruktion der cDNA-Bibliotheken. Die Effizienz der Reversen-Transkriptase-Reaktion ist vermindert, wenn mRNAs stabile Sekundärstrukturen ausbilden (Carnici et al., 1996). Während der Synthese der ds-cDNA kann sich auch das 3'-Ende zurückfalten und ein sogenanntes „Self-Priming“ ermöglichen. Der entstehende „Hairpin-Loop“ muß vor der Ligation in einen geeigneten Vektor durch S1-Nukleasebehandlung aufgelöst werden. Dabei geht oft ein Teil der 5'-bzw. 3'-Sequenz verloren (Maniatis et al., 1976, Frohman et al., 1988).

Der DmDop1 cDNA-Klon besitzt am 3'-Ende keinen poly (A)⁺-Bereich. Daher wurde zunächst das fehlende 3'-Ende mit der 3'-RACE (rapid amplification of cDNA-ends)-Methode (2.17.2) isoliert (Frohman et al., 1988; Frohman, 1994) (Abb. 5A). Die cDNA-Synthese erfolgte mit dem oligo-dT-anchor-Primer (s. Anhang). Für die PCR wurden zwei spezifische Oligonukleotide, der anchor-Primer (s. Anhang), und Primer #265 (s. Anhang), verwendet. Ein Teil des PCR-Ansatzes wurde gelelektrophoretisch aufgetrennt. Es wurde ein Fragment von ca. 400 Bp amplifiziert. Da in dem Gel noch weitere Produkte zu erkennen waren, wurde die DNA auf eine Nylonmembran transferiert (2.20.2). Der Southern-Blot wurde mit einer spezifischen 1435 Bp großen BamHI/EcoRI-Sonde aus pBDmDop1 (3.1.1) unter hoher Stringenz (2.20.3) hybridisiert. In der Autoradiographie wurde nur das 400 Bp große Hauptprodukt detektiert. Der restliche PCR-Ansatz wurde zur Klonierung des 3'-Endes, wie unter 2.17.1 beschrieben, weiterbehandelt und mit den Restriktionsenzymen XbaI und SalI geschnitten. XbaI schneidet bei Nukleotid 2259 in der DmDop1-Sequenz; die SalI-Schnittstelle wurde durch den PCR anchor-Primer eingefügt. Das resultierende 279 Bp große Fragment wurde in einen mit XbaI/SalI geschnittenen pBluescript SK(-)-Vektor ligiert. Sechs Subklone wurden mit dem Oligonukleotid #uni sequenziert (2.13.2). Die ermittelte Sequenz war vollkommen identisch mit der schon bekannten 3'-cDNA-Sequenz des DmDop1-Gens. Unmittelbar an diese Sequenz schließt sich das poly (A)⁺-Ende der mRNA an (Abb. 5B).

A



B

TCTAGATGTAAGTCCCACTAGCAAAAAGAATACAAATCGGAAAAACAAATCGAAAACCAAACCGAAACGTGATT
 AGGTCTAAGATCTTCAACCCGGCACCTAAGAGAGCTTCTAGTTAAGTTTCTGTTTGGATATTCATGGCGGTTTGT
 CTCCATGCAAATGCGATTATTATGGAGTGACACATGTCACTTGCCACATTTCTCACTCACTCACTCACCCATACA
 AACAAACAAGCAAACACACACACGCACACAACAACAAACACTCAGATACATGGG (A)₁₆

Abb. 5 : A) Schematische Darstellung der 3'-RACE. Die cDNA-Synthese wurde mit der RT (Reversen Transkriptase) des AMV (Avian-Myeloblastose-Virus) durchgeführt. Die 3'-RACE und die Konstruktion des 3'DmDop1-Subklons sind im Text erläutert. Das 3'-RACE-Fragment wurde für die Subklonierung über XbaI und Sall in die multiple Klonierungsstelle (MCS) des pBluescript SK(-) ligiert. Ampicillin = Ampicillin-Resistenzgen (kodiert für β -Lactamase); ColE1 = Colicin-Gen; lacZ = Gen für α -Peptid der β -Galaktosidase; fl (-) origin = Replikationsstart des filamentösen Phagen fl. **B) Nukleinsäuresequenz der 3'-RACE-Klone.** Die Sequenz der 3'-RACE Klone ist identisch mit dem 3'-nichttranslatierten Ende der DmDop1-cDNA. Unmittelbar an das bekannte 3'-Ende schließt sich der poly (A)⁺-Bereich der mRNA an. Die XbaI-Klonierungsstelle ist unterstrichen. Die Sall-Klonierungsstelle ist hier nicht aufgeführt.

3.1.3 Isolierung der fehlenden 5'-nicht-translatierten Region des DmDop1-Gens mit der 5'-RACE -Methode (Frohman, 1994)

Das DmDop1-Gen besteht aus sechs Exons und fünf Introns (Gotzes et al, 1994). Für die Klonierung der fehlenden 5'-Region wurde die 5'-RACE-Methode eingesetzt (Frohman, 1994) (2.17.1.). Hiefür wurden drei spezifische Primer verwendet (Abb. 6A), der Primer #1631 hybridisiert bei Nukleotid 381 bis Nukleotid 361, Primer #1630 bei Nukleotid 197 bis Nukleotid 176 und Primer #1636 bei Nukleotid 52 bis Nukleotid 29 in der bekannten DmDop1-Sequenz (s. Anhang). Das Oligonukleotid #1631 wurde als spezifischer Primer für die cDNA-Synthese eingesetzt. Nach der Reinigung (2.17.1) des Syntheseansatzes wurde die cDNA polyadenyliert (2.17.1). Die cDNA wurde unter Verwendung des oligo-dT-anchor-Primers und des Primers #1630 durch PCR amplifiziert. Die zweite PCR wurde mit zwei spezifischen Oligonukleotiden, dem anchor-Primer und dem Primer #1636 durchgeführt. Ein Teil des PCR-Ansatzes wurde auf einem 2 %-igen Agarosegel gelelektrophoretisch aufgetrennt. Es entstand ein Produkt von ca. 180 Bp. Die DNA wurde auf eine Nylonmembran transferiert und mit einer spezifischen 584 Bp großen EcoRI-Sonde aus pBDmDop1 (3.1.1) unter hoher Stringenz hybridisiert. In der Autoradiographie wurde das 180 Bp große RACE-Produkt detektiert. Das PCR-Fragment wurde aus dem Gel eluiert und nach Auffüllen der Enden (2.12.1) und Phosphorylierung der 5'-Enden (2.12.2) in einen mit EcoRV

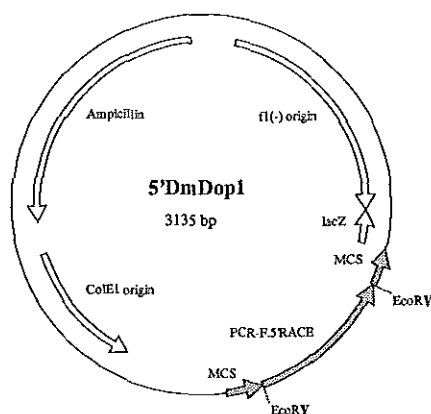
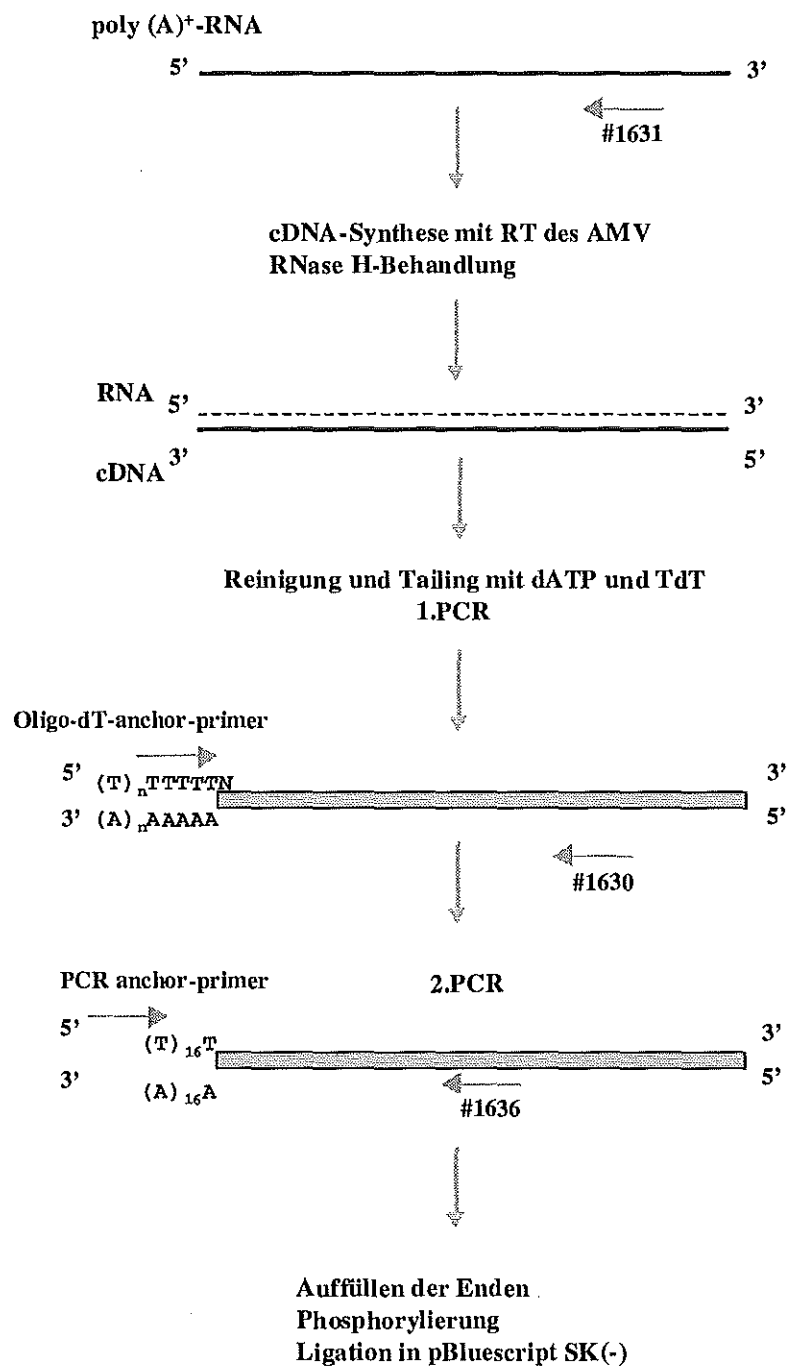
geschnittenen pBluescript SK (-)-Vektor (5'DmDop1) subkloniert (2.14.1). Die Plasmid-DNA von 40 unabhängigen Klonen wurde präpariert und mit EcoRI und HindIII geschnitten. Bei 21 Klonen entstanden drei Restriktionsfragmente: Das Vektorfragment, sowie das 5'-RACE-Fragment, das durch die interne EcoRI-Schnittstelle nochmals in ein ca. 130 Bp und ca. 50 Bp großes Fragment zerfällt. Das 50 Bp Fragment enthält die bekannte DmDop1-Sequenz. Es wurde erneut eine Southern-Blot-Analyse durchgeführt. Die Hybridisierung erfolgte mit der oben genannten Sonde. Das Autoradiogramm ist in Abb. 6B dargestellt. Bei den o.g. 21 Klonen hybridisierte das ca. 50 Bp große Fragment mit der Sonde. Bei den übrigen 19 Klonen wurde kein Fragment detektiert. Alle Subklone wurden mit den Primern #uni und #rev (s. Anhang) sequenziert. Die Sequenzen der Subklone waren untereinander identisch. Das größte Fragment enthielt 125 Bp unbekannter DmDop1-Sequenz (Tab. 4). Die 5'-RACE wurde zweimal mit verschiedenen mRNA-Präparation wiederholt. Die anschließende Sequenzierung der Subklone, die aus dem zweiten und dritten 5'-RACE-Experiment erhalten wurden, bestätigte das Ergebnis des ersten RACE Experiments. Die maximale Verlängerung in 5'-Richtung beträgt 125 Bp. In der nachstehenden Tabelle sind die Klone ihrer Anzahl und Größe entsprechend aufgeführt.

Tab. 4: Verlängerung der 5'-RACE-Klone

Sequenzverlängerung	Anzahl der Klone	Sequenzlänge (Bp)
<u>G</u> ACAGTCGACGTTTCAGCCTTCAG . . .	3	125
<u>C</u> AGTCGACGTTTCAGCCTTCAG . . .	9	123
<u>A</u> GTCGACGTTTCAGCCTTCAG . . .	8	122
<u>G</u> TCGACGTTTCAGCCTTCAG . . .	2	121
<u>C</u> GACGTTTCAGCCTTCAG . . .	1	119
<u>A</u> G . . .	1	104
<u>G</u> . . .	1	103

In der Tabelle sind die 5'-Startsequenzen der erhaltenen 5'-RACE-Klone gezeigt. Die Anzahl der Klone, die aus 3 unabhängigen RACE-Experimenten erhalten wurden und eine identische Sequenzlänge besaßen, ist angegeben. Das Startnukleotid der 5'-RACE-Sequenz ist unterstrichen dargestellt.

A



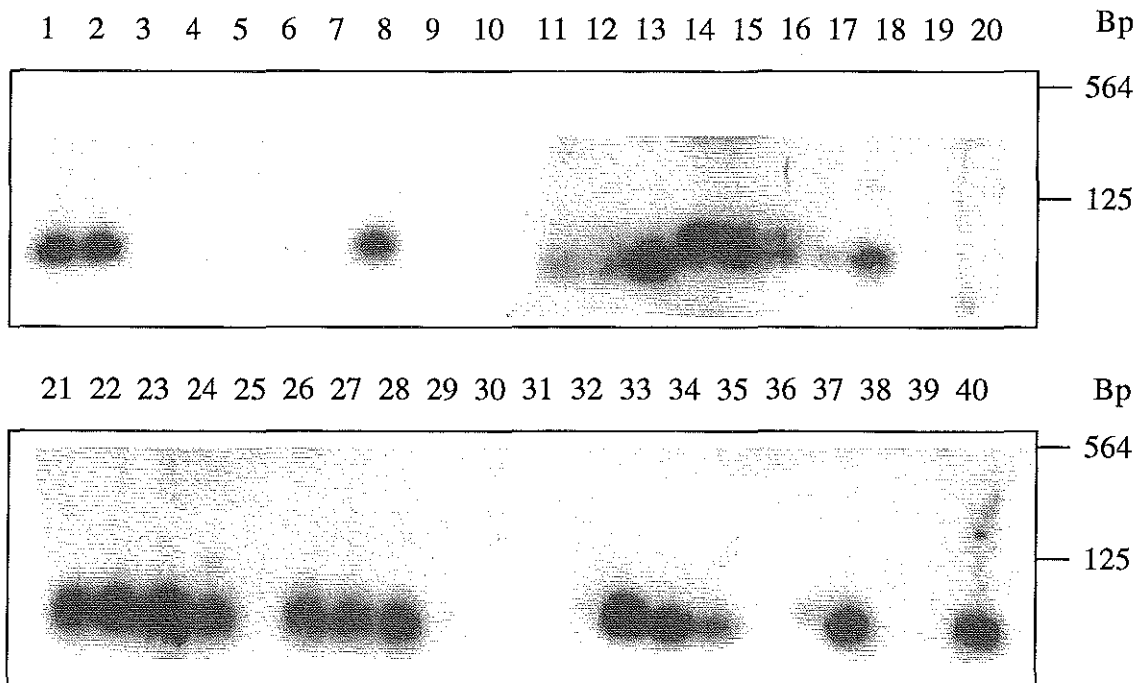
B

Abb. 6: A) Schematische Darstellung der 5'-RACE. Die 5'-RACE-Methode ist im Text erläutert. Das amplifizierte Fragment wurde in die EcoRV-Schnittstelle des pBluescript SK(-) ligiert. Die einzelnen Module des Plasmids 5'DmDop1 sind in Abb. 5 erläutert. B) Southern-Blot Analyse der 5'-RACE-Klone. Das Insert wurde vor der Gelelektrophorese mit den Enzymen EcoRI und HindIII aus der multiplen Klonierungsstelle des 5'DmDop1 ausgeschnitten. Die Hybridisierung erfolgte mit einer spezifischen DmDop1-Sonde. Die Größen des mit EcoRI/HindIII geschnittenen Lambda-Standards sind rechts neben dem Autoradiogramm aufgetragen.

3.1.4 Vergleich der Sequenz der 5'-RACE- Klone mit der genomischen Sequenz des Phagen λ 32

Der Phage λ 32 war von F. Gotzes isoliert und zur Aufklärung der Exon/Intron Struktur des DmDop1-Gens benutzt worden. Ein EcoRI-Fragment der genomischen DNA des Phagen hybridisierte mit einem Fragment der DmDop1-cDNA, das das 1. Exon des Gens enthält (Gotzes et al., 1994). Es wurde noch ein weiterer genomischer Phage verwendet (λ 1.32) der von F. Gotzes isoliert aber noch nicht genau untersucht worden ist. Der Phage λ 1.32 enthält wahrscheinlich überlappende und zusätzliche, stromaufwärts liegende Sequenzen im Vergleich zum Phagen λ 32. Um zu überprüfen, ob und in welchem Restriktionsfragment der Phagen λ 32 und λ 1.32 sich die neu klonierten 5'-Abschnitte des DmDop1-Gens befinden,

wurde eine Southern-Blot Analyse durchgeführt. Die Phagen-DNA wurde mit dem Restriktionsenzym EcoRI geschnitten. Als Positivkontrolle wurde pBDmDop1 (3.1.1) und als Negativkontrolle pKDmDop1 (3.1.1) mit EcoRI geschnitten. Die Ansätze wurden auf einem 0,75 %igen Agarosegel aufgetrennt. Die genomische DNA des Phagen λ 32 zerfällt in 5 Fragmente von ca. 5,2 kb, 4,9 kb, 3,2 kb, 2 kb und 0,6 kb. Die genomische DNA des Phagen λ 1.32 zerfällt in 8 Fragmente von ca. 2,4 kb, 1,7 kb, 1,3 kb, 1,2 kb, 1 kb, 0,7 kb, 0,6 kb und 0,4 kb. Die DmDop1-cDNA in pBDmDop1 zerfällt in zwei Fragmente von 0,6 kb und 1,9 kb. pKDmDop1 zerfällt in das Vektorfragment und ein 1,9 kb großes Fragment. Die DNA wurde auf eine Nylonmembran transferiert und mit einer 168 Bp großen AccI/BamHI-Sonde aus pBlue/5'DmDop1 unter hoher Stringenz (2.20.3) hybridisiert (Abb. 7A und B). Sowohl das 2 kb große EcoRI-Fragment aus λ 32 als auch das 2,4 kb große Fragment aus λ 1.32 und das 1,9 kb große Fragment aus pBDmDop1 hybridisierten mit der Sonde. Das ca. 2 kb große Fragment aus pKDmDop1 hybridisierte nicht (Abb. 7B). Daraus schließe ich, daß die Sequenz des genomischen Phagen λ 1.32 wahrscheinlich mit der Sequenz des Phagen λ 32 überlappt und zusätzlich noch weitere, stromaufwärts liegende Sequenzen enthält. Das 2 kb große EcoRI-Fragment aus λ 32 wurde in pBluescript SK(-) (32/ProDop1) subkloniert und mit den Oligonukleotiden #uni und #rev sequenziert. Ein Sequenzvergleich der genomischen DNA (32/ProDop1) mit den Sequenzen der 5'-RACE Klone zeigte, daß die neu klonierte cDNA identisch zur genomischen DNA Sequenz ist. Das erste Exon des DmDop1-Gens ist am 5'-Ende um 125 Bp länger als es aus der klonierten DmDop1-cDNA bisher bekannt war (Abb. 7C).

Abb. 7: Lokalisierung der 5'-RACE-Sequenzen in der genomischen Sequenz des Phagen λ 32. A) Schematische Darstellung des 5'DmDop1-Inserts. B) Southern-Blot Analyse der genomischen Phagen λ 32 und λ 1.32. Für die Hybridisierung wurde ein 168 Bp großes AccI/BamHI-Fragment aus 5'DmDop1 (A) als Sonde verwendet. Spur 1 = DNA des genomischen Phagen λ 32, EcoRI geschnitten; Spur 2 = DNA des genomischen Phagen λ 1.32, EcoRI geschnitten; Spur 3 = pBDmDop1 (Positiv-Kontrolle), EcoRI geschnitten; Spur 4 = pKDmDop1 (Negativkontrolle), EcoRI geschnitten. Die Fragmentgrößen des Lambda-DNA-Standards sind rechts neben dem Autoradiogramm angegeben. C) **Genomische Organisation der DmDop1 Transkriptions-Einheit.** Der im Phagen λ 32 vorhandene DNA-Abschnitt ist durch eine horizontale Linie oberhalb der Restriktionskarte der genomischen DNA dargestellt, in der das DmDop1-Gen identifiziert wurde. Die Entfernungen sind in kb angegeben. Restriktionsschnittstellen sind durch Großbuchstaben markiert. A = AccI, B = BamHI, E = EcoRI, H = HindIII, S = SstI, X = Xba I. Die untere Abbildung zeigt die Verteilung der Exone des DmDop1-Transkripts in dem genomischen Abschnitt. Die Exons sind nummeriert. Aufgrund des Ergebnisses der 5'-RACE wurde das erste Exon um 125 Bp in 5'-Richtung verlängert (weißer Balken). Die Länge des sechsten Exons (3'-Ende) ist unverändert (weißer Balken). Die Positionen der Exon/Intron-Übergänge sind auf eine schematische Darstellung der Proteinstruktur projiziert. Potentielle transmembranale Segmente sind mit TM1-TM7 bezeichnet.

3.1.5 Identifizierung des DmDop1-Transkriptionsstarts

Das Startnukleotid der DmDop1-mRNA wurde mit einer unabhängigen Methode, der „Primer-Extension“-Methode (modifiziert nach Mason und Williams, 1985) bestimmt (2.21). 5 µg poly (A)⁺-RNA aus *Drosophila*-Köpfen wurde mit dem genspezifischen Oligonukleotid #1894 (s. Anhang), das vorher mit [³²P]ATP endmarkiert worden war, hybridisiert. Eine Kontrollreaktion wurde mit der gleichen Menge tRNA durchgeführt (Abb.8). Die cDNA-Synthese erfolgte mit der M-MLV-Reversen Transkriptase. Die Ansätze wurden in Probenpuffer (2.13.2) aufgenommen und auf ein 8%iges denaturierendes Polyacrylamidgel (2.13.2) aufgetragen. Parallel wurde eine Sequenzreaktion des Plasmids 32/ProDop1 (3.1.4) mit dem gleichen Oligonukleotid #1894 durchgeführt und auf das Gel aufgetragen. Die „Primer Extension“-Reaktion lieferte vier Produkte. Die beiden größten Produkte haben eine Länge von 125 Bp und 123 Bp (Abb. 8). Zwei weitere Produkte von 103 Bp und 102 Bp Länge sind ebenfalls zu erkennen. In der tRNA-Kontrolle ist keine Bande zu sehen. Das 125 Bp-Produkt ist laufgleich mit einem „G“-Nukleotid, das auch als Startnukleotid der längsten 5'-RACE-Klone gefunden wurde. Das 123 Bp-Produkt ist laufgleich mit dem „C“-Nukleotid und entspricht der Position 3 der längsten RACE-Klone. Mit diesem Nukleotid beginnen neun RACE-Klone (Tab. 4). Es wurde jeweils ein RACE-Klon von 104 Bp und 103 Bp Länge gefunden (Tab. 4). Der DmDop1-Promotor besitzt wahrscheinlich zwei Transkriptionsstartpunkte. Ein Startnukleotid befindet sich in der Höhe von 125 Bp und das andere in der Höhe von 103 Bp. Bei den 123 Bp- bzw. 102 Bp-Produkten, die nur ein bzw. zwei Nukleotide von den Start-Nukleotiden abweichen, ist die cDNA-Synthese wahrscheinlich frühzeitig abgebrochen.

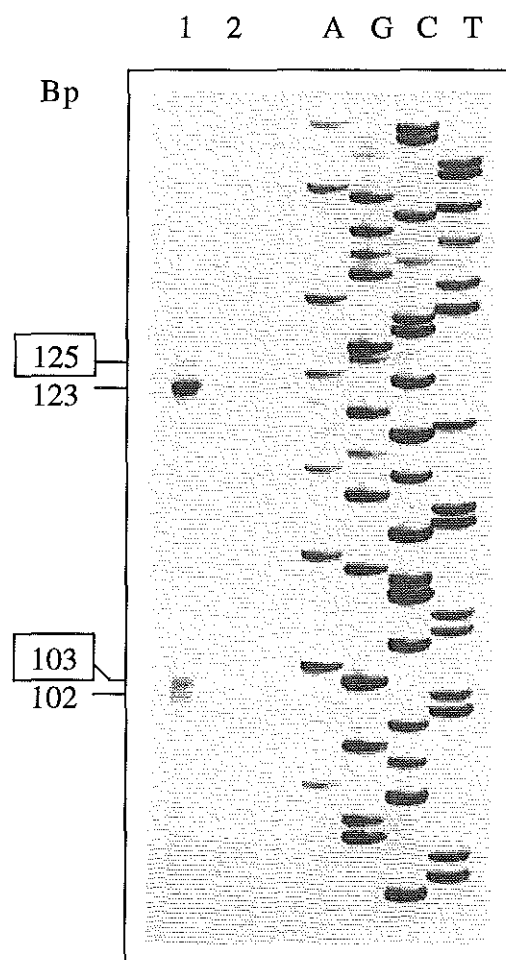


Abb. 8: Primer-Extension Experiment. Spur 1 = Primer-Extension-Reaktion mit mRNA aus *Drosophila melanogaster* Köpfen. Die Start-Nukleotide für die Transkription befinden sich auf der Höhe von 125 Bp und 103 Bp (Kasten). Weitere Primer-Extension-Reaktionsprodukte haben eine Länge von 123 Bp, und 102 Bp. In Spur 2 = Primer-Extension mit tRNA (Kontrolle). Rechts neben den Primer-Extension-Experimenten ist die Sequenzreaktion des genomischen Phagen λ 32 aufgetragen. A = Adenosin; G = Guanodin; C = Cytidin; T = Thymin. Die Primer-Extension-Reaktionen und die Sequenzreaktion wurden mit dem gleichen Primer durchgeführt.

3.1.6 Sequenzierung und Charakterisierung der Promotorregion des DmDop1-Rezeptorgens

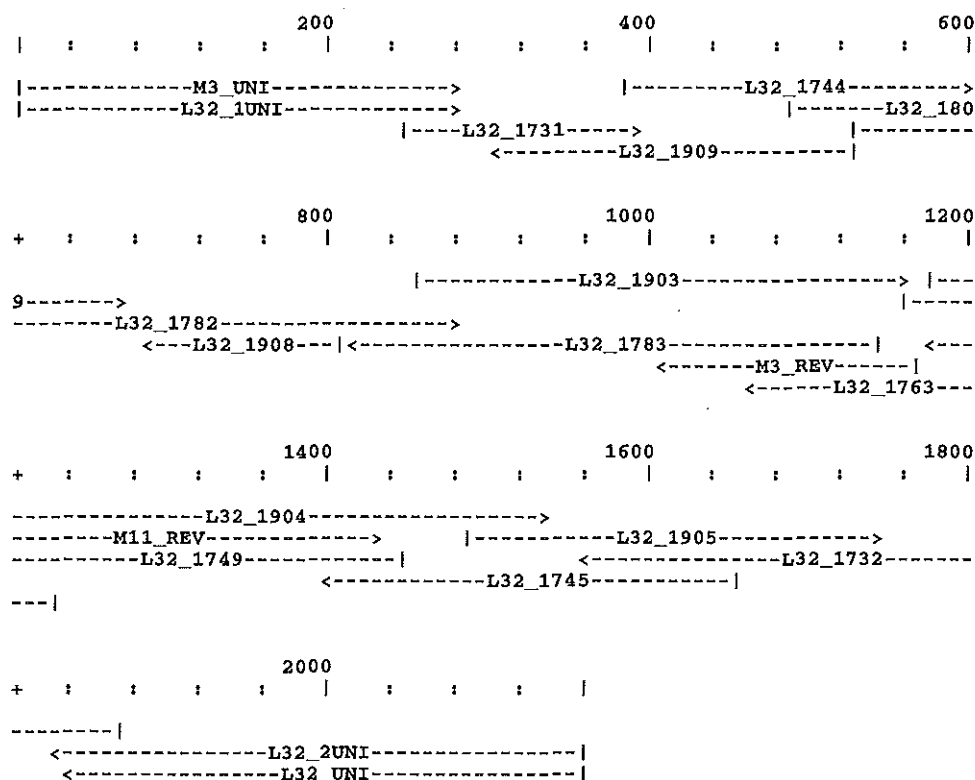
Das genomische EcoRI-Fragment des Phagen λ 32, in dem sich der Transkriptionsstart des Gens befindet, wurde vollständig, doppelsträngig sequenziert (2.13.2). Die Sequenzierungsstrategie ist in Abb. 9A gezeigt. Das Fragment ist insgesamt 2149 Bp groß. In Abb. 9B ist die komplette Nukleinsäuresequenz abgebildet.

Die Untersuchung der Promotor-Sequenzen vieler RNA-Polymerase II transkribierter Gene hat gezeigt, daß die Transkription oft in einem Sequenzabschnitt beginnt, der in den meisten Genen konserviert ist. Im Bereich von -5 bp bis +5 Bp des Transkriptionsstarts wird ein sogenanntes „INR“-Element (=Initiator) gefunden. Die Konsensus-Nukleinsäuresequenz des INR-Elements lautet: 5'-YAYTCYYY-3' (Smale & Baltimore, 1989; Roy et al., 1991). Für *Drosophila*-Promotoren wurde eine sehr ähnliche Konsensus-Sequenz ermittelt: (G/A/T)TCA(G/T)T(C/T)G (Arkhipova, 1995). Das DmDop1-Gen besitzt ab dem Guanosin-Nukleotid, das als das Transkriptionsstartnukleotid identifiziert wurde (3.1.5), die für ein INR-Element charakteristische Basenabfolge. Die Sequenz GACAGTCG stimmt bis auf die Position 2 (A→T Austausch) an allen anderen Positionen mit der Konsensussequenz eines *Drosophila* INR-Elements völlig überein. Das Guanosin-Nukleotid des INR-Elements wurde deshalb mit +1 markiert (Abb. 9B) und kennzeichnet den Transkriptionsstart des DmDop1-Gens. Im Bereich von +19 bis +26 Bp befindet sich ein zweites INR-Element. Dieses enthält das Guanosin-Nukleotid, das als zweites Transkriptionsstartnukleotid identifiziert wurde (3.1.5) (Abb. 9B). Die Sequenz TTCAGTTC stimmt bis auf die Position 8 (G→C Austausch) mit der Konsensussequenz überein. Ein charakteristisches Sequenz-Motiv für Gene, die von RNA-Polymerase II transkribiert werden, ist auch die TATA-Box. Sie kommt in eukaryontischen Promotoren häufig im Bereich von -25 bis -30 Bp vor und ist wie das INR-Element wichtig für die Initiation der Transkription (1.4). Dieses Sequenzmotiv fehlt allerdings bei der Hälfte aller *Drosophila*-Promotoren (Arkhipova, 1995). Auch im DmDop1-Promotor ist keine TATA-Box vorhanden. Für *Drosophila*-Promotoren wurde beschrieben, daß im Bereich von -150 bis + 50 Bp häufig GC-reiche Regionen sowie CAAT-Boxen vorkommen (Arkhipova, 1995). An diese Sequenzmotive binden Transkriptionsfaktoren, die die Transkription verstärken können (Stryer, 1991). Im DmDop1-Promotor gibt es insgesamt fünf GC-reiche Regionen: im Bereich von -141 bis -133, -125 bis -121, -89 bis -76, -34 bis -30 und +46 bis +52 (Abb. 9B). CAAT-Boxen sind im DmDop1-Promotor nicht vorhanden. Die 2 kb lange Nukleinsäuresequenz des DmDop1-Promotors (32/ProDop1) wurde auf Konsensusmotive untersucht, die von Transkriptionsfaktoren erkannt werden. Es existieren potentielle Bindestellen für die Transkriptionsfaktoren CREB (Hoeffler et al., 1988; Ziff, 1990; Borrelli et al. 1992; Lalli & Sassone-Corsi 1994), Zeste (Goldberg et al., 1989), DEP2 (Ayer & Benyajati, 1992) und su(Hw) (Rutledge et al., 1988).

Die Konsensussequenz für die Bindestelle des CREB-Faktors ist: (T/G/C/A)(G/T)(AGT)(CG)(GAC)(TACG)(CATG)(ATGC). Im DmDop1-Promotor befindet sich eine sehr ähnliche Sequenz TGACGGGC bei Position +128 bis +135. Es sind drei verschiedene Konsensussequenzen als Bindestelle des Zeste-Faktors beschrieben: TGAGCG, ACTCA und CACTCA. Identische Sequenzmotive befinden sich auch im DmDop1-Promotor: TGACGC bei Position -1558 bis -1553 und -117 bis -113, ACTCA bei Position -471 bis -467 und -1953 bis -1949 und CACTCA bei Position -311 bis -306. Die Konsensussequenz für die Bindestelle des DEP2 Faktors ist AACAGGTG. Ein solches

Element befindet sich bei Position -191 bis -184 im DmDop1-Promotor. Die Konsensussequenz für die Bindestelle des su (Hw)-Faktors ist YRYTGCATAYYY. Eine sehr ähnliche Sequenz TGTTGCATACTC befindet sich im DmDop1-Promotor bei Position -64 bis -53.

A



B

GAATTCAAGTGCAATTTAATAGGAGAAAAGATGCCAAGTTGTATTATGTATGCATGTAAT	-1965
Zeste TAGAATAAATTTACTCAACTGATTTTGTCTTTATTAATATACATTTTAACTCCTCTTGCA	-1905
→	
GTTGGAGCTCCTAGCACAAAGGCTATCTTTGTTCGCGAACTCTGCGAACTTCTGTGCCTTTG	-1845
GCAGCTATACCGCCGCTCTCAGCGGACTGATCACCAATGGCCCCAGGCCCTCAGACAAAC	-1785
TACACTGTATATGAGGAGGAGGAGGAAGAGGAGCCAGTTCAAAGACGCCGCCACAACAG	-1725
CGTCTTTCGAGGCCGCTCCACAACAGGCGCCGTCAAGACCACGGCCGCAATCCGTGCCT	-1665
CAATTGCCACAAGAACCAGAGTTCCAGACGTCAGCCGGACCTTCAGTTCATCCGTGCAAT	-1605
Zeste ACGCCCCGCGCAAGCATCGAAGTTCTATCCCCAGACAATTGGTCAACTGAGCGGAATTTGT	-1545
→	
GGGCGTGAAAAGGTCATCCAGACACCCTTTATCCACAACGGAATTGAAGTGGAGCGGGGT	-1485
CAGCTGCCCTGGATGGCCGCTCTTTTCGAGCACGTTGGCAGGGACTATAAATTTTGTGC	-1425
GGCGGAACGCTGATCTCGGCCAGAACAGTGATCTCGGCTGCCCCACTGCTTCCGCTTTGGC	-1365
AGTCGGAATTTGCCGGGCGAGCGGACTATTGTTTCGCTGGGGCGTAACTCCTTGGATCTT	-1305
TTTTTCGTCGGGAGCTACACTAGGTGTAGCGCGACTATTAATCCACGAACAGTACAATCCC	-1245
AATGTATACACCGATGCGGATTTAGCACTGCTCCAGTTGTCTAATCACGTTGAGTAAGTA	-1185
CATTTATTTGATTAAATTTATTTTGTCAAATTTGATTAACTTTTAAATCGTAACTACACTTAG	-1125
TATTGGCGATTACATCAAGCCCATCTGTTTGTGGAACGAGAACTTTTGTCTGCAACTGCC	-1065
CTCGGGTCACAAGTCTTATGTGGCTGGTTGGGGTGAGGATGAAAAGGGGAACCGAAACAC	-1005
GCGACTGGCCAAGATGACAGACACGGACATCATCACCCAGTGGGAATGTCGTGGAAATCT	-945
GTCCGAGGAGAACGCCAAGTTTATCACCTCGCACACGATCTGCGCCAGCAATGCCAGGC	-885
ATCCGGTCCCTGCAGCGGAGATTCCGGTGGTGGACTGATGCTCCAGGAGCAGGACATCTG	-825
GATGCTGCGCGGCGTCTCTCAGCCGGACAGCGAATGACCAACAGATGCAATCTGACACT	-765
GCCTGTCTATCTATACGGATGTGGCCAAGCACATCGAGTGGCTGCTCAGTAACATGTGGTT	-705
TTGAGAGGTTATACAAGAGATTAGTTGAATTGAGTGCCAAAATAAAAGATAAACAATTTT	-645
TTAAAAAGTGACAGTTGCATTACCCCTATCCACACATAACTAAAGAGATGTAAGTCGGG	-585
GTTAAAGTTGATTTTAAATAGTATTTATATGGAGCTTTGGAGGTTTATCACTAAAGTAA	-525
Zeste GCAATTACCTAAGTTTACATTTTAAATGCCTATATTTGATAAATTTCTGAAATACTCATA	-465
→	
TAGAAAATCATATGTACAAAAAACTAACAAAACCTGTGGTCCCCACTTTATGTAAGGGTA	-405
TCTCAATTGAAAGATTGCATCGGCCAGCAGATCTGCCAGCGGCGATTGTCAAAGACAGC	-345
Zeste AATTGCATTCCATTTGCATGCAGTTGAGGCATTCACTCAGCCCAAATGACATCGCAACGT	-285
→	
TGTTCCAGTTTCGTAATGAGAACAAATAGAGGTGGCGGCCAAAGTCGCGTCGGAGTCGC	-225
DEP2 TAGTGAAACGCTGGGAAAACGCTCGTTGGAACAACAGGTGCTTTCCCTCATGCTTATTT	-165
→	
GCTCCAAGTCTCTCTCTTGCTCTGCGCAGCGCATATATTCCGCTGGTGAGCGACATATC	-105
Zeste CTGTTGAATGGACTTCGCGGCTCCGGCGGAACTCGAAAGTTGTTGCATACTCTACGGCAT	-45
→	
su (Hw) +1 TGGTCGTTCTCCGCCGTACTGATACCGTTAGTCGTGCGTATCCGGACAGTCGACGTTACG	+16

	Ergebnisse
CCTTCAGTTTCGCACGGTTCGTCAAGCGGTGGCCCGCTGGAAAGATAGTGCCAGATAACAC	+76
CAACCAACCCATTTAATCGGACAAAATTCCGAGTGCCGATCGAGAATTCTCTGACGGGGCG	+136
TACGTGTGTGTGTGTGTGTGTGCGAGAAGCGTGTGTTCAGTTAAGTGTGTGCATACCACAAGC	+196
ATATATATATTATATATATATGGCATATTTATCAATCATTTAAGCAGTGACTTAATGCTGTA	+256
ATTTTCGTCTGATTGATGGCTGGACATGACTCTGGGTTCGCGTTCTCCGCGATGCCTGAAT	+316
CTGAAACCCAGCGAGTTTCTCAGTTCGTCTGAACATGCTTCAATTGCCGCATTTAGTATC	+376
GAAGAAGTGTATTAGCAGAATGCTGCATTGCCGTAGTCGGGCAATTTATTGCCGTACCCG	+436
CAACTAAGAATCTCTCGCTGAAAAGAGGAAGCAACCATCCACCAACCATCCATTTCATG	+494

Abb. 9: A) Sequenzierstrategie des 2 kb großen EcoRI-Fragmentes des genomischen Phagen λ 32. 1. Subklonierung in pBluescript SK(-) (32/ProDop1). Das Plasmid 32/ProDop1 wurde mit genspezifischen Oligonukleotiden (s. Anhang) sequenziert. B) Nukleinsäuresequenz des Promoterbereichs des D1-Rezeptorgens. Die beiden Transkriptionsstartpunkte des Dopamin-Rezeptorgens sind doppelt unterstrichen. Das Start-Guanosin des längsten 5'-RACE-Produkts (125 Bp) ist mit +1 bezeichnet. Die GC-Boxen sind einfach unterstrichen. Die Bindestellen der Transkriptionsfaktoren CREB, Zeste, DEP2 und su (Hw) sind mit einem Pfeil markiert. Der Translationsstart (ATG) ist fett unterstrichen.

3.1.7 Isolierung von genomischen Phagen zur Charakterisierung weiterer „stromaufwärts“ liegender Promotorbereiche

Obwohl in dem klonierten genomischen Fragment des Phagen λ 32 viele Elemente gefunden wurden, die für die Promotor-Region eines *Drosophila*-Gens charakteristisch sind, war es unklar, ob der Sequenzabschnitt ausreicht, um die Expression eines heterologen Reportergens zu aktivieren. Da das 2 kb große EcoRI-Fragment des Phagen λ 32 jedoch das 5'-Ende der bisher klonierten genomischen DNA darstellt, wurde die genomische Maniatis-Phagen-Bank (2.7) durchsucht, um weiter 5'-stromaufwärts liegende Bereiche des DmDop1-Rezeptorgens zu isolieren. Als Sonde wurde das 2 kb große EcoRI-Fragment aus 32/ProDop1 verwendet. Insgesamt wurden vier rekombinante λ -Phagen isoliert. Die λ -Phagen DNA wurde mit EcoRI geschnitten, gelelektrophoretisch aufgetrennt und auf eine Nylonmembran übertragen. Das Restriktionsmuster der Phagen 1-3 war identisch. Es entstanden Restriktionsfragmente von ca. 1,3 kb, 1,5 kb, 2 kb, 2,5 kb und 8 kb. Die DNA des λ -Phagen 4 enthielt zusätzlich noch ein ca. 1,6 kb großes und ein 2,2 kb großes Fragment. Der Southern-Blot wurde mit der o.g. Sonde hybridisiert. In allen Spuren hybridisierte das ca. 2 kb große EcoRI-Fragment. Dieses Fragment wurde aus den Phagen 1 und 4 isoliert und in pBluescript SK(-)-Vektor subkloniert. Die Subklone wurden mit den Oligonukleotiden #uni und #rev (s. Anhang) sequenziert. Die Sequenz war identisch mit dem 2 kb großen Fragment aus dem λ -Phagen 32. Die Phagen λ 1 und λ 4 haben sowohl gemeinsame Fragmente als auch solche, die die genomische Sequenz

des Phagen λ 32 in 5'-Richtung verlängern. Damit ist die Voraussetzung geschaffen, bei Bedarf auf weiter stromaufwärts liegende Abschnitte zugreifen zu können.

3.2 Bestimmung der Promotoraktivität des DmDop1-Gens

Es gibt verschiedene Methoden, um die relative Stärke eines Promotors zu untersuchen. In der Regel basieren jedoch alle Verfahren auf der Analyse einer „sogenannten“ Reporterogenaktivität, die von dem zu untersuchenden Promotor gesteuert wird. Als Reportergene werden sowohl das Luciferase-Gen (LUC) bzw. alternativ das Chloramphenicol-Acetyltransferase-Gen (CAT) eingesetzt. Wir haben uns für das CAT-System entschieden. Um die Promotoraktivität zu untersuchen, stehen zwei Vektoren zur Verfügung: der pCAT^{R3}-Basic und pCAT^{R3}-Enhancer (2.6). Der pCAT^{R3}-Basic-Vektor enthält die für das Chloramphenicol-Acetyltransferase-Gen kodierende cDNA (Abb. 11). Vor dem CAT-Gen befindet sich eine multiple Klonierungsstelle, in die Promotorfragmente eingefügt werden können. Der pCAT^{R3}-Enhancer-Vektor enthält zusätzlich noch ein Transkriptionsverstärker- (Enhancer-) Element (Abb. 11). Wird das Reporterogen mit einem aktiven Promotorelement in Säugerzellen transfiziert, so wird das Enzym exprimiert (Cullen, 1987; Gorman et al., 1982). Die Transkription und damit die Synthese des Reporterenzym (CAT) ist abhängig von der Aktivität und Spezifität des Promotorfragments. Starke Promotoren ermöglichen die Transkription des CAT-Gens bereits im pCAT^{R3}-Basic Vektor. Schwache Promotoren benötigen zusätzliche Enhancer-Elemente, die bspw. im pCAT^{R3}-Enhancer-Vektor zur Verfügung stehen. Neben der „Aktivierungsfunktion“ können die jeweiligen Konstrukte aber auch hinsichtlich ihrer Spezifität getestet werden. Benötigt der Promotor spezifische Transkriptionsfaktoren zur Aktivierung, so wird die Reporterogenaktivität möglicherweise nur in bestimmten Zelltypen meßbar sein. Um diese Fragen zu klären, mußten die DmDop1-Promotorkonstrukte in verschiedenen Zelllinien untersucht werden. Damit die CAT-Aktivitäten (2.25.2) miteinander verglichen werden können, muß auf einen Referenzwert normiert werden. In dem CAT-System wird dazu die Enzymaktivität der β -Galaktosidase (β -GAL) (Rosenthal, 1987) verwendet. Bei allen Transfektionen mit den CAT-Vektoren werden die Zellen gleichzeitig mit einem Plasmid transfiziert (Tab. 3), das das β -GAL-Enzym konstitutiv exprimiert. Die Expression der β -GAL ist unabhängig vom verwendeten Zelltyp.

3.2.1 Herstellung der pCAT^{R3}-Promotorkonstrukte

Um die für die Expression des DmDop1-Gens wichtigen Bereiche eingrenzen zu können, wurde das 2149 Bp große Promotorfragment aus 32/ProDop1 (3.1.6) vom 5'-Ende und 3'-Ende her systematisch verkürzt (Abb. 13A). Das EcoRI-Fragment (3.1.6) wurde mit den Enzymen SacI/XhoI aus der multiplen Klonierungsstelle des Plasmids 32/ProDop1 (3.1.4)

(Abb. 10) und 32/ProDop1(-) (Abb. 11), das das Fragment in entgegengesetzter Orientierung enthält, ausgeschnitten. Da sich innerhalb des Fragments ebenfalls eine *SacI*-Schnittstelle befindet (Abb. 10 u.11), wurden die Fragmente durch Partialrestriktion isoliert. Die anderen Promotorfragmente wurden mit den Restriktionsenzymen *PvuII*/*EcoRI*, *AvaI*/*EcoRI*, *NdeI*/*EcoRI* und *MluI*/*EcoRI* aus dem Plasmid 32/ProDop1 ausgeschnitten (2.13.1). Die Enden der Fragmente wurden aufgefüllt (2.12.1) und in beiden Orientierungen in den Vektor pBluescript/*EcoRV* ligiert (pBlue SK(-)PD1) (Abb. 10). Die Fragmente wurden mit den Enzymen *SacI*/*XhoI* aus der multiplen Klonierungsstelle der pBluescript-Konstrukte ausgeschnitten und in die mit *SacI*/*XhoI* geschnittenen Vektoren pCAT^{R3}-Basic und pCAT^{R3}-Enhancer ligiert (Abb. 10 u. 11). Die Konstrukte wurden pCATBasPD1 bzw. pCATEnhPD1 (Abb. 11) benannt.

Auch stromabwärts des Transkriptionsstarts können Sequenzabschnitte liegen, die die Genaktivität regulieren (Arkhipova, 1995, Valmu et al., 1998). Deshalb wurde ein Fragment aus dem Phagen λ 32 (3.1.4) isoliert, das 365 Bp des 5'-nicht translatierten Bereiches des DmDop1-Gens bis zum ATG des offenen Leserahmens umfaßt. Da dieser Gen-Abschnitt über keine geeigneten Schnittstellen verfügt, wurde in einer PCR-Reaktion (2.15) mit dem Primer #2089 (s. Anhang) eine *XhoI*-Schnittstelle unmittelbar hinter dem ATG eingefügt (Abb. 12). Als Gegenprimer diente #1936 (s. Anhang). Das PCR-Fragment wurde mit den Enzymen *MluI*/*XhoI* geschnitten und an das *SacI*/*MluI*-Fragment der pCATBasPD1-bzw. pCATEnhPD1(-2024/+125)-Konstrukte angefügt (Abb. 12). Die Klone wurden als pCATBasPD1 bzw. pCATEnhPD1(-2024/+495) bezeichnet (Abb. 12). Für die Herstellung des pCATBasPD1(-205/+495)-Konstrukts (Tab. 5) wurde das pCATBasPD1(-2024/+495)-Konstrukt mit *SacI*/*MluI* geschnitten, die Enden der Fragmente aufgefüllt (2.12.1) und religiert (Abb. 12). Das pCATBasPD1(-125/+495)-Konstrukt (Tab. 5) wurde durch Restriktion mit *SacI*/*EcoRI*, Auffüllen der Enden (2.12.1) und anschließender Religation hergestellt (Abb. 12). Die Herstellung der pCATEnhPD1 (-205/+495)- und pCATEnhPD1 (-125/+495)-Konstrukte wurde analog durchgeführt (Abb. 12).

32/ProDop1

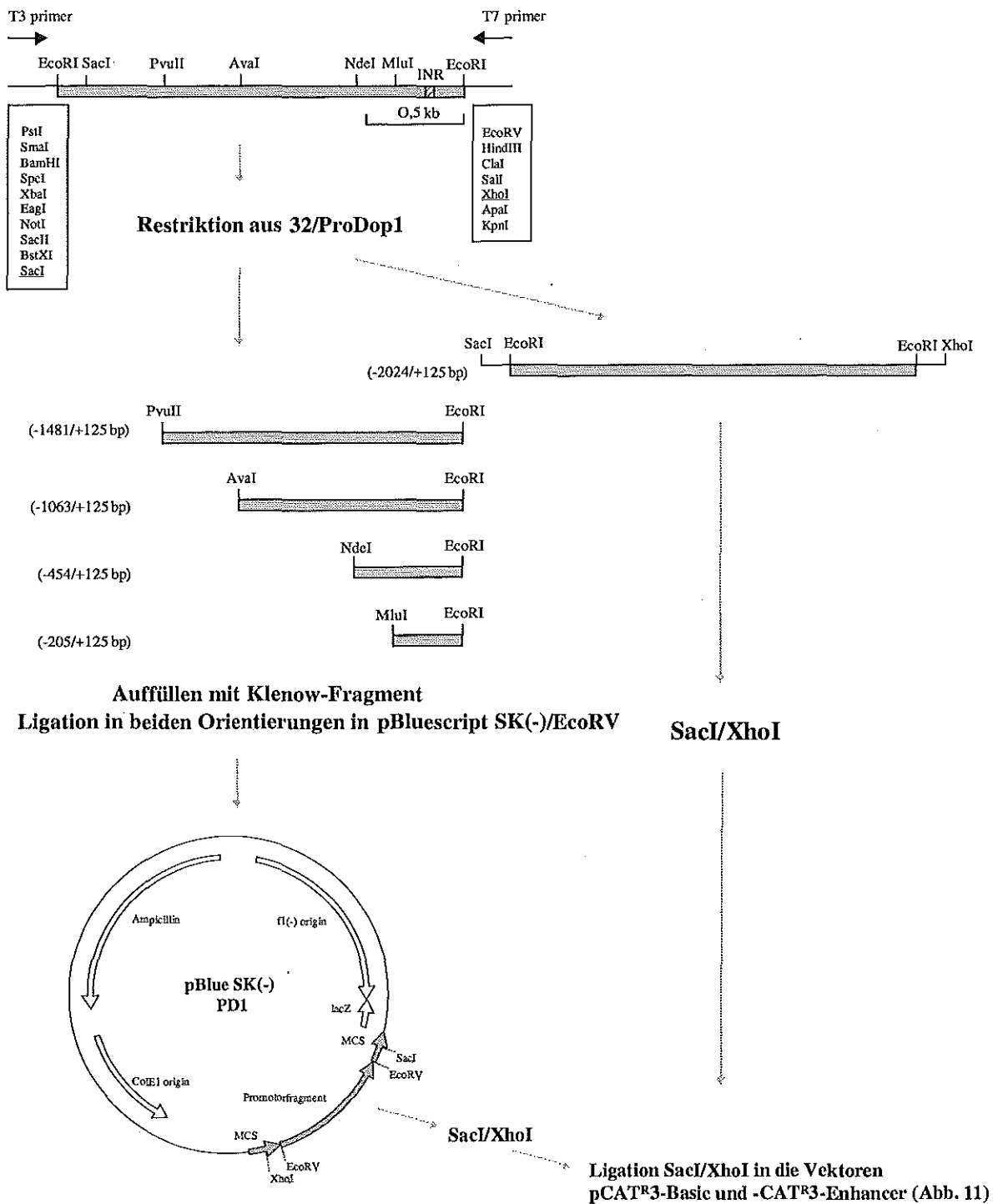


Abb. 10: Herstellung der (5'→3')-Promotor-CAT-Konstrukte (1). Die Konstruktion der Plasmide ist im Text beschrieben. Das SacI/XhoI-Fragment wurde direkt in die CAT-Vektoren kloniert. Die kleineren Fragmente wurden zuerst in pBluescript SK (-) /EcoRV subkloniert. Alle pCAT-Konstrukte tragen die DmDop1-Promotorfragmente in der für die Transkription des CAT-Gens benötigten (5'→3')-Orientierung. Die einzelnen Module des pBluescript SK(-)-Plasmids sind in Abb. 5 erläutert.

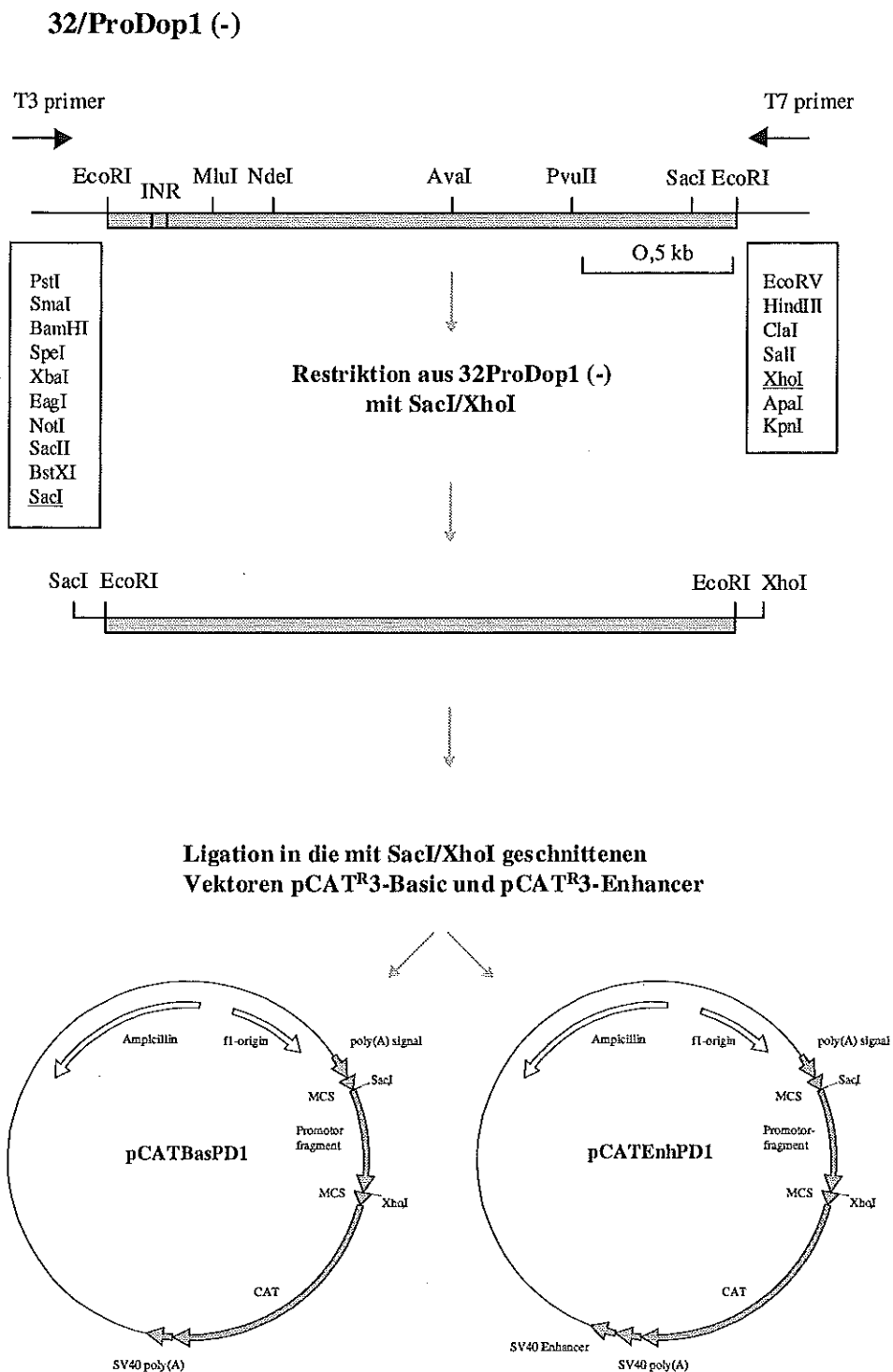


Abb. 11: Herstellung der (3'→5')-Promotor-CAT-Konstrukte (2). Die Konstruktion der Plasmide wurde, wie im Text beschrieben, durchgeführt. Im Plasmid 32/ProDop1 (-) ist das Promotorfragment in der entgegengesetzten Orientierung (3'→5') kloniert. Die hier beschriebenen pCAT-Konstrukte tragen die DmDop1-Promotorfragmente in der für die Transkription des CAT-Gens entgegengesetzten (3'→5')-Orientierung. Ampicillin ; f1(-) origin (s. Abb. 5); SV40 Enhancer = Chimäres Intron aus SV 40-Virus, das CAT-Expression verstärkt; SV40 poly (A) = Transkriptions-Terminationssignal und Polyadenylierungssignal.

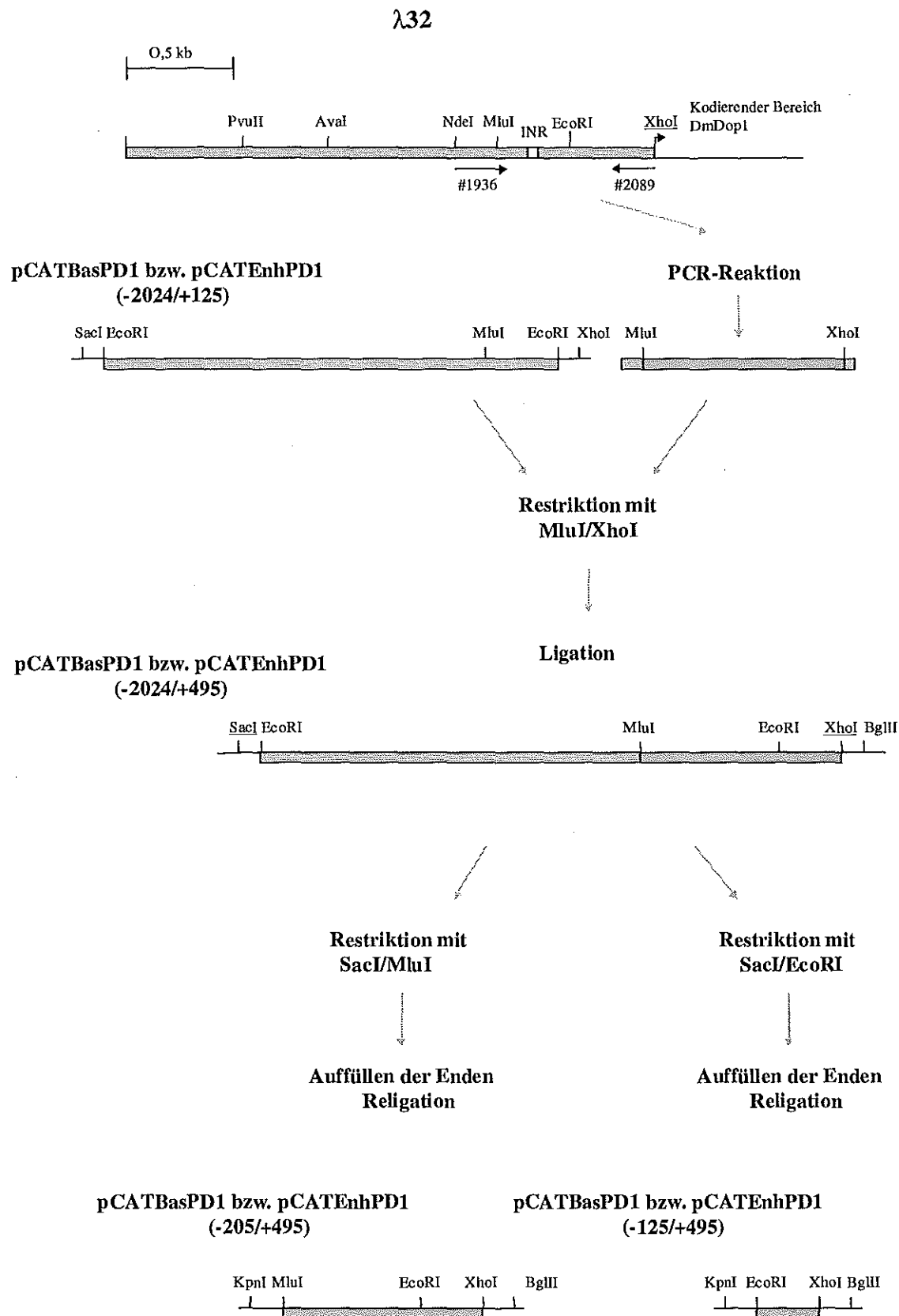


Abb. 12: Herstellung der CAT-Konstrukte (3). Die Konstruktion der pCAT-Konstrukte, die den Promotorbereich bis zum ATG enthalten, wurden wie oben abgebildet, hergestellt.

In den folgenden Tabellen sind die CAT-Konstrukte nochmals aufgeführt:

Tab. 5: pCAT^R3-Basic-Konstrukte

Plasmid	Fragmentgröße in Bp	Restriktions- schnittstellen	Orientierung
pCATBasPD1 (-2024/+125) →	2149	EcoRI/EcoRI	(+)
pCATBasPD1 (-2024/+125) ←	2149	EcoRI/EcoRI	(-)
pCATBasPD1 (-1481/+125) →	1606	PvuII/EcoRI	(+)
pCATBasPD1 (-1481/+125) ←	1606	PvuII/EcoRI	(-)
pCATBasPD1 (-1063/+125) →	1188	AvaI/EcoRI	(+)
pCATBasPD1 (-1063/+125) ←	1188	AvaI/EcoRI	(-)
pCATBasPD1 (-454/+125) →	579	NdeI/EcoRI	(+)
pCATBasPD1 (-454/+125) ←	579	NdeI/EcoRI	(-)
pCATBasPD1 (-205/+125) →	330	MluI/EcoRI	(+)
pCATBasPD1 (-205/+125) ←	330	MluI/EcoRI	(-)
pCATBasPD1 (-2024/+495) →	2519	EcoRI/XhoI	(+)
pCATBasPD1 (-205/+495) →	700	MluI/XhoI	(+)
pCATBasPD1 (-125/+495) →	620	EcoRI/XhoI	(+)

Die Orientierungen der Konstrukte sind mit einem Pfeil bzw. mit (+) und (-) gekennzeichnet. Das Anfangs- und Endnukleotid der jeweiligen Promotorfragmente ist in Klammern angegeben. Negative Zahlen bezeichnen den Bereich 5'-stromaufwärts des Transkriptionsstarts.

Tab. 6: pCAT^R3-Enhancer Konstrukte

Plasmid	Fragmentgröße in Bp	Restriktions- schnittstellen	Orientierung
pCATEnhPD1 (-2024/+125) →	2149	EcoRI/EcoRI	(+)
pCATEnhPD1 (-2024/+125) ←	2149	EcoRI/EcoRI	(-)
pCATEnhPD1 (-1481/+125) →	1606	PvuII/EcoRI	(+)
pCATEnhPD1 (-1481/+125) ←	1606	PvuII/EcoRI	(-)
pCATEnhPD1 (-1063/+125) →	1188	AvaI/EcoRI	(+)
pCATEnhPD1 (-1063/+125) ←	1188	AvaI/EcoRI	(-)
pCATEnhPD1 (-454/+125) →	579	NdeI/EcoRI	(+)
pCATEnhPD1 (-454/+125) ←	579	NdeI/EcoRI	(-)
pCATEnhPD1 (-205/+125) →	330	MluI/EcoRI	(+)
pCATEnhPD1 (-205/+125) ←	330	MluI/EcoRI	(-)
pCATEnhPD1 (-2024/+495) →	2519	EcoRI/XhoI	(+)
pCATEnhPD1 (-205/+495) →	700	MluI/XhoI	(+)
pCATEnhPD1 (-125/+495) →	620	EcoRI/XhoI	(+)

Die Orientierungen der Konstrukte sind mit einem Pfeil bzw. mit (+) und (-) gekennzeichnet. Die Bezeichnung der Promotorfragmente ist in Tab. 5 erklärt.

3.2.2 Bestimmung der CAT-Aktivität

Da der DMDOP1-Rezeptor im zentralen und peripheren Nervensystem der Fliege exprimiert wird (Gotzes et al., 1994), war zu erwarten, daß der DmDop1-Promotor nur in neuronalen Zellen aktiv ist. Da zur Zeit keine neuronale *Drosophila*-Zelllinie verfügbar ist, wurden die CAT-Messungen in verschiedenen Säugerzellen durchgeführt. Die Konstrukte (Tab. 5 u.6) wurden in zwei neuronalen Zelllinien SK.N.SH (menschliche Neuroblastomzellen, 2.3) und Neuro 2a (Maus-Neuroblastomzellen, 2.3) (Tab. 7, Abb. 13A und B) sowie in einer menschlichen Nieren-Zelllinie HEK293 (2.3) untersucht (Tab.7, Abb. 13C). Mit jedem Konstrukt wurden mindestens 4 unabhängige Transfektionen (2.23) durchgeführt, um die Ergebnisse statistisch abzusichern.

3.2.2.1 Messung der CAT-Aktivität in der menschlichen SK.N.SH-Neuroblastom-Zelllinie

Jedes Konstrukt (Tab. 5 und 6) wurde gemeinsam mit dem pSV- β -Gal Kontrollplasmid transient in die SK.N.SH-Zellen transfiziert (2.23). Die β -GAL- und CAT-Aktivitäten wurden 48 h nach der Transfektion bestimmt (2.25).

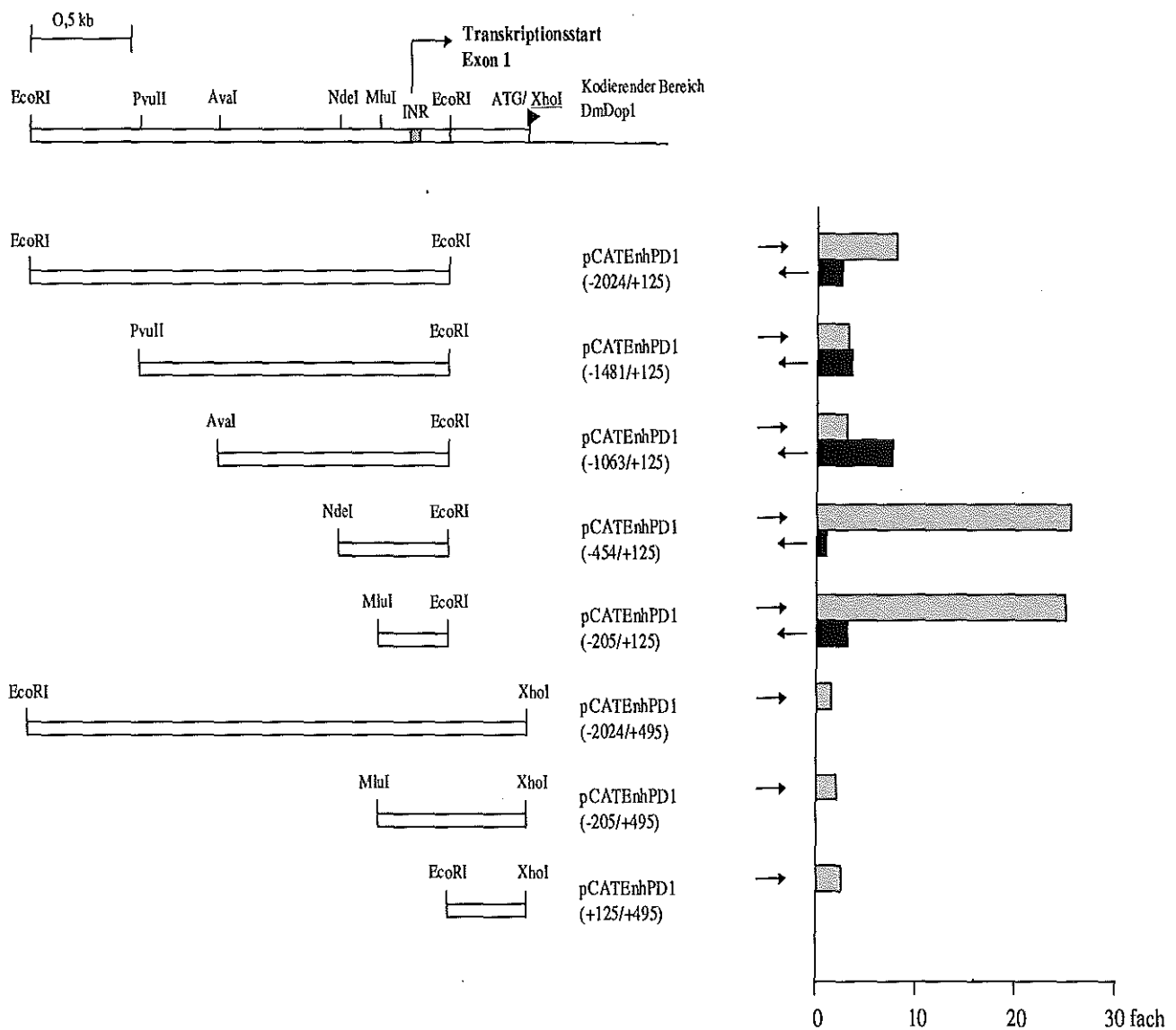
In allen Transfektionen wurde β -GAL-Aktivität gemessen. Transfektionen, die mit pCAT^R3-Basic Konstrukten durchgeführt wurden, ergaben in keiner Zelllinie nennenswerte CAT-Aktivitäten. Meßbare CAT-Aktivitäten wurden ausschließlich mit den pCAT^R3-Enhancer Konstrukten erhalten. Die nachfolgend beschriebene Steigerung der CAT-Aktivität bezieht sich auf die CAT-Aktivität, die nur mit dem pCAT^R3-Enhancer Plasmid (ohne zusätzliches Promotorfragment (Kontrolle)) gemessen worden ist.

Die höchsten CAT-Aktivitäten wurden in den SK.N.SH-Zellen mit den am stärksten vom 5'-Ende her verkürzten Konstrukten gemessen: die Aktivität des pCATEnhPD1(-454/+125) Konstrukts war 25,4-fach und die des pCATEnhPD1(-205/+125) Konstrukts war 25-fach höher als die des pCAT^R3-Enhancer-Kontrollplasmids. Mit dem Promotorkonstrukt pCATEnhPD1(-2024/+125) wurde in den SK.N.SH-Zellen eine 8-fach-gesteigerte CAT-Aktivität im Vergleich zu pCAT^R3-Enhancer transfizierten Zellen gemessen (Abb. 13A). Die CAT-Aktivitäten, die mit den beiden vom 5'-Ende her verkürzten Konstrukten, pCATEnhPD1(-1481/+125) und pCATEnhPD1(-1063/+125), gemessen wurden, war mit 3,1- bzw. 2,6-facher Aktivität etwas geringer als die des Konstrukts pCATEnhPD1(-2024/+125). Die geringste CAT-Aktivität wurde mit den Fragmenten gemessen, die den Promotorbereich bis zum ATG enthalten: die Aktivität war 1,2-fach mit dem gesamten Promotorkonstrukt pCATEnhPD1(-2024/+495), 1,5-fach mit dem pCATEnhPD1(-205/+495)-Konstrukt und 2,5-fach mit dem pCATEnhPD1(-125/+495)-Konstrukt.

Die CAT-Konstrukte, die die Promotorfragmente in der entgegengesetzten Orientierung enthalten, zeigten, mit einer Ausnahme, entweder keine oder nur geringe CAT-Aktivitäten

(2-3,4-fach). Nur das pCATEnhPD1(-1063/+125) (-)-Konstrukt (Tab. 6) führt zu einer 7.6-fachen Steigerung gegenüber der Kontroll-CAT-Aktivität. Vergleicht man alle in den SK.N.SH gemessenen CAT-Aktivitäten miteinander, so wurde eine deutliche Erhöhung der Enzymaktivität nur mit dem pCATEnhPD1(-454/+125)-Konstrukt (25,4-fach) und pCATEnhPD1(-205/+125)-Konstrukt (25-fach) erreicht.

A) SK.N.SH-Zellen



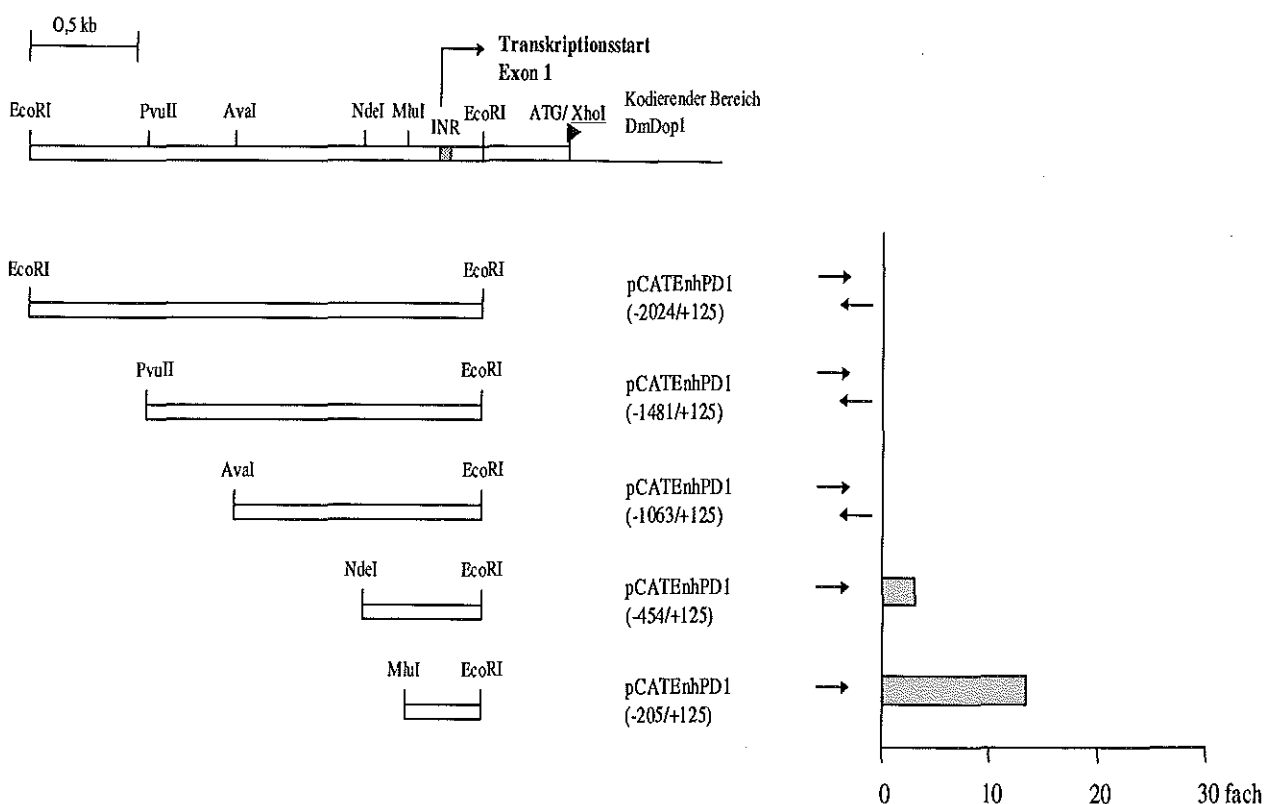
(Legende, s. Seite 61)

3.2.2.2 Messung der CAT-Aktivität in der Maus-Neuroblastom-Zelllinie Neuro2a

Alle Konstrukte wurden auch in der Neuro2a-Zelllinie getestet. Nach der Transfektion wurden geringere CAT-Aktivitäten (Tab. 7, Abb. 13B) als in SK.N.SH-Zellen gemessen.

In den Neuro2a-Zellen wurde mit den Promotorkonstrukten pCATEnhPD1(-2024/+125), pCATEnhPD1(-1481/+125) und pCATEnhPD1(-1063/+125) keine CAT-Aktivität gemessen. Die kleinsten, vom 5'-Ende her verkürzten Promotorkonstrukte zeigten jedoch auch in der Neuro2a-Zelllinie eine deutliche Erhöhung der CAT-Aktivität. Im Vergleich zu den mit dem pCAT^R3-Enhancer transfizierten Kontrollzellen betrug die Steigerung der Enzymaktivität mit dem pCATEnhPD1 (-454/+125)-Konstrukt 3-fach bzw. mit dem pCATEnhPD1(-205/+125)-Konstrukt 13,6-fach. Bei Verwendung der entgegengesetzt orientierten Konstrukte wurde keine CAT-Aktivität gemessen. Der Promotorbereich von +125 bp bis +495 bp wurde nicht getestet.

B) Neuro 2a-Zellen



(Legende, s. Seite 61)

3.2.2.3 Messung der CAT-Aktivität in der menschlichen Nierenzelllinie HEK293

In der menschlichen Nierenzelllinie HEK293 war im Vergleich zu den neuronalen Zelllinien bei allen Konstrukten nur eine geringe Enzymaktivität nachweisbar (Tab. 7, Abb. 13C). Mit dem pCATEnhPD1(-2024/+125)-Konstrukt wurde nur eine 1,3-fache CAT-Aktivität gemessen. Die CAT-Aktivität des pCATEnhPD1(-454/+125)-Konstrukts war 4,7-fach und die des pCATEnhPD1(-205/+125)-Konstrukts war 5,7-fach höher als die Kontroll-CAT-Aktivität. Verglichen mit den CAT-Aktivitäten, die in den SK.N.SH-Zellen mit diesen Konstrukten erzielt wurden, sind diese Werte zu gering, um als spezifische Promotoraktivität gelten zu können.

Die Transfektion der HEK293-Zellen mit CAT-Konstrukten, die das Promotorfragment in entgegengesetzter (3'→5')-Orientierung enthalten, ergaben, wie schon zuvor bei den neuronalen Zelllinien, nur sehr geringe CAT-Aktivitäten (0,2-1,8-fach).

C) HEK 293-Zellen

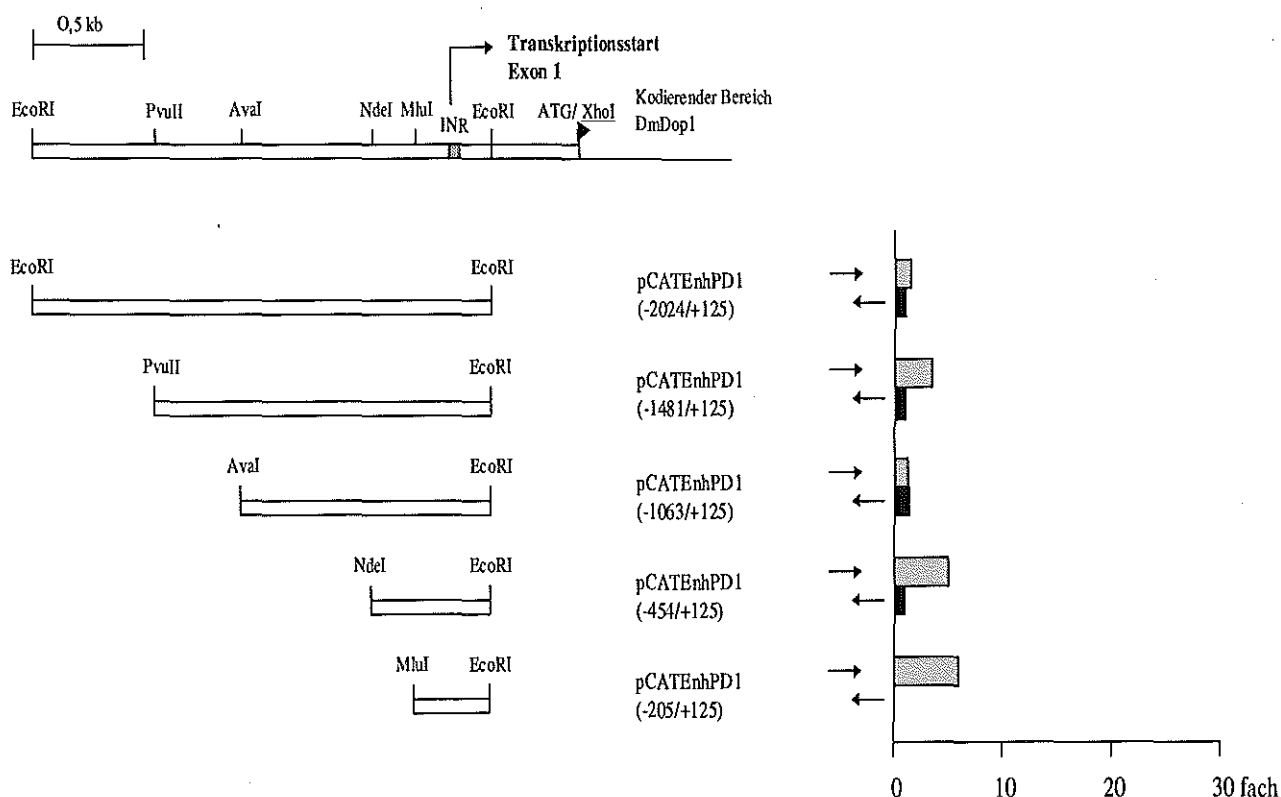


Abb. 13: Bestimmung der CAT-Aktivität in A) SK.N.SH-, B) Neuro 2a- und C) HEK 293-Zellen. Die Aktivitäten (Tab. 7), die mit 5'→3' orientierten Promotorkonstrukten gemessen wurden, sind schraffiert dargestellt. Die Aktivitäten, die mit den entgegengesetzt 3'→5' orientierten Promotorkonstrukten gemessen wurden, sind schwarz dargestellt. Die Orientierung des Promotorfragments ist durch einen Pfeil angegeben. Die Originalrichtung ist mit (→), die entgegengesetzte Richtung mit (←) gekennzeichnet. Die CAT-Aktivitäten sind als Steigerung (-fach) der Enzymaktivität angegeben, die mit dem pCAT-Enhancer Vektor ohne Promotoranteil (=1-fach) gemessen wurde.

Tab. 7: CAT-Aktivitäten, die in den Zelllinien SK.N.SH, Neuro 2a und HEK 293 gemessen wurden

Plasmid	Orientierung des Promotorfragments	SK.N.SH	Neuro 2a	HEK 293
		-fach zu pCAT ^R 3-Enhancer		
pCATEnhPD1 (-2024/+125) →	(+)	8,0	-	1,3
pCATEnhPD1 (-2024/+125) ←	(-)	2,2	-	0,2
pCATEnhPD1 (-1481/+125) →	(+)	3,1	-	3,2
pCATEnhPD1 (-1481/+125) ←	(-)	3,4	-	0,9
pCATEnhPD1 (-1063/+125) →	(+)	2,6	-	1,1
pCATEnhPD1 (-1063/+125) ←	(-)	7,6	-	1,8
pCATEnhPD1 (-454/+125) →	(+)	<u>25,4</u>	3,0	4,7
pCATEnhPD1 (-454/+125) ←	(-)	0,4	-	0,2
pCATEnhPD1 (-205/+125) →	(+)	<u>25,0</u>	<u>13,6</u>	5,7
pCATEnhPD1 (-205/+125) ←	(-)	3,2	-	-
pCATEnhPD1 (-2024/+495) →	(+)	1,2	n.g.	n.g.
pCATEnhPD1 (-205/+495) →	(+)	1,5	n.g.	n.g.
pCATEnhPD1 (-125/+495) →	(+)	2,5	n.g.	n.g.
pCAT ^R 3-Enhancer		1,0	1,0	1,0

Die Orientierungen der Konstrukte sind mit einem Pfeil bzw. mit (+) und (-) gekennzeichnet. Die Mittelwerte der CAT-Aktivitäten (-fach zum pCAT^R3-Enhancer) sind für die einzelnen Zelllinien angegeben. Keine Aktivitäten (≤ 0.2 -fach) wurden mit „-“ bezeichnet. Einige Konstrukte wurden nicht in allen Zelllinien untersucht „n.g.“.

Diese Ergebnisse lassen sich wie folgt zusammenfassen:

- a) Die Promotoraktivität ist abhängig von der Art der Zelllinie. Deutlich erhöhte Promotoraktivität wurde nur in neuronalen Zellen gemessen.
- b) Transfektionen mit CAT-Konstrukten, die das DmDop1-Promotorfragment in entgegengesetzter (3'→5') Orientierung enthalten, führen -mit Ausnahmen- nur zu geringer Expression des CAT-Gens.
- c) Das 2 kb EcoRI-Promotorfragment reicht aus, um die Genaktivität des CAT-Gens zu steuern.
- d) Der DmDop1-Promotor besitzt sowohl Bereiche, die die Transkriptionsaktivität steigern als auch inhibieren. In der menschlichen Neuroblastom-Zelllinie (SK.N.SH) liegen stark aktivierende Sequenzen im Bereich (-454/+125); inhibierende Sequenzen wurden im Bereich (-1063/-454) und (+125/+495) identifiziert. In der Maus-Neuroblastom-Zelllinie Neuro 2a wurde mit dem pCATEnhPD1(-205/+125)-Promotorkonstrukt eine deutliche Aktivität, in den HEK293 Zellen nur eine schwache Promotoraktivität erreicht.
- e) Der DmDop1-Promotor reicht allein zur Transkription des CAT-Gens nicht aus, sondern benötigt zusätzlichen Enhancer-Elemente, wie sie bspw. vom pCAT^R3-Enhancer-Vektor zur Verfügung gestellt werden.

3.3 Nachweis der Protein-Promotorwechselwirkungen des DmDop1-Gens durch Gelshift-Assays (Hendrickson, 1985; Manley et al., 1980)

Durch die CAT-Reportergenassays wurden die Promotorbereiche des DmDop1-Gens identifiziert, die für die Aktivierung bzw. Inhibierung der Transkription von Bedeutung sind. In den Bereichen (-1063/-454), (-205/+125) und (+125/+495) vom Transkriptionsstart entfernt, befinden sich potentielle Bindestellen für Transkriptionsfaktoren (3.1.6), insbesondere CREB (+125/+495) (Abb. 9 B). Um zu überprüfen, ob tatsächlich Faktoren an diese DNA-Sequenzabschnitte binden, wurden Gelshift-Experimente durchgeführt. Für die Gelshift-Assays wurde 150-400 bp große Promotorfragmente verwendet, die entweder durch PCR (Abb. 14A und C) oder durch Restriktion mit verschiedenen Enzymen hergestellt wurden (Abb. 14B und D) (2.27). Die Fragmente wurden mit [γ^{32} P]ATP radioaktiv markiert und dann mit Proteinextrakten aus Zellkernen von SK.N.SH-Zellen inkubiert. Als Positivkontrolle wurde ein Kernextrakt aus Hela-Zellen (Fa. Stratagene) verwendet, der mit einem doppelsträngigen Kontroll-Oligonukleotid (2.27) inkubiert wurde. Binden Proteine aus den Extrakten an die DNA-Fragmente, so besitzen sie eine veränderte Mobilität in einem nativen Gelsystem. Die Inkubation der Fragmente mit den Extrakten erfolgte für 30 min bei 4°C. Die Proben wurden auf ein 6 % Polyacrylamidgel aufgetragen (2.27), das Gel anschließend getrocknet und eine Autoradiographie angefertigt.

Die Ergebnisse sind in Abb. 14A-D dargestellt. In Abb. 14C und D (rechte Seite) sind die Ergebnisse der Gelshift-Assays zusammengefaßt.

In Spur 1 der Abb. 14A und B (Positivkontrolle, doppelsträngiges Kontroll-Oligonukleotid, das mit dem Hela-Kernextrakt inkubiert wurde) ist eine deutliche Änderung des Fragmentlaufverhaltens zu sehen. In Spur 2 (Abb. 14A und B) ist das Kontroll-Oligonukleotid ohne Zellextrakt aufgetragen. In Spur 5 (PCR-Fragment #2358/#2344) und Spur 11 (PCR-Fragment #2363/808) (Abb. A) sind neben den radioaktiv markierten Ausgangsfragmenten ebenfalls zusätzliche Banden zu sehen, die ein geändertes Laufverhalten aufweisen und in den Kontrollspuren (ohne Proteinzugabe) Spur 6 und 12 nicht auftreten. Auch in Spur 7 (PCR-Fragment #2359/#2360), Spur 9 (PCR-Fragment #2361/#2362) und Spur 13 (PCR-Fragment #262/#285) treten zusätzliche Banden auf. Jedoch ist die Intensität dieser Fragmente deutlich geringer als bspw. in Spur 11 (Abb. 14A). In Spur 3 (PCR-Fragment #2356/#2357) ist ein sehr schwache zusätzliche Bande zu sehen. In den Spuren ohne Proteinzugabe (Spur 4, 8, 10 und 14) treten diese zusätzlichen Banden nicht auf.

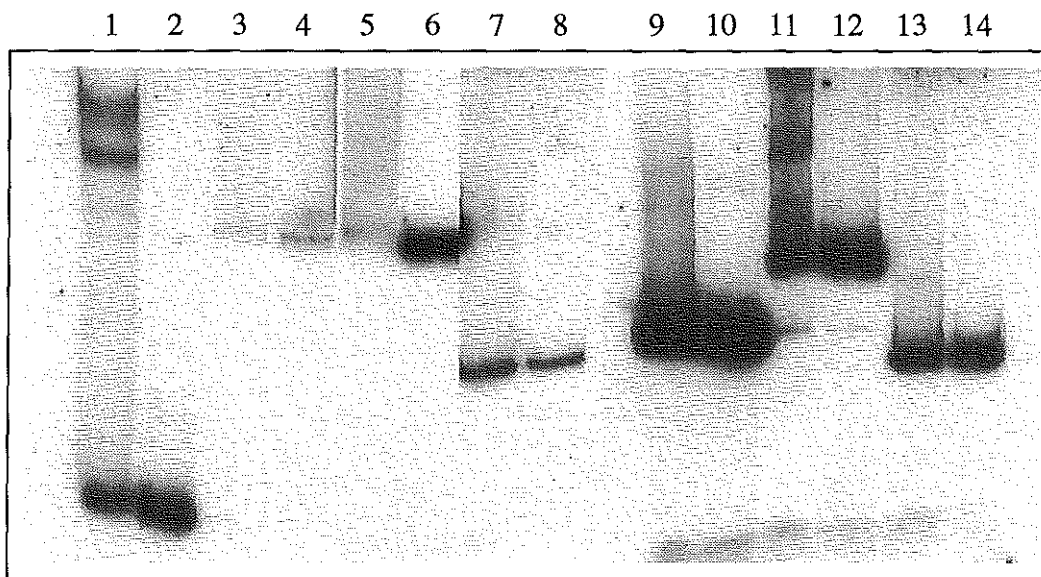
In Abb. 14B wurden für das Gel-Shift-Experiment radioaktiv markierte Restriktionsfragmente des DmDop1-Promotorbereichs verwendet. Neben den Ausgangsfragmenten ist in den Spuren 3 (NdeI/MluI-Fragment) und Spur 5 (AvaI/PstI-Fragment) zusätzlich eine deutliche Bande zu erkennen. In der Spur 9 (XhoI/EcoRI-Fragment) ist nur eine sehr schwache Bande zu sehen. Diese zusätzlichen Banden treten in den Spuren ohne Proteinzugabe (Spur 4, 6, und 10) nicht auf. In den Spuren 7 (MluI/EcoRI-Fragment) und 11 (NdeI/PstI-Fragment) ist kein

zusätzliches Fragment zu den Fragmenten aus Spur 8 und 12 (ohne Proteinzugabe) zu erkennen.

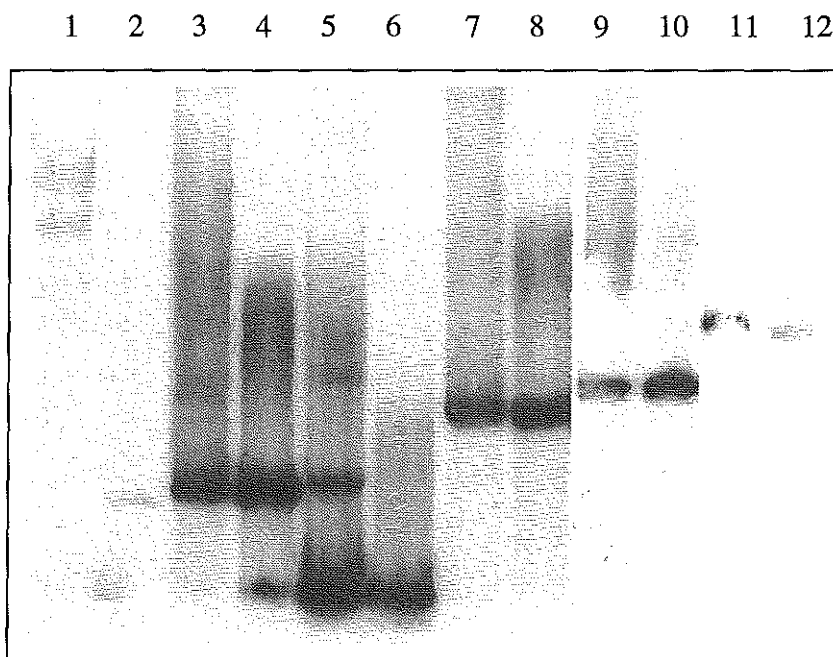
Diese Ergebnisse können wie folgt zusammengefaßt werden:

Es wurde sowohl in den Promotorbereichen (-1063/-454 bp) und (+125/+495 bp) als auch im Bereich (-454/+125 bp), eine Bindung von SK.N.SH-Kernproteinen nachgewiesen.

A



B



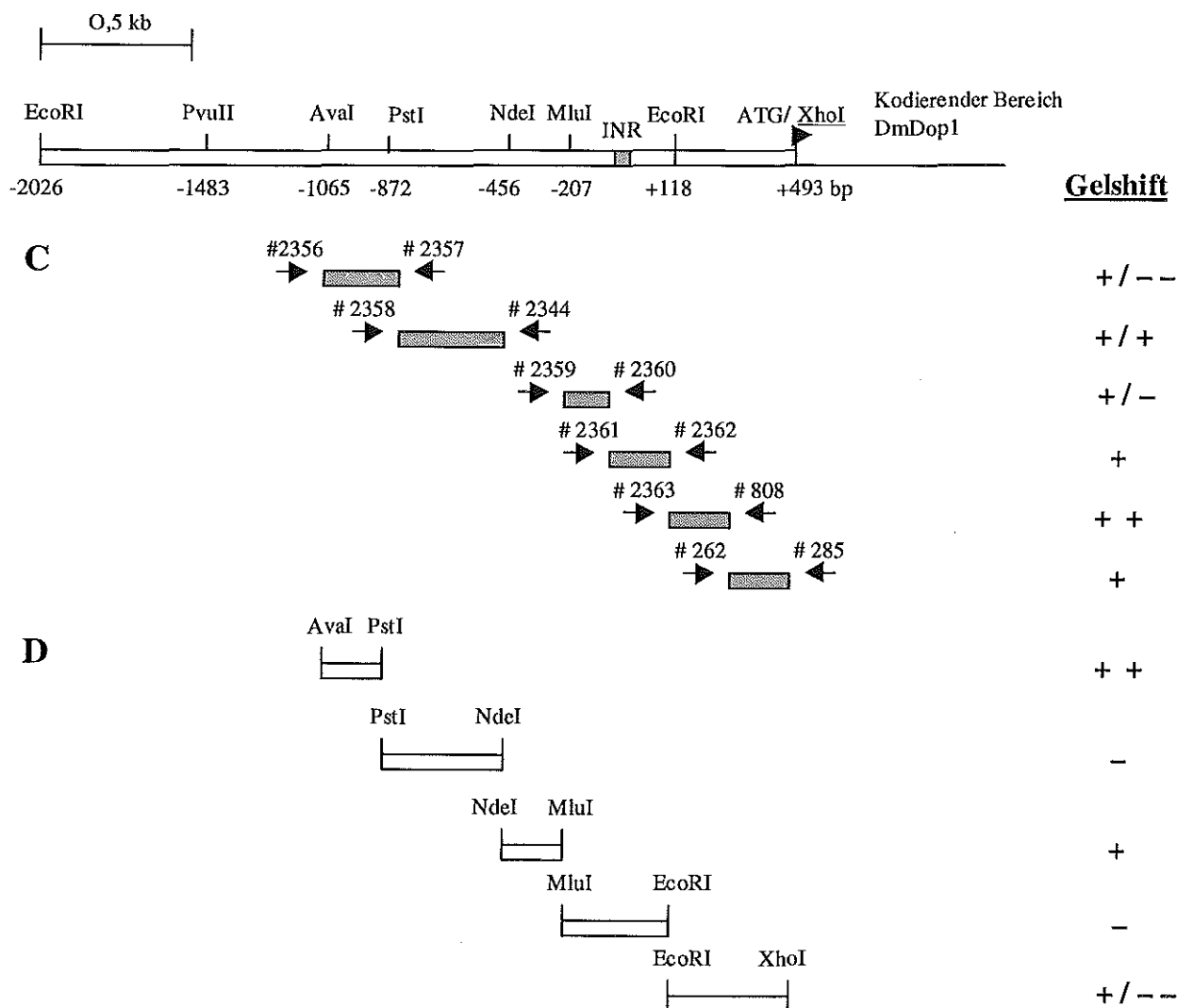


Abb. 14: A) Gelshift-Assay mit PCR-Promotorfragmenten des DmDop1-Gens. In Spur 1 ist die Positivkontrolle (Kontroll-Oligonukleotid mit Hela-Kernextrakt), in Spur 2 die Negativkontrolle (DNA ohne Kernextrakt) aufgetragen. In Spur 3, 4 ist das PCR-Fragment #2356/#2357, in Spur 5, 6 das PCR-Fragment #2358/#2344 in Spur 7, 8 das PCR-Fragment #2359/#2360, in Spur 9, 10 PCR-Fragment #2361/#2362, in Spur 11, 12 PCR-Fragment #2363/#808 und Spur 13, 14 PCR-Fragment #262/#285 jeweils mit (Spur 3,5,7,9,11) und ohne (Spur 4,8,10,12) SK.N.SH-Kernextrakt Inkubation aufgetragen. B) Gelshift-Assay mit Restriktionsfragmenten des DmDop1-Promotors. In Spur 1 ist die Positivkontrolle (Kontroll-Oligonukleotid mit Hela-Kernextrakt), in Spur 2 die Negativkontrolle (DNA ohne Kernextrakt) aufgetragen. In Spur 3, 4 ist das NdeI/MluI-Fragment, in Spur 5, 6 das Aval/PstI-Fragment, in Spur 7, 8 das MluI/EcoRI-Fragment, in Spur 9, 10 das XhoI/EcoRI-Fragment und in Spur 11, 12 das NdeI/PstI-Fragment jeweils mit (Spur 3,5,7,9,11) und ohne (Spur 4,8,10,12) SK.N.SH-Kernextrakt Inkubation aufgetragen. C) PCR-Fragmente des DmDop1-Promotors. Die Lage der für den Gelshift-Assay (Abb. A) verwendeten PCR-Fragmente ist gezeigt. Die Auswertung der Ergebnisse des Gelshift-Assays ist rechts neben den jeweiligen PCR-Fragmenten angegeben; ++ = sehr starke Bande (Gelshift); +/+ = starke Bande; + = mittelstarke Bande; +/- = schwache Bande; +/- - = sehr schwache Bande; - = keine Bande D) Restriktions-Fragmente des DmDop1-Promotors. Die Lage der für den Gelshift-Assay (Abb. 14B) verwendeten Restriktionsfragmente ist gezeigt. Eine Zusammenfassung der Ergebnisse des Gelshift-Assays ist rechts neben den jeweiligen Restriktionsfragmenten angegeben.

3.4 Entwicklungs- und gewebespezifische Lokalisation der DmDop1-mRNA

Transkripte des DmDop1-Gens wurden in Adult-Stadien in Köpfen, Körpern und Antennen nachgewiesen (Dr. Arbeit, F. Gotzes). Die Ergebnisse der Northern-Analyse (3.1.1) zeigten, daß DmDOP1-Transkripte schon früh in der Entwicklung (Embryo) vorhanden sind. Es war jedoch unklar, ob eine entwicklungs- und möglicherweise geschlechtsspezifische Expression des DmDop1-Gens stattfindet. Diese Fragestellungen wurden durch PCR-Analysen und schließlich mit *in situ* Hybridisierungen an Gefrierschnitten getestet.

3.4.1 RT (Reverse Transkriptase)-PCR Analyse der DmDop1-mRNA

Für die RT-PCR Analyse wurde RNA aus Embryonen (0-4h), (4-8h), (0-16h), drittes Larvenstadium und Puppen sowie aus Köpfen und Körpern untersucht. Die RNA wurde mittels eines oligo-dT-Primers und der M-MLV Reversen Transkriptase in cDNA umgeschrieben (2.16) und anschließend für die Amplifikation mit genspezifischen Primern, #2215 und #2216, eingesetzt (s. Anhang). Als Positivkontrolle wurde DmDop1-DNA verwendet. Die Amplifikation der cDNA Präparationen erfolgte über drei Exone (3, 4 und 5) hinweg. Amplifikationsprodukte auf genomischer DNA (~ 9kb) sollten unter diesen Bedingungen nicht entstehen. Darüberhinaus mußte das PCR-Fragment eine MluI-Schnittstelle (Bp 1136 in DmDop1) besitzen, so daß das Amplifikationsprodukt durch Restriktion identifiziert werden konnte. Amplifikationsprodukte wurden in allen Präparaten erhalten. Die Fragmente waren mit MluI spaltbar (Abb. 15).

Die Untersuchung zeigt, daß das DmDop1-Gen in allen Stadien der *Drosophila*-Entwicklung transkribiert wird.

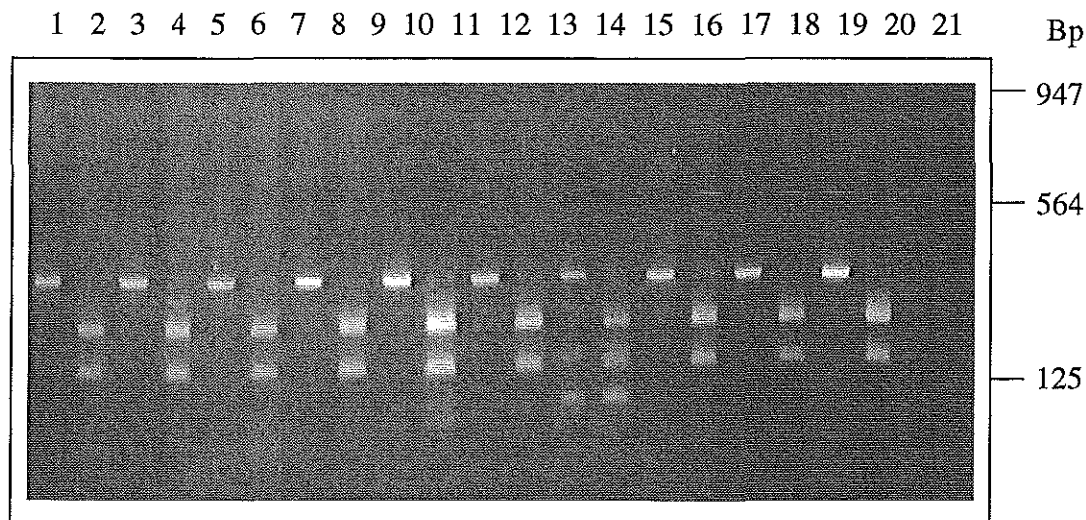


Abb. 15: RT-PCR Analyse der gewebs- und entwicklungsspezifischen Transkription der DmDop1-mRNA. Es sind jeweils ungeschnittene und mit MluI geschnittene PCR-Produkte aufgetragen. Spur 1 = Embryo (0-4 h); Spur 2 = Embryo (0-4 h), MluI geschnitten; Spur 3 = Embryo (4-8 h); Spur 4 = Embryo (4-8 h), MluI geschnitten; Spur 5 = Embryo (0-16 h); Spur 6 = Embryo (0-16 h), MluI geschnitten; Spur 7 = Kopf (Männchen); Spur 8 = Kopf (Männchen), MluI geschnitten; Spur 9 = Körper (Männchen); Spur 10 = Körper (Männchen), MluI geschnitten; Spur 11 = Kopf (Weibchen); Spur 12 = Kopf (Weibchen), MluI geschnitten; Spur 13 = Körper (Weibchen); Spur 14 = Körper (Weibchen), MluI geschnitten; Spur 15 = 3. Larve; Spur 16 = 3. Larve, MluI geschnitten; Spur 17 = Puppe; Spur 18 = Puppe, MluI geschnitten; Spur 19 = DmDop1 (Positivkontrolle); Spur 20 = DmDop 1, MluI geschnitten; Spur 21 = Wasserkontrolle

Die Untersuchung der Promotoraktivität des DmDop1-Gens in den Zelllinien SK.N.SH, Neuro2a und HEK293 hatte gezeigt, daß hohe Reporterogenaktivitäten nur in SK.N.SH-Zellen erreicht wurden. Dieses Ergebnis deutet darauf hin, daß in den Zellen spezifische Faktoren zur Verfügung stehen, die die Dopamin-Rezeptor Expression ermöglichen. Tatsächlich wurde in einer den SK.N.SH-Zellen verwandten Zelllinie (SK.N.MC) gezeigt, daß der menschliche Dopamin D1-Rezeptor exprimiert wird (Minowa et al., 1993). Es sollte deshalb geprüft werden, ob dies auch in den SK.N.SH-Zellen der Fall ist. Dies wurde mit einer RT-PCR Analyse überprüft. Für die Amplifikation wurde RNA aus SK.N.SH-Zellen in 1. Strang cDNA umgeschrieben und dann mit den genspezifischen Primern #2282 und #2283 (hybridisieren im humanen DmDop1-Gen, s. Anhang) eine PCR durchgeführt. Als Positivkontrolle wurde

eine PCR unter Verwendung der gleichen Primer auf dem menschlichen Dopamin D1-Rezeptor-Klon durchgeführt. Sowohl für die SK.N.SH-Zellen als auch für die Positivkontrolle entstand ein Amplifikationsprodukt von ca. 600 Bp (Abb. 16).

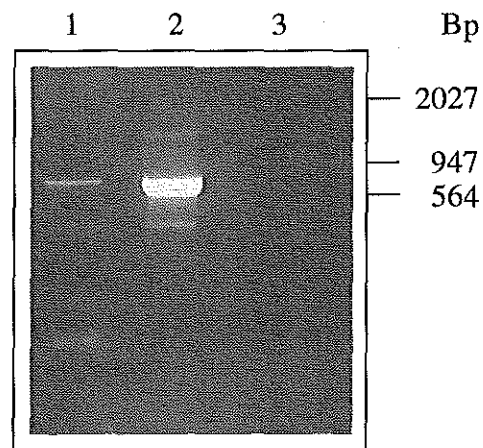


Abb. 16: RT-PCR Analyse des humanen Dopamin D1-Transkriptes in SK.N.SH-Zellen. Spur 1 = SK.N.SH-Zellen; Spur 2 = hDop1 (Positivkontrolle), Spur 3 = Wasserkontrolle.

3.4.2 *In situ* Hybridisierung an Gefrierschnitten von *Drosophila melanogaster*

Die RT-PCR Experimente haben gezeigt, daß DmDop1-Transkripte sowohl in allen Entwicklungsstadien der Fliege, als auch im Kopf und im Körper männlicher und weiblicher Fliegen vorhanden sind. Um die Lokalisation der DmDop1-Transkripte auch auf zellulärer Ebene zu bestimmen, wurden *in situ* Hybridisierungen an Gewebeschnitten von *Drosophila* durchgeführt. Die Herstellung der Gewebeschnitte sowie die Durchführung der Nachweisreaktion erfolgte wie unter 2.18 beschrieben. Es wurde eine sense- und eine antisense-RNA-Sonde zur Hybridisierung eingesetzt. Für die Transkription wurde das Konstrukt pBGPB verwendet (Dr. Arbeit F. Gotzes). Es enthält die Sequenz, die für die G-Protein-Bindestelle kodiert. Die G/C-reichen Abschnitte sind aus der multiplen Klonierungsstelle des pBluescript-Vektors zwischen SacI und XbaI (sense-Sonde) bzw. zwischen HindIII und KpnI (antisense-Sonde) entfernt worden. Für die Herstellung der antisense-Sonde wurde das Plasmid mit dem Restriktionsenzym Bam HI linearisiert und mit T7-RNA-Polymerase transkribiert. Zur Synthese der sense-Sonde wurde mit dem Restriktionsenzym HindIII linearisiert und die T3-RNA-Polymerase benutzt. Bevor die Transkripte zur Hybridisierung eingesetzt wurden, wurde die Menge der synthetisierten RNA sowie die Markierungseffizienz mit Digoxigenin bestimmt (2.18.1). Zusätzlich wurden Southern-Blot-Hybridisierungen mit den Transkripten durchgeführt.

Mit den antisense-Sonden wurden in den Gewebeschnitten spezifische Färbungen erzielt. Hybridisierungs-Signale wurden im Frontal-Kopfschnitt in den Perykarien des ZNS, den optischen Loben, sowie in den Photorezeptorzellen beobachtet (Abb. 17A). In den Körper-Sagittalschnitten sind Färbungen im Unterschlundganglion sowie in den männlichen und weiblichen Gonaden (Testis und Ovarien) zu erkennen (Abb. 18A und B). In den Larven-Sagittalschnitten wurden auch Signale sowohl im Gehirn, als auch in den Gonaden beobachtet (Abb. 19). Bei der Verwendung der sense-Sonden wurde kein Signal beobachtet (Abb. 17C).

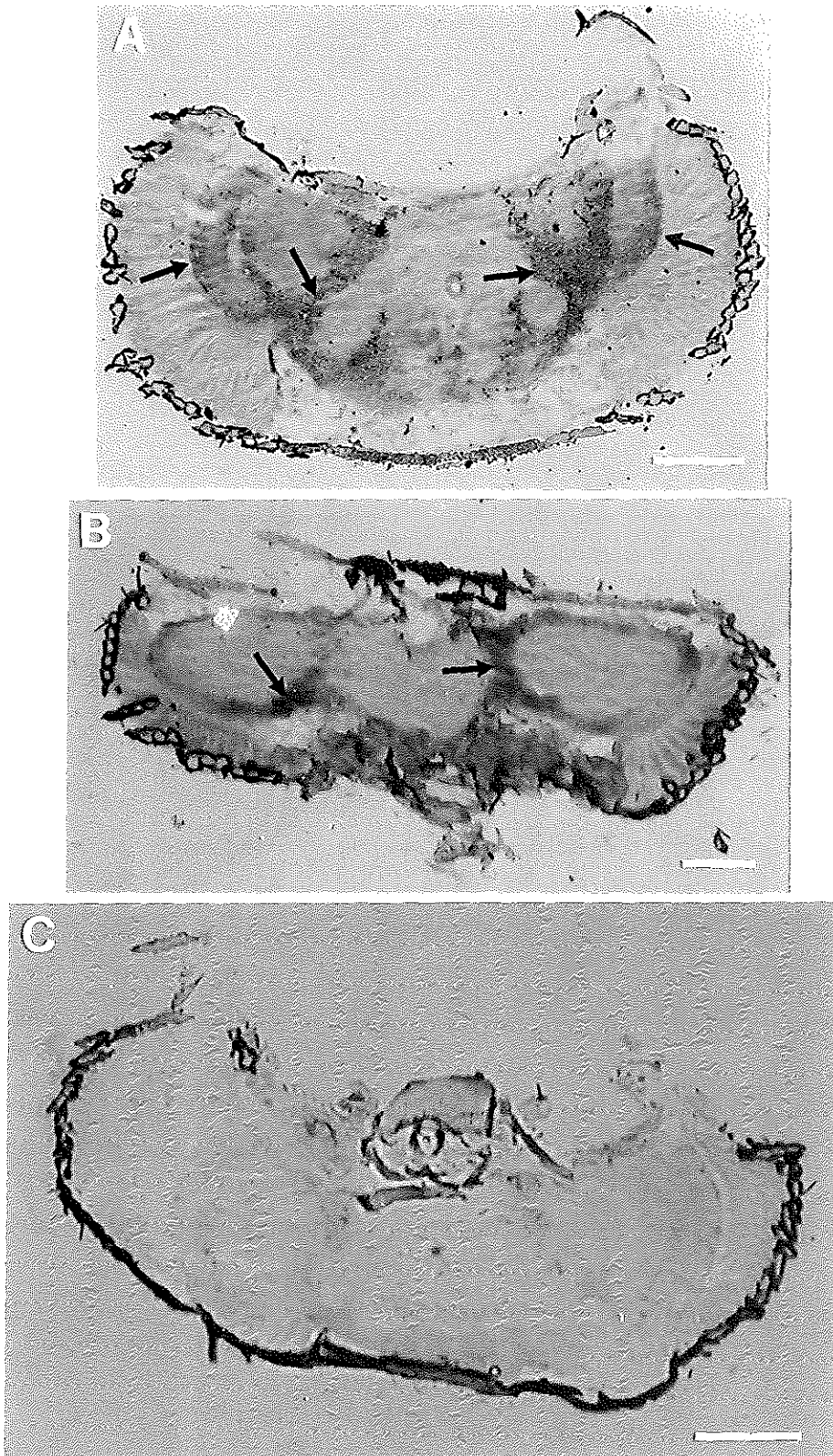


Abb. 17: *In situ*-Hybridisierung an Gewebeschnitten adulter *Drosophila*-Köpfe. A) Frontalschnitt eines *Drosophila*-Kopfes. Die Hybridisierung erfolgte mit einer *antisense*-RNA-Sonde aus der G-Protein-Bindestelle. B) Horizontalschnitt eines *Drosophila*-Kopfes. Die Hybridisierung erfolgte mit einer *antisense*-RNA-Sonde aus der G-Protein-Bindestelle. C) Frontalschnitt eines *Drosophila*-Kopfes. Die Hybridisierung erfolgte mit einer *sense*-RNA-Sonde aus der G-Protein-Bindestelle. Die spezifischen Signale sind durch Pfeile (A und B) gekennzeichnet und im Text erklärt. Die eingezeichneten Balken kennzeichnen eine Länge von 100 µm.

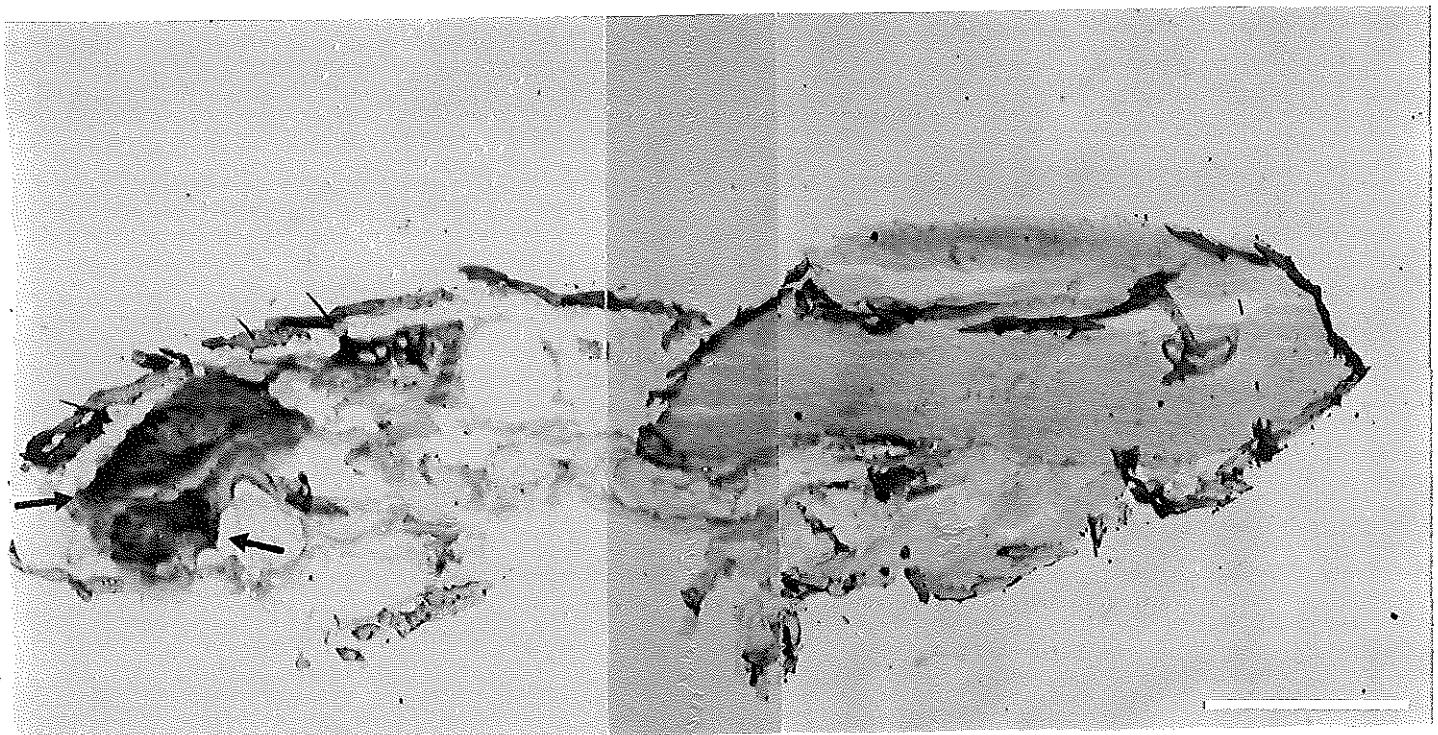
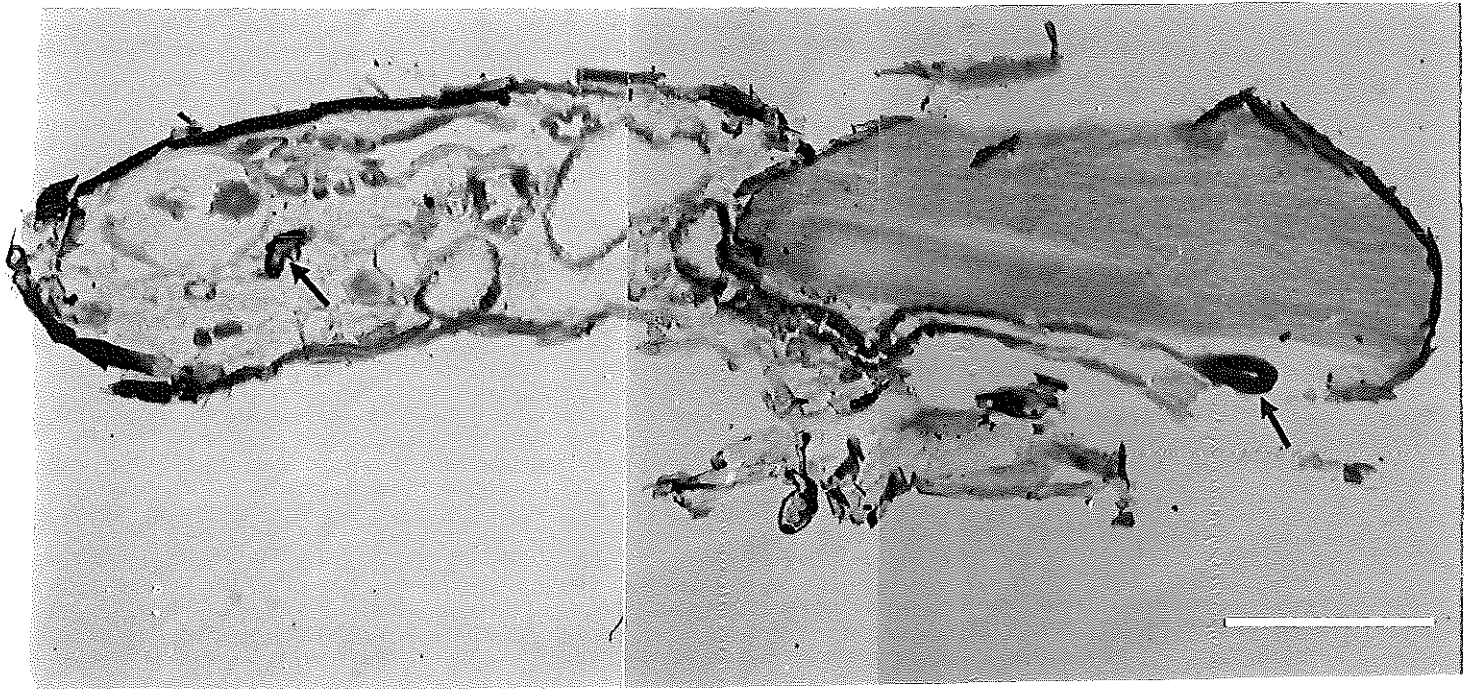


Abb. 18: *In situ*-Hybridisierung an Gewebeschnitten adulter *Drosophila*-Körper. A) Sagittalschnitt eines *Drosophila*-Männchens. B) Sagittalschnitt eines *Drosophila*-Weibchens. Die Hybridisierung erfolgte mit einer *antisense*-RNA-Sonde aus der G-Protein-Bindestelle. Die spezifischen Signale sind durch Pfeile (A und B) gekennzeichnet und im Text erklärt. Die eingezeichneten Balken kennzeichnen eine Länge von 100 μ m.

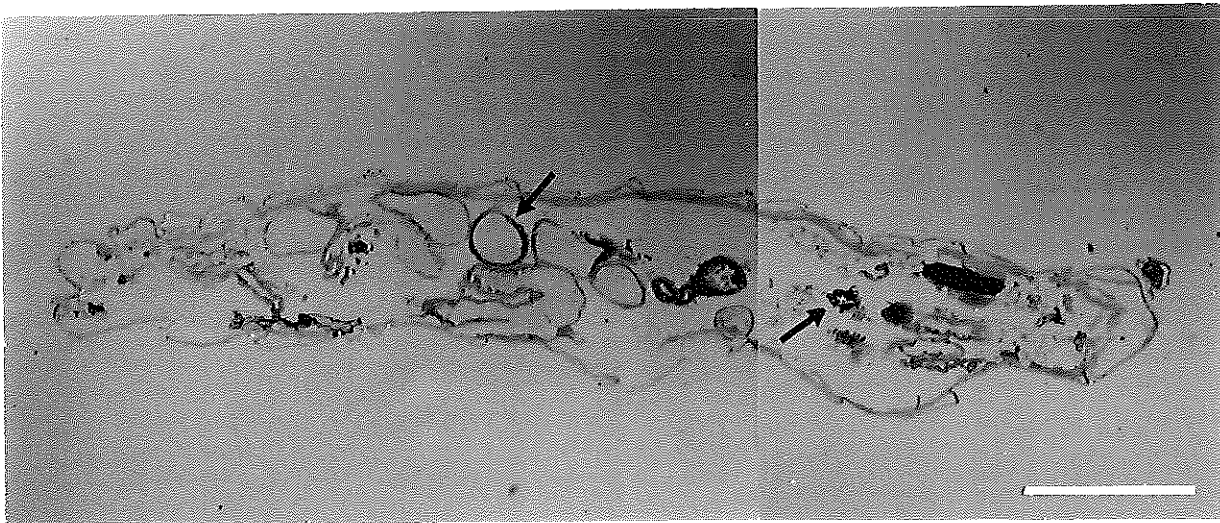


Abb. 19: *In situ*-Hybridisierung am Sagittalschnitt einer *Drosophila*-Larve. Die Hybridisierung erfolgte mit einer *antisense*-RNA-Sonde aus der G-Protein-Bindestelle. Die spezifischen Signale sind durch Pfeile gekennzeichnet und im Text erklärt. Der eingezeichnete Balken kennzeichnet eine Länge von 100 μm .

3.5 Herstellung eines spezifischen DmDop1-Antikörpers

Um die Expression des DmDop1-Rezeptors auch auf Proteinebene nachweisen zu können, sollte ein spezifischer, polyklonaler Antikörper hergestellt werden, der gegen die G-Protein-Bindestelle des Rezeptors gerichtet ist. Für die Immunisierung wurde ein Fusionsprotein in *E.coli* Zellen überexprimiert, dessen N-Terminus aus 6 Histidin-Aminosäuren besteht, an die sich die Sequenz des DmDop1-Rezeptors anschließt. Die Verwendung des His-TAGs (Qiagen) ermöglicht eine affinitätschromatographische Reinigung des Proteins.

3.5.1 Anfügen des His-TAGs an die DmDop1-Sequenz

Zur Konstruktion des Plasmids pQEDmDop1 wurde ein ca. 200 Bp großes Fragment aus der kodierenden Region des DmDOP1-Rezeptors verwendet, das für die G-Protein-Bindestelle kodiert. Das Fragment wurde mittels einer PCR-Reaktion aus pBDmDop1 amplifiziert (Abb. 20). Unter Verwendung des Primers #2262, der bei 1346 Bp in der DmDop1-Sequenz hybridisiert (s. Anhang) wurde eine BamHI-Schnittstelle eingefügt. Der Gegenprimer #2263 hybridisierte bei 1552 Bp in der DmDop1-Sequenz (s. Anhang) und enthielt eine HindIII-Schnittstelle. Das Fragment wurde BamHI/HindIII in den Vektor pQE30 kloniert (pQEDmDop1) (Abb.20). Das Konstrukt enthält am 5'-Ende die kodierende Sequenz des His-TAGs, an die sich im gleichen Leserahmen die kodierende Sequenz des DmDop1-Rezeptorfragments anschließt.

3.5.2 Expression des pQEDmDOP1-Fusionsproteins

Die Expression des pQEDmDop1-Fusionsproteins erfolgte in *M15-E.coli* Zellen (2.22.1). Transformierte Zellen wurden bis zu einer $OD_{600}=0,5$ bei 37 °C inkubiert. Die Expression des Fusionsproteins wurde mit IPTG für 3h induziert. Das Fusionsprotein ist zum größten Teil unlöslich. Deshalb wurde die Reinigung unter denaturierenden Bedingungen über eine Ni-NTA-Säule durchgeführt (2.22.1). Das Eluat wurde in einer Konzentration von 500 µg/ 2 ml PBS für die Immunisierung des Kaninchens eingesetzt. Das Serum aus der dritten und vierten Blutung wurde in einem Western-Blot (2.22) untersucht. Beide Seren können in einer Verdünnung von 1:2500 eingesetzt werden und erkennen 10 ng des gereinigten Fusionsproteins.

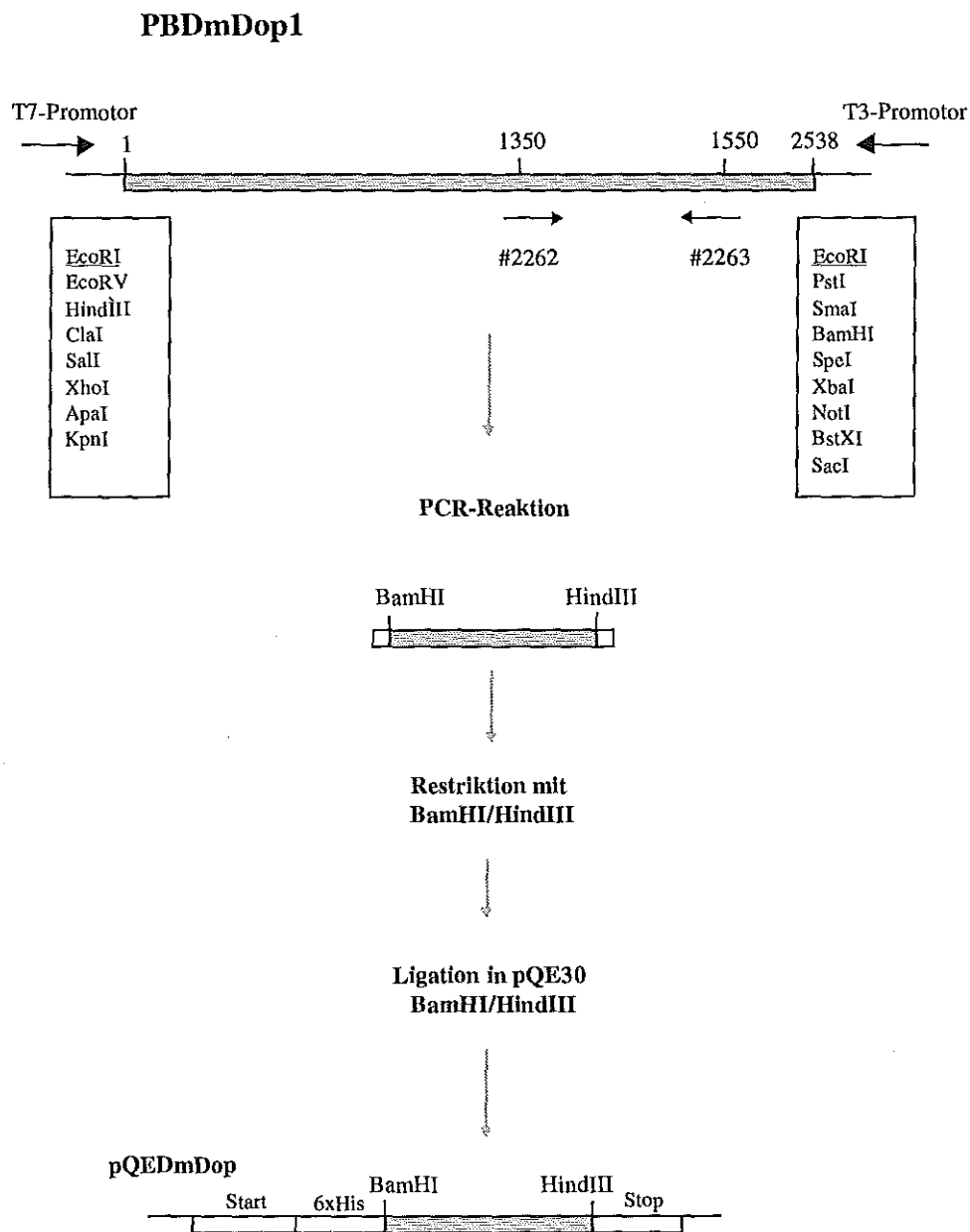


Abb. 20: Konstruktion des pQEDmDop1-Konstrukts zur Herstellung eines spezifischen DmDop1-Antikörpers. Die Konstruktion des Plasmids wurde wie im Text beschrieben, durchgeführt. Das pQEDmDop1-Konstrukt enthält die kodierende Sequenz des His-TAGs, an das die Sequenz der G-Protein-Bindestelle des DmDop1-Rezeptors angefügt wurde. 6xHis = TAG bestehend aus 6 Histidinen; Start = Translationsstart; Stop = Translationsstop.

4. Diskussion

Die funktionellen und pharmakologischen Eigenschaften verschiedener Neurotransmitter-Rezeptoren sind von vielen Arbeitsgruppen intensiv untersucht worden. Bisher ist jedoch nur wenig über die Regulation ihrer Gene bekannt. In der vorliegenden Arbeit wurde zum ersten Mal der Promotor eines biogenen Amin-Rezeptorgens aus *Drosophila melanogaster* kloniert. Der Promotorbereich des Gens unterscheidet sich sowohl hinsichtlich seiner Struktur, als auch seiner funktionellen Eigenschaften von den bisher untersuchten Promotoren verschiedener Vertebraten-Rezeptorgene.

4.1 Identifizierung des Promotorbereichs eines Dopamin D1-Rezeptorgens aus *Drosophila melanogaster*

Für eine eindeutige Identifizierung der Promotorregion des DmDop1-Rezeptorgens mußten die fehlenden cDNA-Sequenzen am 5'- bzw. 3'-Ende des Gens isoliert werden. Aus den Ergebnissen der Northern-Blot Analyse (3.1.1) ging hervor, daß das Transkript um ca. 300 Bp länger war als die klonierte cDNA (DmDop1). Da das Rezeptorgen gespleißt ist (Gotzes et al., 1994), bestand die Möglichkeit, daß das 1. Exon des DmDop1-Gens nochmals durch Intronsequenzen unterbrochen wird. Der Sequenzvergleich von insgesamt 40 unabhängigen 5'-RACE-Klonen mit der genomischen Sequenz (3.1.5), die im Phagen λ 32 enthalten ist, ergab, daß das 1. Exon 125 Bp in 5'-Richtung länger ist und nicht von einem Intron unterbrochen wird. Die Ergebnisse der 3'-RACE zeigten, daß die 3'-Sequenz der DmDop1-cDNA bereits vollständig war (3.1.4). Berücksichtigt man, daß mRNA-Moleküle ein poly-(A)⁺-Ende von ca. 100-150 Basen besitzen, so stimmen die Ergebnisse der RACE-Analysen gut mit der aus dem Northern-Blot ermittelten Transkriptgröße (ca. 2,9 kb) überein. Die insgesamt klonierte cDNA des DmDop1-Gens ist 2663 Bp groß. Der 5'- nicht-translatierte Bereich umfaßt 490 Bp. Der 3'-nicht-translatierter Bereich besteht aus 637 Bp. Damit weicht das DmDop1-Gen etwas von der mittleren Größe eines *Drosophila*-Gens ab: Die mittlere mRNA-Größe beträgt 1803 Bp, davon sind 123 Bp 5'- und 246 Bp 3'- nicht-translatierte Bereiche (Maroni, 1994). Der Transkriptionsstart des DmDop1-Gens wurde mit der „Primer-Extension“ Methode (3.1.5) ermittelt. Ein „Guanosin“ wurde als Startnukleotid des DmDop1-Transkripts identifiziert. Dieses Guanosin ist ebenfalls 1. Nukleotid der drei größten 5'-RACE-Klone. Im Bereich des Transkriptionsstarts des DmDop1-Gens wurde eine Initiator-Konsensussequenz (=INR-Element) identifiziert (3.1.5), die sehr gut mit INR-Sequenzen anderer *Drosophila*-Promotoren übereinstimmt. Ungefähr 50 % aller *Drosophila*-Promotoren besitzen solche INR-Elemente (Arkhipova, 1995). Bei der Primer-Extension Analyse (3.1.5) wurde neben den Produkten von 125/123 Bp Länge zusätzliche Banden von 103/102 Bp Länge gefunden. Möglicherweise ist die cDNA-Synthese aufgrund von Sekundärstrukturen der mRNA vorzeitig abgebrochen, oder, alternativ, es existiert ein weiterer

Transkriptionsstart, der um 22 Bp verkürzt ist. Die zweite Annahme könnte richtig sein, denn im Bereich von +19 bis +27 des Promotorbereichs befindet sich ein weiteres INR-Element: TTCAGTTCG. Darüberhinaus beginnen die 104- bzw. 103 Bp großen 5'-RACE-Klone mit dem „Guanosin“ bzw. „Thymidin“ dieser INR-Sequenz. Da die Primer-Extension-Produkte bei 104/103 Bp jedoch deutlich geringer konzentriert sind, als die Produkte bei 123 bzw. 125 Bp (Abb. 8), ist anzunehmen, daß hauptsächlich das größere Transkript vom DmDop1-Gen abgelesen wird. Im Promotor des menschlichen Dopamin D1_A-Rezeptors wurden ebenfalls zwei Transkriptionsstartpunkte identifiziert (Lee et al., 1996). Ein Promotor befindet sich vor dem 1. Exon, der zweite Promotor befindet sich im Intron zwischen Exon 1 und 2. Im Promotorbereich des Dopamin D2-Rezeptorgens aus der Ratte wurden sogar drei Transkriptionsstartpunkte identifiziert (Minowa et al., 1992). Bisher wurden mehrere Transkriptionsstartpunkte u.a. für sogenannte „Haushaltsgene“ beschrieben (Minowa et al., 1992). Da sowohl der Dopamin-Rezeptor aus *Drosophila melanogaster* (Gotzes et al., 1994) als auch die D1_A- und D2-Rezeptoren nur in Neuronen und Niere exprimiert werden, scheint die Existenz mehrerer Transkripte keinen unmittelbaren Einfluß auf die zelltypspezifische Expression der Gene zu haben (Minowa et al., 1992; Lee et al., 1996).

4.2 Promotorstruktur des DmDop1-Gens

Der Transkriptionsstart des DmDop1-Gens liegt in einem 2149 Bp großen EcoRI-Fragment des genomischen Phagen λ 32 (3.1.5/6). Der Promotor besitzt weder eine TATA-Box, noch eine CAAT-Box. Im Bereich des Transkriptionsstarts befinden sich mehrere GC-reiche Sequenzabschnitte. Auch die Promotoren der Vertebraten-D1_A und D2-Rezeptoren besitzen keine TATA- und CAAT-Boxen, jedoch GC-reiche Sequenzabschnitte im Bereich des Transkriptionsstarts. In diesen Promotoren wurden Bindestellen für die Transkriptionsfaktoren SP1 (Gidoni et al., 1984) sowie AP1 und AP2 (Beischlag et al., 1995; Minowa et al., 1992) identifiziert. SP1 ist ein Transkriptionsfaktor, der an der Regulation vieler Gene von Säugern beteiligt ist. Er bindet an GC-reiche Sequenzen und aktiviert zusammen mit weiteren Transkriptionsfaktoren die Transkription (Gidoni et al., 1984). Da auch im DmDop1-Promotor einige GC-reiche Sequenzabschnitte gefunden wurden, ist es denkbar, daß ein SP1-ähnlicher Faktor die Aktivität des *Drosophila*-Gens mitbestimmt.

Die DmDop1-Promotorsequenz wurde auf potentielle Bindestellen *Drosophila*-spezifischer Transkriptionsfaktoren untersucht. Es wurden Bindestellen für zeste, DEP2 und su(Hw) identifiziert. Zeste ist ein Transkriptionsfaktor, der zur „Polycomb-Gruppe“ gehört (Pirrotta, 1987). Diese Transkriptionsfaktoren sind in *Drosophila* an der Zelldeterminierung beteiligt (Campbell et al., 1995). „Zeste“ ist ein Transkriptionsfaktor, der die Aktivierung einiger homeotischer Gene bspw. im „Antennapedia“- und „Bithorax“-Komplex verhindert. Es wurde gezeigt, daß zeste die Genregulation während der Entwicklung von *Drosophila* entscheidend beeinflusst (Benson & Pirrotta, 1987; Biggin et al., 1988; Mansukhani et al., 1988). Der

Transkriptionsfaktor DEP2 ist ein Protein, das Steroid-Hormonrezeptoren ähnlich ist. Eine spezifische Wechselwirkung von DEP2 wurde bspw. mit dem Enhancer des Alkohol-Dehydrogenase (Adh)-Gens von *Drosophila melanogaster* nachgewiesen (S. Ayer & C. Benyajati, 1992). Der Transkriptionsfaktor „suppressor of hairy wing“ (su(Hw)) ist ein Zn-Finger Protein, das an „gypsy“-Sequenzen bindet (Parkhurst et al., 1988; Spana et al., 1988; Mazo et al., 1989; Harrison et al., 1993). Gypsy-Elemente gehören wie bspw. P- und copia-Elemente zur Gruppe der transposablen Elemente von *Drosophila* und können nach ihrer Mobilisierung und erneuten Integration in das Genom Mutationen verursachen. (Modolell et al., 1993). Die Bindung des su(Hw)-Faktors blockiert die Aktivierung des Gens (Geyer et al., 1986; Peifer & Bender 1986; Jack et al., 1991; Dorset, 1993).

Im Bereich von +128 bis +135 wurde eine CRE-Bindestelle (cAMP-responsive element) identifiziert. Die CRE-Bindestelle ist eine 8 Bp lange palindromische Sequenz: TGACGTCA (Sassone-Corsi, 1995). An diese Sequenz binden Transkriptionsfaktoren der CREB/ATF-Familie. Diese Transkriptionsfaktoren sind Leucin-Zipper-Proteine. Ihre Aktivität wird cAMP-abhängig, d.h. Phosphorylierung durch PKA, reguliert. Die Proteine binden als Homo- oder Heterodimere und können sowohl aktivierend (CREB, ATF1 und CREM τ) (Gonzales & Montminy 1989; Rehfuss et al., 1991; Foulkes et al., 1992) als auch inhibierend (CREM α , β , γ und ICER (inducible cAMP early repressor) (Laoide et al., 1993; Molina et al., 1993; Stehle et al., 1993) auf die Transkription verschiedener Gene einwirken. Neben CREB/ATF-Proteinen ist ICER ein wichtiges Regulatorprotein, das Zellen vor apoptotischen Prozessen schützt, die durch cAMP eingeleitet werden können (Ruchaud et al., 1997). Es wurde auch ein CREB-Protein aus *Drosophila melanogaster* identifiziert, das dCREB2. Es besitzt eine Sequenzähnlichkeit von 90 % zum CREB-Protein aus Säugern (Yin et al., 1995). Transkriptionsfaktoren der CREB/ATF1-Familie spielen darüberhinaus bei der Schleimhautphysiologie (Borelli et al., 1989), der Spermatogenese (Foulkes et al., 1992, Delmas et al., 1993; Jégou, 1993), beim zirkulären Rhythmus (Takahashi, 1993; Ginty et al., 1993) sowie bei Lernvorgängen (Yin et al., 1994; Bourtschuladze et al., 1994; Hummler et al., 1994) eine wichtige Rolle. CRE-Bindestellen wurden auch im menschlichen D_{1A}-Promotor gefunden (Minowa et al., 1996). Inzwischen wurde gezeigt, daß sowohl das Gen des α -adrenergen Rezeptors des Menschen (Razik et al., 1997), als auch das Tyrosin-Hydroxylasegen des Menschen (Tinti et al., 1997), dem Schlüsselenzym für die Synthese von Dopamin, Noradrenalin und Adrenalin, durch CREB aktiviert werden.

4.3 Bestimmung der Promotoraktivitäten in neuronalen und nicht-neuronalen Zelllinien

Da der DmDop1-Rezeptor hauptsächlich im ZNS von *Drosophila* exprimiert wird (Gotzes et al., 1994), war zu erwarten, daß der Promotor in neuronalen Zellen aktiv ist. Die Bestimmung der CAT-Reporterergenassays erfolgte in den Neuroblastom-Zelllinien SK.N.SH (Mensch) (3.2.2.1), Neuro2a (Maus) (3.2.2.2) und in der menschlichen Nierenzelllinie HEK293 (3.2.2.3). CAT-Aktivitäten wurden ausschließlich mit pCAT^R3-Enhancer-Konstrukten und nicht mit pCAT^R3-Basic-Konstrukten (3.2.2.1) gemessen. Das Ergebnis zeigt, daß der DmDop1-Promotor ein schwacher Promotor ist, der zusätzliche Verstärkersequenzen benötigt, um die Reporter-Expression zu aktivieren.

Die höchsten CAT-Aktivitäten wurden in den neuronalen SK.N.SH-Zellen gemessen. Der DmDop1-Promotor besitzt einen stark aktivierenden Bereich (-454/+125) sowie zwei inhibierende-Bereiche, (-1481/-454) und (+125/+495) (3.2.2.1). Die Transkription des CAT-Reportergens wurde in den Konstrukten, die den Promotorbereich bis zum Initiationskodon des offenen Leserahmens (ATG; Position +495) enthielten, fast vollständig unterdrückt. Dieser Bereich muß daher ein starkes Silencer-Element besitzen. Es werden zwei Arten von Silencern unterschieden: 1) Silencer-Elemente und 2) negative regulatorische Elemente (NREs). Silencer-Elemente sind positions-unabhängige Elemente, an die ein Repressorprotein direkt binden kann und die Transkription inhibiert. NREs sind positions-abhängige Elemente. Die Inhibierung der Transkription erfolgt indirekt, indem Repressorproteine nahe einer Aktivator-Region binden können und dadurch die Bindung des Aktivatorproteins behindern (Ogbourne & Antalis, 1998).

Im Vergleich zu SK.N.SH-Zellen wurde in den Neuro2a-Zellen (3.2.2.2) nur mit den kleinsten Promotorkonstrukten (-454/+125) und (-205/+125) CAT-Aktivität nachgewiesen. Die in den HEK293-Zellen gemessenen Aktivitäten waren insgesamt sehr gering und für keinen Promotorbereich signifikant erhöht (3.2.2.3). Offensichtlich kann in HEK293-Zellen die DmDop1-Promotor-vermittelte Transkription des Rezeptorgens nicht ohne zusätzliche Faktoren gestartet werden. Die neuronalen Zellen (hier SK.N.SH und Neuro2a) müssen also spezifische Transkriptionsfaktoren besitzen, die die Aktivierung der Transkription ermöglichen bzw. verstärken. Eine mögliche Erklärung für die beobachteten Unterschiede zwischen den neuronalen Zelllinien und den HEK293 Zellen könnte in der endogenen Expression von Dopamin-Rezeptorgenen liegen. Mit der RT-PCR wurde ein spezifisches Transkript des Dopamin D1-Rezeptors in den SK.N.SH Zellen nachgewiesen (3.4.1). Neuro 2a-Zellen exprimieren ebenfalls endogen D1- und D2-Rezeptoren (Vickery & Zastrow, 1999), wohingegen HEK293 Zellen endogen keine Dopamin Rezeptoren exprimieren. Für die Aktivierung des Reportergens (CAT) durch den DmDop1-Promotor reichen die Transkriptionsfaktoren, die in HEK293 Zellen vorhanden sind, nicht aus. Es werden andere, spezifischere Proteine benötigt, wie sie bspw. von Neuro2a- und insbesondere SK.N.SH-

Zellen gebildet werden, um eine spezifische und deutliche Erhöhung der Reporterogenaktivität zu erzielen.

Viele Transkriptionsfaktoren sind zwischen evolutionär weit voneinander entfernten Organismen, wie bspw. Hefe, Maus und Mensch, hoch konserviert (Sauer & Tjian, 1997). Dies ist ein Grund dafür, daß ein *Drosophila*-spezifischer Promotor in den verwendeten Säugerzellen das CAT-Gen aktiviert. Im Promotor des DmDop1-Rezeptorgens sind Sequenzabschnitte enthalten, die selektiv eine zelltypspezifische, d.h. neuronale Expression des Gens ermöglichen. Zusätzlich wurden Bereiche identifiziert, die die Transkription in neuronalen Zellen abschaltet. Auch die Promotorregionen der Dopamin D1-, D2-, D4- und D5-Rezeptoren aus Vertebraten vermitteln die spezifische Expression eines Reporter gens nur in neuronalen Zellen. Die relative Stärke der Genexpression variiert jedoch zwischen den verschiedenen Zelllinien. Auch Vertebraten-Rezeptoren besitzen sowohl aktivierende als inhibierende Promotorbereiche. Die Position dieser Elemente im Promotor ist jedoch recht variabel. Der Promotor des menschlichen Dopamin D_{1A}-Rezeptors enthält zwei aktivierende Regionen im Bereich von (-525/-239) und (-1342/-1102) (Minowa et al., 1993; Lee et al., 1996). Der Promotor des Dopamin D2-Rezeptors aus der Ratte enthält im Bereich von (-75/-30) eine aktivierende und im Bereich von (-217/-76) eine Silencer-Region. Bei dem Promotor des Dopamin D4-Rezeptors des Menschen, ist wie beim DmDop1-Promotor, das kleinste Promotorfragment (-591/-123) am aktivsten. Dieses Fragment besitzt ebenfalls eine regulatorische Region, die für die zelltypspezifische Transkriptionsaktivität verantwortlich ist (Kamakura et al., 1997).

An die aktivierenden und inhibierenden Bereiche des DmDop1-Promotors können Transkriptionsfaktoren, insbesondere CREB binden (3.1.6). Eine Wechselwirkung zwischen Kernextraktproteinen aus SK.N.SH-Zellen und den durch CAT-Assays identifizierten regulatorischen Bereichen, wurde durch Gelshift-Untersuchungen gezeigt (3.3). Sowohl in dem aktivierenden Promotorbereich (-454/+125), als auch in den beiden Silencer-Bereichen (-1481/+454) und (+125/+495) wurden Fragmente nach der Inkubation mit Kernextraktproteinen aus SK.N.SH-Zellen im Gel zurückgehalten. Welche Faktoren aus SK.N.SH-Zellen an den DmDop1-Promotorbereich binden, ist im Rahmen dieser Arbeit nicht untersucht worden.

4.4 Zelltypspezifische Expression des DmDop1-Rezeptorgens

Der DmDOP1-Rezeptor wird spezifisch in neuronalen Zellen adulter Tiere exprimiert. Es war jedoch nicht bekannt, ob das Gen auch entwicklungsspezifisch exprimiert wird. Die Ergebnisse der RT-Analyse (3.4.1) zeigten, daß Transkripte des Gens in allen Entwicklungsstadien (Embryo, Larve, Puppe, Adult) von *Drosophila melanogaster* vorhanden sind. Das Rezeptorgen wird offensichtlich in allen Entwicklungsstadien konstitutiv exprimiert. Da RT-PCR-Produkte auch in RNA-Präparationen aus Körpern synthetisiert

wurden, sollte die gewebspezifische Verteilung der mRNA durch *in situ* Hybridisierungen an Gewebeschnitten aufgeklärt werden. Die Ergebnisse an Horizontal- und Frontalschnitten adulter Köpfe stimmten mit dem bereits bekannten Verteilungsmuster (Gotzes et al., 1994) sehr gut überein. DmDop1-mRNA wurde in den Perikaryen des ZNS sowie in der Retina und in den Antennen nachgewiesen. Der DmDOP1-Rezeptor wird im Kopf von *Drosophila* ausschließlich neuronal exprimiert.

Im Körper adulter Tiere wurde die mRNA sowohl im Unterschlundganglion sowie in den Gonaden nachgewiesen. Der Nachweis von DmDop1-Transkripten im Reproduktionsapparat ist jedoch nicht auf das Adult-Stadium beschränkt. Auch im dritten Larvenstadium können bereits Transkripte des DmDop1-Gens in den Gonaden nachgewiesen werden. Welche Funktion das dopaminerge System bei der Entwicklung und Reifung der Keimzellen hat, ist gegenwärtig unbekannt. Es wäre aber sehr interessant, diese Fragestellung weiter zu verfolgen. Neben den Gonaden wurde auch im dritten Larvenstadium Zellkörper des ZNS spezifisch gefärbt. Diese Ergebnisse zeigen zusammenfassend, daß das Hauptexpressionsgebiet des DmDop1-Gens im Nervensystem liegt. Zusätzlich scheint das Rezeptorgen für die Entwicklung oder Reifung von Keimbahnzellen wichtig zu sein.

4.5 Ein Modell für die Regulation des DmDop1-Rezeptorgens

Die Neurotransmitter Dopamin und Serotonin spielen eine wichtige Rolle für Lern- und Gedächtnisprozesse sowohl bei Vertebraten als auch bei Invertebraten (Davis, 1996; Bailey et al., 1994; Byrne et al., 1993; Restifo & White, 1990). Ddc-Mutanten haben Gen-Defekte, wodurch die Bildung des Enzyms Dopa-Decarboxylase gestört ist (1.3). Die betroffenen Tiere sterben meist schon im Embryonal- und frühen Larvalstadium aufgrund eines erhöhten Verzweigungsmusters der Nervenzellen. Außerdem schneiden Ddc-Mutanten in assoziativen Lerntests deutlich schlechter ab, als Wildtyp-Fliegen (Tempel et al., 1984). Andere *Drosophila*-Mutanten, die Defekte in cAMP-abhängigen Signalwegen aufweisen, zeigen ebenfalls Störungen bei Lern- und Gedächtnisvorgängen. In der olfaktorische Lernmutante *dunce* (*dnc*) (Dudai et al., 1976, Dudai, 1983) ist ein Gen defekt, das für die cAMP-spezifische Phosphodiesterase (PDE) kodiert (Livingstone et al., 1984, Nighorn et al., 1994; Davis, 1996). Tiere, die die *dnc*-Mutation tragen, haben deutlich erhöhte cAMP-Spiegel. Fliegen, in denen die Proteinkinase A mutiert ist (DCO-Mutanten), zeigen ebenfalls eine Beeinträchtigung in der olfaktorischen Konditionierung (Drain et al., 1991; Skoulakis et al., 1993; Davis, 1996). Neben *dnc* ist *rutabaga* (*rut*) eine der bekanntesten Lern- und Gedächtnismutante von *Drosophila* (Livingstone et al., 1984; Levin et al., 1992; Davis, 1996). In *rutabaga*-Fliegen wird eine Ca^{2+} /CaM-abhängige Adenylatzyklase nicht mehr exprimiert. Die Tiere haben dadurch deutlich erniedrigte zelluläre cAMP Konzentrationen. Sowohl das *dnc*-, als auch das *rut*-Gen wird hauptsächlich in den Pilzkörpern von *Drosophila* exprimiert. Die Pilzkörper sind ein wichtiger Teil des Gehirns, in dem u.a. die olfaktorische

Wahrnehmung verarbeitet wird. Da sowohl *dnc*- als auch *rut*-Fliegen deutliche Schwächen in der olfaktorischen Lernleistung zeigen, wurde postuliert, daß das cAMP eine wichtige Funktion bei der Lern- und Gedächtnisleistung haben muß. Interessanterweise schneiden Tiere, denen beide Enzyme (PDE und AC) fehlen, in olfaktorischen Lerntests besser ab als die jeweiligen Einzelmantanten, sie erreichen aber nicht die Lernleistung von Wildtyp-Fliegen. Hieraus muß man schließen, daß die Änderung der cAMP-Konzentration zeitlich genau kontrolliert sein muß, damit das volle Lernvermögen erreicht werden kann.

Nicht nur die Lernleistung, sondern auch das Speichern des Erlernten kann von cAMP-regulierten Prozessen gesteuert werden. Es ist bekannt, daß für die Ausbildung des Langzeit-Gedächtnisses (LTM) Protein-Neusynthese stattfindet (Himmler et al., 1989; Yin und Tully, 1996). Die Regulation dieser Gene wird oft durch den cAMP-abhängigen Transkriptionsfaktor CREB reguliert (Yin et al., 1994; 1995; Davis, 1996) (Abb. 21). Auch in *Drosophila* ist inzwischen ein Gen isoliert worden, das einen CREB-homologen Transkriptionsfaktor kodiert. Es wurde gefunden, daß dieses dCREB2-Gen (cAMP-response element binding protein 2) ebenfalls für Lern- und Gedächtnisbildung von *Drosophila* wichtig ist (Davis, 1996). (Abb. 21).

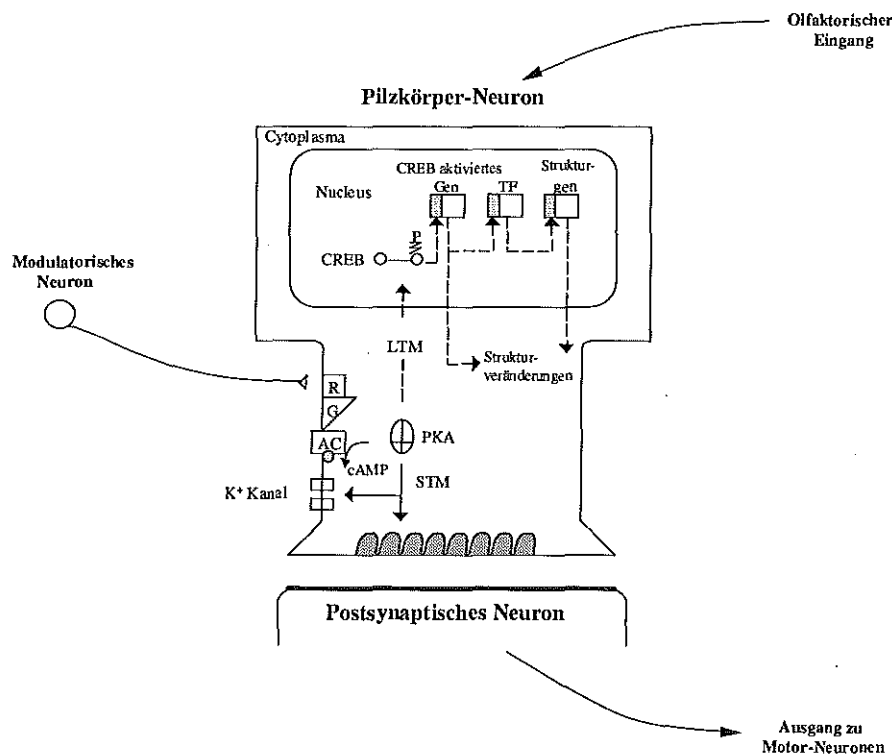


Abb. 21: Biochemie des Lernens (nach Davis, 1996). Die Darstellung ist im Text erläutert. CREB = cAMP-responsive element binding protein; PKA = cAMP-abhängige Proteinkinase A; AC = Adenylatzyklase; LTM = Langzeit-Gedächtnis; STM = Kurzzeit-Gedächtnis; R = Neurotransmitter-Rezeptor; G = G-Protein; TF = Transkriptionsfaktor.

In Abb. 21 ist der Regulationsmechanismus dargestellt, der dem Kurzzeit- (STM) und Langzeit-Gedächtnis (LTM) zugrunde liegt. Die Aktivierung des Adenylatzyklaseweges und der damit verbundene cAMP-Anstieg in der Zelle führt beim LTM zur Aktivierung des Transkriptionsfaktors CREB durch PKA. Phosphoryliertes CREB bindet an Promotoren spezifischer Gene und aktiviert die Transkription dieser Gene. Die Genprodukte können entweder das Neuron strukturell verändern oder die Expression weiterer Transkriptionsfaktoren bewirken. Die neusynthetisierten Transkriptionsfaktoren aktivieren die Expression zusätzlicher Strukturgene. Schließlich wird die synaptische Verbindung zwischen prä- und postsynaptischer Nervenzelle so verändert, daß die Signalübertragung zwischen den Zellen effizienter erfolgt. Beim Kurzzeitgedächtnis wird die Physiologie des Neurons nur kurzfristig und reversibel verändert, indem bspw. Ionenkanäle und andere Substrate durch PKA phosphoryliert werden. Durch die Phosphorylierung werden die Eigenschaften der Zielproteine geändert und die Signalübertragung zwischen zwei Nervenzellen wird transient verbessert.

Auch Dopamin D1-Rezeptoren aktivieren die Adenylatzyklase. Es wäre daher denkbar, daß auch sie eine cAMP-abhängige Regulation der Genexpression induzieren können. Der Promotor des menschlichen Dopamin D_{1A}-Rezeptors besitzt eine CRE-Bindestelle. Es wurde gezeigt, daß die Aktivierung des Rezeptors tatsächlich zu einer Herabregulierung der D_{1A}-Rezeptor-Genexpression führte (Minowa et al., 1996). Ob dieser Mechanismus direkt durch CREB reguliert wird oder ob ein indirekter Mechanismus vorliegt, wurde bisher noch nicht eindeutig festgestellt.

Auch der Promotor des DmDop1-Rezeptorgens verfügt über potentielle Bindestellen für Transkriptionsfaktoren der CREB-Familie. Es wäre deshalb sehr interessant zu untersuchen, ob das Rezeptorgen *in vivo* tatsächlich in einer cAMP-vermittelten positiven Rückkopplungsschleife die eigene Genexpression steuert. Diese Möglichkeit könnte physiologisch äußerst bedeutsam und wirkungsvoll sein. Wie bereits o.a. sterben Tiere, die keine oder defekte Dopa Decarboxylase-Enzyme synthetisieren, bereits in frühen Entwicklungsstadien. Der Tod wird wahrscheinlich durch eine erhöhte Anlage von Nervenzellen verursacht. Die mutanten Tiere können jedoch durch eine Zugabe von Dopamin zum Futtermedium gerettet werden und entwickeln sich dann bis zum Adultstadium normal. Die Rettung der Tiere gelingt jedoch nur mit Dopamin und nicht mit Serotonin, dem zweiten Neurotransmitter, an dessen Biosynthese das Dopa Decarboxylase-Enzym ebenfalls beteiligt ist. Wie könnte das Dopamin im Zusammenwirken mit dem DmDOP1-Rezeptor das Überleben der Tiere ermöglichen? Es ist möglich, daß das dopaminerge System an der Einleitung des selektiven neuronalen Zelltods (Apoptose) durch einen cAMP-abhängigen Prozeß beteiligt ist (Lankford, et al., 1988). Der aktivierte Dopamin-Rezeptor stimuliert eine AC und bewirkt so eine Erhöhung des intrazellulären cAMP Spiegels. In der ersten Reaktion könnte CREB phosphoryliert werden, an den Promotor des DmDop1-Gens binden und so die

Neusynthese von Rezeptorprotein auslösen. Der vermehrte Einbau des Rezeptorproteins in der Zellmembran würde bei anhaltender Stimulierung durch Dopamin zu einer weiteren deutlich gesteigerten Erhöhung der intrazellulären cAMP-Konzentration führen. Schließlich würde der apoptotische Zelluntergang eingeleitet. Obwohl dieser Signalweg für den DmDOP1-Rezeptor experimentell geprüft werden muß, stützen die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit diese Hypothese. 1) Das Rezeptorgen wird während der gesamten Entwicklung von Embryo bis zum adulten Tier gebildet. Zunächst im dritten Larven- und im Adultstadium ist die Expression auf Nervenzellen und Gonaden beschränkt. 2) Der Promotorbereich des DmDop1-Gens verfügt über einen Abschnitt, der die Reportergentranskription selektiv unterbindet (+125/+495). In diesem Bereich befindet sich ein CRE-Element. Es ist bekannt, daß die Wirkung von Repressoren durch einen Aktivator wieder aufgehoben werden kann (Latchman, 1997). Daher wäre es denkbar, daß dieser Sequenzabschnitt normalerweise mit einem Repressormolekül besetzt ist, das erst durch aktiviertes CREB verdrängt werden muß, bevor die Transkription des Gens erfolgen kann. Die Aktivierung von CREB könnte *in vivo* bspw. durch den bereits o.a. Autoregulationsweg des Rezeptorgens erfolgen und dadurch die entwicklungsspezifische Funktion des Rezeptors regulieren.

5. Zusammenfassung

In dieser Arbeit wurde erstmals die Promotorregion eines biogenen Amin-Rezeptorgens aus Evertrebraten kloniert und charakterisiert. Die Analyse der 5'-RACE-Klone zeigte, daß das erste Exon des DmDop1-Rezeptorgens im Vergleich zur bisher bekannten Sequenz um 125 Bp in 5'-Richtung länger ist. Durch eine Primer-Extension Analyse wurden zwei potentielle Transkriptionsstartpunkte identifiziert. Ein Transkriptionsstart liegt im Bereich der längsten 5' RACE-Klone, ein zweiter ist um 22 Basen in 3'-Richtung verschoben. Beide Startpunkte liegen innerhalb eines INR-(Initiator-) Elements, das für ca. 50 % aller *Drosophila*-Promotoren typisch ist. Innerhalb des sequenzierten ca. 2 kb großen Promotorbereichs sind weder TATA- noch CAAT-Boxen vorhanden. Der Promotor enthält mehrere GC-reiche Sequenzen, sowie potentielle Bindestellen für die Transkriptionsfaktoren CREB, Zeste, su(Hw) und DEP2.

Die regulatorischen Elemente des Promotors wurden durch CAT-Reportergergenanalysen eingegrenzt. Alle Promotorkonstrukte wurden transient in die neuronalen Zelllinien SK.N.SH und Neuro.2a sowie in die Nierenzelllinie HEK293 transfiziert. Die höchsten CAT-Aktivitäten wurden in den neuronalen Zellen gemessen. In der SK.N.SH Neuroblastom-Zelllinie wurde eine stark aktivierende Region im Bereich von (-454/+125) sowie zwei Silencer-Regionen im Bereich von (-1481/-454) und (+125/+495) identifiziert. Eine Bindung von SK.N.SH-Kernproteinen an diese Sequenzen wurde mit Gelshift-Analysen nachgewiesen.

Der DmDop1-Promotor wird zelltypspezifisch exprimiert. Dies wurde mit *in situ*-Hybridisierungen an Gewebeschnitten gezeigt. Transkripte wurden im ZNS, der Retina und in den Antennen gefunden. In Larven und in adulten Tieren wurden Transkripte auch in den Gonaden nachgewiesen.

In einem der Silencer-Elemente wurde eine CRE-Bindestelle identifiziert. Dieser Bereich könnte einen Einfluß auf die gewebsspezifische Regulation des Rezeptorgens haben. Die Aktivierung der Dopamin D1-Rezeptoren führt zu einer Stimulierung der Adenylatzyklase. Dadurch wird die intrazelluläre cAMP-Konzentration erhöht. Transkriptionsfaktoren der CREB/ATF1 Familie, die an die CRE-Bindestelle binden können, werden cAMP-abhängig reguliert. Eine Autoregulation der Rezeptorgenexpression durch diese cAMP-abhängigen Transkriptionfaktoren und ein damit verbundener selektiver Untergang von Nervenzellen (Apoptose), ist eine Möglichkeit, wie die Differenzierung des ZNS von *Drosophila melanogaster* reguliert werden könnte.

6. Literaturverzeichnis

- Arkhipova, I.R. (1995): Promoter elements in *Drosophila melanogaster* revealed by sequence analysis. *Genetics* **139**, 1359-1369.
- Arnt, J. (1987): Behavioral studies of dopamine receptors: evidence for regional selectivity and receptor multiplicity. *Dopamine Receptors, Receptor Biochemistry and Methodology* **8**, 199.
- Ayer, S., Benyajati, C. (1992): The binding site of a steroid hormone receptor-like protein within the *Drosophila* Adh adult enhancer is required for high levels of tissue-specific alcohol dehydrogenase expression. *Mol. Cell. Biol.* **12**, 661-673.
- Bailey, C.H., Alberini, C., Ghirardi, M., Kandel, E.R. (1994): Molecular and structural changes underlying long-term memory storage in *Aplysia*. *Adv. Second Messenger Phosphoprotein Res.* **29**, 529-544.
- Baldwin, J.M. (1993): The probable arrangement of the helices in G protein-coupled receptors. *EMBO J.* **12**, 1693-1703.
- Baldwin, J.M. (1994): Structure and function of receptors coupled to G proteins. *Curr. Opin. Cell. Biol.* **6**, 180-190.
- Baldwin, J.M., Schertler, G.F., Unger, V.M. (1997): An alpha-carbon template for the transmembrane helices in the rhodopsin family of G-protein-coupled receptors. *J. Mol. Biol.* **272**, 144-164.
- Beischlag, T.V., Marchese, A., Meador-Woodruff, J.H., Damask, S.P., O'Dowd, B.F., Tyndale, R.F., Van Tol, H.H.M., Seeman, P., Niznik H. B. (1995): The human dopamine D5 receptor gene: cloning and characterization of the 5'-flanking and promoter region. *Biochemistry* **34**, 5960-5970.
- Benovic, J.L., De Blasi, A., Stone, W.C., Caron, M.G., Lefkowitz, R.J. (1989): β -adrenergic receptor kinase: primary structure delineates a multigene family. *Science* **246**, 235-240.
- Benovic, J.L., Onorato, J.J., Arriza, J.L., Stone, W.C., Lohse, M., Jenkins, N.A., Gilbert, D.J., Copeland, N.G., Caron, M.G., Lefkowitz, R.J. (1991): Cloning, expression, and chromosomal localization of β -adrenergic receptor kinase 2. *J. Biol. Chem.* **266**, 14939-14946.
- Benson, M., Pirrotta, V. (1987): The product of the *Drosophila* zeste gene binds to specific DNA sequences in white and Ubx. *EMBO J.* **6**, 1387-1392.
- Benton, W.D., Davis, R.W. (1977): Screening of λ gt recombinant clones by hybridization to single plaques *in situ*. *Science* **196**, 180-182.
- Biggin, M., D., Bickel, S., Benson, M., Pirrotta, V., Tijan, R. (1988): Zeste encodes a sequence-specific transcription factor that activates the Ultrabithorax promoter *in vitro*. *Cell* **53**: 713-722.

- Birnbaumer, L., Abramowitz, J., Brown, A.M. (1990): Receptor effector coupling by G-proteins. *Biochem. Biophys. Acta* **1031**, 63-224.
- Birnboim, H.C., Doly, J. (1979): A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucl. Acids Res.* **7**, 1513-1523.
- Blattner, F.R., Williams, B.G., Blechel, A.E., Denniston-Thompson, K., Faber, H.E., Furlong, L.-A., Grunwald, D.J., Kiefer, D.O., Moore, D.D., Schumm, J.W., Sheldon, E.L., Smithies, O. (1977): Charon phages: safer derivatives of bacteriophage lambda for DNA cloning. *Science* **196**, 161-169.
- Borrelli, E., Heyman, R., Arias, C., Sawchenko, P., Evans, R.M. (1989): Transgenic mice with inducible dwarfism. *Nature* **339**, 538-541.
- Borrelli, E., Montmayeur, J.P., Foulkes, N.S., Sassone-Corsi, P. (1992): Signal transduction and gene control: the cAMP pathway. *Crit. Rev. Oncog.* **3**, 321-338.
- Bourtchuladze, R., Frenguelli, B., Blendy, J., Cioffi, D., Schutz, G., Silva, A.J. (1994): Deficient long-term memory in mice with a targeted mutation of the cAMP-responsive element-binding protein. *Cell* **79**, 59-68.
- Budnik, V., Wu, C.-F., White, K. (1989): Altered branching of serotonin-containing neurons in *Drosophila* mutants unable to synthesize serotonin and dopamine. *J. Neuroscience* **9**, 2866-2877.
- Bullock, W.O., Fernandez, J.M., Short, J.M. (1987): XL1-Blue: A high efficiency plasmid transforming *recA* *Escherichia coli* strain with beta-galactosidase selection. *BioTechniques* **5**, 376-378.
- Byrne, J.H., Zwartjes, R., Homayouni, R., Critz, S.D., Eskin, A. (1993): Roles of second messenger pathways in neuronal plasticity and in learning and memory. Insights gained from *Aplysia*. *Adv. Second Messenger phosphoprotein Res.* **27**, 47-108.
- Campbell, R.B., Sinclair, D.A., Couling, M., Brock, H.W. (1995): Genetic interaction and dosage effects of Polycomb group genes of *Drosophila*. *Mol. Gen. Genet.* **246**, 291-300.
- Carlsson, A. (1988): The current status of the dopamine hypothesis of schizophrenia. *Neuropsychopharmacology* **1**, 179.
- Carnici, P., Kvam C., Kitamura, A., Ohsumi, T., Okazaki, Y., Itoh, M., Kamiya, M., Shibata, K., Sasaki, N., Izawa, M., Muramatsu, M., Hayashizaki, Y., Schneider, C. (1996): High-efficiency full-length cDNA cloning by biotinylated CAP trapper. *Genomics* **37**, 327-336.
- Catterall, A.W. (1991): Structure and function of voltage-gated sodium and calcium channels. *Curr. Opin. Neurobiol.* **1**, 5-13.
- Chen, C., Okayama, H. (1987): High-efficiency transformation of mammalian cells by plasmid DNA. *Mol. Cell. Biol.* **7**, 2745-2752.
- Cherbas, L., Cherbas, P. (1993): The arthropod initiator: the capsite consensus plays an important role in transcription. *Insect Biochem. Mol. Biol.* **23**, 81-90.

- Civelli, O., Bunzow, J.R., Grandy, D.K. (1993): Molecular diversity of the dopamine receptors. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **33**, 281-307.
- Cullen, B.R. (1987): Use of eukaryotic expression technology in the functional analysis of cloned genes. *Meth. Enzymol.* **152**, 684-704.
- Davis, R.L. (1996): Physiology and biochemistry of *Drosophila* learning mutants. *Physiol. Rev.* **76**, 299-317.
- Delmas, V., van der Hoorn, F., Mellström, B., Jégou, B., Sassone-Corsi, P. (1993): Induction of CREM activator proteins in spermatids: downstream targets and implications for haploid germ cell differentiation. *Mol. Endocrinol.* **7**, 1502-1514.
- Demchyshyn, L.L., Sugamori, K.S., Lee, F.J.S., Hamadanizadeh, S.A., Niznik, H.B. (1995): The dopamine D1D receptor: cloning and characteristics of three pharmacologically distinct D-1-like receptors from *Gallus domesticus*. *J. Biol. Chem.* **270**, 4005-4012.
- Di Chiara, G. (1995): The role of dopamine in drug abuse viewed from the perspective of its role in motivation. *Drug Alcohol Depend.* **38**, 95-137.
- Dignam, J.D., Lebovitz, R.M., Roeder, R.G. (1983): Accurate transcription initiation by RNA polymerase II in a soluble extract from isolated mammalian nuclei. *Nucleic. Acids Res.* **11**, 1475.
- Dixon, R.A.F., Sigal, I.S., Rands, E., Register, R.B., Candelore, M.R., Blake, A.D., Strader, C.D. (1987): Ligand binding to the β -adrenergic receptor involves its rhodopsin-like core. *Nature* **326**, 73-77.
- Dohlman, H.G., Caron, M.G., Lefkowitz, R.J. (1987): A family of receptors coupled to guanine nucleotide regulatory proteins. *Biochemistry* **26**, 2657-2664.
- Dohlman, H.G., Thorner, J., Caron, M.G., Lefkowitz, R.J. (1991): Model systems for the study of seven-transmembrane-segment receptors. *Annu. Rev. Biochem.* **60**, 653-688.
- Donnelly, D., Findlay, J.B.C., Blundell, T.L. (1994): The evolution and structure of aminergic G Protein-coupled receptors. *Receptors and Channels* **2**, 61-78.
- Dorsett, D. (1993): Distance-independent inactivation of an enhancer by the suppressor of Hairy-wing DNA-binding protein of *Drosophila*. *Genetics* **134**, 1135-1144.
- Drain, P., Folkers, E., Quinn, W.G. (1991): cAMP-dependent protein kinase and the disruption of learning in transgenic flies. *Neuron* **6**, 71-82.
- Dudai, Y., Jan, Y.-N., Byers, D., Quinn, W., Benzer, S. (1976): *dunce*, a mutant of *Drosophila* deficient in learning. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **73**, 1684-1688.
- Dudai, Y. (1983): Mutations affect storage and use of memory differentially in *Drosophila*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **80**, 5445-5448.
- Dynan, W. (1986): Transcription factor SP1 recognizes a DNA sequence in the mouse dihydrofolate reductase promoter. *Nature* **319**, 246-248.

- Exton, J.H. (1994): Phosphoinositide phospholipases and G proteins in hormone action. *Annu. Rev. Physiol.* **56**, 349-369.
- Feinberg, A.P., Vogelstein, B. (1983): A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. *Anal. Biochem.* **132**, 6-13.
- Findley, J., Eliopoulos, E. (1990): Three-dimensional modelling of G protein-linked receptors. *Trends Pharmacol. Sci.* **11**, 429-499.
- Foulkes, N.S., Mellström, B., Benusiglio, E., Sassone-Corsi, P. (1992): Developmental switch of CREM function during spermatogenesis: from antagonist to transcriptional activator. *Nature* **355**, 80-84.
- Fraser, C.M. (1989): Site-directed mutagenesis of β -adrenergic receptors. *J. Biol. Chem.* **264**, 9266-9270.
- Freedman, N.J., Lefkowitz, R.J. (1996): *Recent Prog. Hormone Res.* **51**, 319.
- Frohman, M.A., Dush, M.K., Martin, G.R. (1988): Rapid production of full-length cDNAs from rare transcripts: amplification using a single gene-specific oligonucleotide primer. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **85**, 8998-9002.
- Frohman, M., (1994): On beyond classic RACE (rapid amplification of cDNA ends). *PCR Methods and Applications* **4**, 540-558.
- Galzi, J.-L., Revah, F., Bessis, A., Changeux, J.-P. (1991): Functional architecture of the nicotinic acetylcholine receptor: from electric organ to brain. *Annu. Rev. Pharmacol.* **31**, 37-72.
- Geyer, P.K., Spana, C., Corces, V.G. (1986): On the molecular mechanism of gypsy-induced mutations at the yellow locus of *Drosophila melanogaster*. *EMBO J.* **5**: 2657-2662.
- Gibbons, L.R., Asai, D.J., Ching, N.S., Dolecki, G. J., Mocz, G., Phillipson, C.A., Ren, H., Tang, W.-J. Y., Gibbons, B.H. (1991): A PCR procedure to determine the sequence of large polypeptides by rapid walking through a cDNA library. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**, 8563-8567.
- Gidoni, D., Dynan, W.S., Tijan, R. (1984): Multiple specific contacts between a mammalian transcription factor and its cognate promoters. *Nature* **312**, 409-413.
- Gingrich, J.A., Caron, M.G. (1993): Recent advances in the molecular biology of dopamine receptors. *Annu. Rev. Neurosci.* **16**, 299-321.
- Ginovart, N., Lundin, A., Farde, L., Halldin, C., Backman, L., Swahn, C.G., Pauli, S., Sedvall, G. (1997): PET study of the pre- and post-synaptic dopaminergic markers for the neurodegenerative process in Huntington's disease. *Brain* **120**, 503-514.
- Ginty, D.D., Kornhauser, J.M., Thompson, M., Bading, H., Mayo, K.E., Takahashi, J.S. (1993): Regulation of CREB phosphorylation in the suprachiasmatic nucleus by light and a circadian clock. *Science* **260**, 238-241.

- Goldberg, M.L., Colvin, R.A., Mellin, A.F. (1989): The *Drosophila* zeste locus is nonessential. *Genetics* **123**, 145-155.
- Gonzalez, G.A., Montminy, M.R. (1989): Cyclic AMP stimulates somatostatin gene transcription by phosphorylation of CREB at Ser 133. *Cell* **59**, 675-680.
- Gorman, C.M., Moffat, L.F., Howard, B.H. (1982): Recombinant genomes which express chloramphenicol acetyltransferase in mammalian cells. *Mol. Cell. Biol.* **2**, 1044-1051.
- Gotzes, F., Balfanz, S., Baumann, A. (1994): Primary structure and functional characterization of a *Drosophila* dopamine receptor with high homology to human D1/5 receptors. *Receptors Channels* **2**, 131-141.
- Gotzes, F. Dr. Arbeit (1995): Funktionelle Charakterisierung eines Dopamin-Rezeptors aus *Drosophila melanogaster*. ISSN 0944-2952.
- Großkreutz, et al. (1995): Promega Notes. In Press.
- Gudermann, T., Schoneberg, T., Schultz (1997): Functional and structural complexity of signal transduction via G-protein-coupled receptors. *Annu. Rev. Neurosci.* **20**, 399-427.
- Hai, T.Y., Curran, T. (1991): Cross-family dimerization of transcription factors Fos:Jun and ATF/CREB alters DNA binding specificity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**, 3720-3724.
- Han, A.-K., Millar, N.S., Grotewiel, M.S., Davis, R.L. (1996): DAMB, a novel dopamine receptor expressed specifically in *Drosophila* mushroom bodies. *Neuron* **16**, 1127-1135.
- Harrison, D.A., Gdula, D.A., Coyne, R., Corces, V.G. (1993): A leucine zipper domain of the suppressor of Hairy-wing protein mediates its repressive effect on enhancer function. *Genes & Develop.* **7**, 1966-1978.
- Heery, D.M., Gannon, F., Powell, R. (1990): A simple method for subcloning DNA fragments from gel slices. *Trends Gen.* **6**, 173.
- Hendrickson, W. (1985): *Biotechniques* **3**, 198-207.
- Hennighausen, L., Lubon, H. (1987): Interaction of protein with DNA *in vitro*. *Meth. Enzymol.* **152**, 721-735.
- Hepler, J.R., Gilman, A.G. (1992): G proteins. *Trends. Biochem. Sci.* **17**, 383-387.
- Hille, B. (1992): G Protein-coupled mechanisms and nervous signalling. *Neuron* **9**, 187-195.
- Himmler, A., Drechsel, D., Kirschner, M.W., Martin, D.W.J. (1989): Tau consists of a set of proteins with repeated C-terminal microtubule-binding domains and variable N-terminal domains. *Mol. Cell. Biol.* **9**, 1381-1388.
- Hoeffler, J.P., Meyer, T.E., Yun, Y., Jameson, J.L., Habener, J.F. (1988): Cyclic AMP-responsive DNA-binding protein: structure based on a cloned placental cDNA. *Science* **242**, 1430-1433.

- Hollmann, M., Heinemann, S. (1994): Cloned glutamate receptors. *Annu. Rev. Neurosci.* **17**, 31-108.
- Hornykiewicz, O. (1966): Dopamine (3-hydroxytyramine) and brain function. *Pharmacol. Rev.* **18**, 925-964.
- Hummeler, E., Cole, T.J., Blendy, J., Ganss, R., Aguzzi, A. (1994): Targeted mutation in the cAMP responsive element binding protein (CREB) gene: compensation within the CREB/ATF family of transcription factors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**, 5647-5651.
- Jaber, M., Robinson, S.W., Missale, C., Caron, M.G. (1996): Dopamine receptors and brain function. *Neuropharmacology* **35**, 1503-1519.
- Jack, J., Dorsett, D., Delotto, Y., Liu, S. (1991): Expression of the cut locus in the *Drosophila* wing margin is required for cell type specification and is regulated by a distal enhancer. *Development* **113**, 735-748.
- Jackson, S.P. (1992): *Trends Cell Biol.* 104-108.
- Jégou, B. (1993): The Sertoli-germ cell communication network in mammals. *Int. Rev. Cytol.* **147**, 25-96.
- Johnson, G.L., Dhanasekaran, N. (1989): The G-protein family and their interaction with receptors. *Endoc. Rev.* **10**, 317-331.
- Kamakura, S., Iwaki, A., Matsumoto, M., Fukumaki, Y. (1997): Cloning and characterization of the 5'-flanking region of the human dopamine D4 receptor gene. *Bioch. Biophys. Res. Comm.* **235**, 321-326.
- Kane, J.M., Woerner, M., Lieberman, J. (1988): Tardive dyskinesia: Prevalence, incidence, and risk factors. *J. Clin. Psychopharmacol.* **8**, 52-56.
- Kaupp, U.B., Koch, K.-W. (1992): Role of cGMP and Ca²⁺ in vertebrate photoreceptor excitation and adaptation. *Annu. Rev. Physiol.* **54**, 153-175.
- Kim, K.S., Lee, M.K., Carroll, J., Joh, T.H. (1993): Both the basal and inducible transcription of the tyrosine hydroxylase gene are dependent upon a cAMP responsive element. *J. Biol. Chem.* **268**, 15689-15695.
- Kim, Y.-T., Wu, C.-F. (1996): Reduced growth cone motility in cultured neurons from *Drosophila* memory mutants with a defective cAMP cascade. *J. Neurosci.* **16**, 5593-5602.
- Koob, G.F., Bloom, F.E. (1988): Cellular and molecular mechanisms of drug dependence. *Science* **242**, 715-723.
- Koob, G.F. (1992a): Dopamine addition and reward. *Semin. Neurosci.* **4**, 139-148.
- Koob, G.F. (1992b): Drugs of abuse: Anatomy, pharmacology and function of reward pathways. *Trends Pharmacol. Sci.* **13**, 177-184.

- Kornfeld, R., Kornfeld, S. (1985): Assembly of asparagine-linked oligosaccharides. *Annu. Rev. Biochem.* **54**, 631-664.
- Kurose, H., Regan, J.W., Caron, M.G., Lefkowitz, R.L. (1991): Functional interactions of recombinant $\alpha 2$ adrenergic receptor subtypes and G proteins in reconstituted phospholipid vesicles. *Biochemistry* **30**, 3335-3341.
- Laemmli, U.K. (1970): Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 105-132.
- Laitinen, J.T. (1993): Dopamine stimulates K^+ efflux in the chick retina via D1 receptors independently of adenylyl cyclase activation. *J. Neurochem.* **61**, 1461-1469.
- Lalli, E., Sassone-Corsi, P. (1994): Signal transduction and gene regulation: the nuclear response to cAMP. *J. Biol. Chem.* **269**, 17359-17362.
- Lankford, K.L., DeMello, F.G., Klein, W.L. (1988): D1-type dopamine receptors inhibit growth cone motility in cultured retina neurons: Evidence that neurotransmitters act as morphogenic growth regulators in the developing central nervous system. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **85**, 2839-2843.
- Laoide, B.M., Foulkes, N.S., Schlotter, F., Sassone-Corsi, P. (1993): The functional versatility of CREM is determined by its modular structure. *EMBO J.* **12**, 1179-1191.
- Latchman, D.S. (1997): Transcription factors: An overview. *Int. J. Biochem. Cell. Biol.* **29**, 1305-1312.
- Lazaroff, M., Patankar, S., Yoon, S.O., Chikaraishi, D.M. (1995): The cyclic AMP response element directs tyrosine hydroxylase expression in catecholaminergic central and peripheral nervous system cell lines from transgenic mice. *J. Biol. Chem.* **270**, 21579-21589.
- Lee, S.-H., Minowa, M.T., Mouradian, M.M. (1996): Two distinct promoters drive transcription of the human D_{1A} dopamine receptor gene. *J. Biol. Chem.* **271**, 25292-25299.
- Le Moal, M., Simon, H. (1991): Mesocorticolimbic dopaminergic network: Functional and regulatory roles. *Physiol. Rev.* **71**, 155-234.
- Levin, L.R., Han, P.L., Hwang, P.M., Feinstein, P.G., Davis, R.L., Reed, R.R. (1992): The *Drosophila* learning and memory gene *rutabaga* encodes a Ca^{2+} /calmodulin-responsive adenylyl cyclase. *Cell* **68**, 479-489.
- Livingstone, M.S., Sziber, P.P., Quinn, W.G. (1984): Loss of calcium/calmodulin responsiveness in adenylate cyclase of *rutabaga*, a *Drosophila* learning mutant. *Cell* **37**, 205-215.
- Lorenz, W., Inglese, J., Palczewski, K., Onorato, J.J., Caron, M.G., Lefkowitz, R.J. (1991): The receptor kinase family: primary structure of rhodopsin kinase reveals similarities to the β -adrenergic receptor kinase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**, 8715-8719.

- Luttrell, L.M., Ferguson, S.S.G., Daaka, Y., Miller, W.E., Maudsley, S., Della Rocca, G.J., Lin, F.-T., Kawakatsu, H., Owada, K., Luttrell, D.K., Caron, M.G., Lefkowitz, R.J. (1999): β -arrestin-dependent formation of β_2 adrenergic receptor-src protein kinase complexes. *Science* **283**, 655-661.
- Mahan, L.C., Burch, R.M., Monsma, F.J., Sibley, D.R. (1990): Expression of striatal D1 dopamine receptors coupled to inositol phosphate production and Ca^{2+} mobilization in *Xenopus* oocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87**, 2196-2200.
- Maniatis, T., Kee, S.G., Efstratiadis, A., Kafatos, F.C. (1976): Amplification and characterization of a beta-globin gene synthesized in vitro. *Cell* **8**, 163-182.
- Maniatis, T., Hardison, R.C., Lacy, E., Lauer, J., O'Connell, C., Quon, D., Sim, G.K., Efstratiadis, A. (1978): The isolation of structural genes from libraries of eukaryotic DNA. *Cell* **15**, 687-701.
- Manley, I.L., Fire, A., Cano, A., Sharp, P.A., Gefter, M.L. (1980): DNA-dependent transcription of adenovirus genes in a soluble whole-cell extract. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **77**, 3855-3859.
- Manoil, C., Beckwith, J. (1986): A genetic approach to analyzing membrane protein topology. *Science* **233**, 1403-1408.
- Mansukhani, A., Crickmore, A., Sherwood, P.W., Goldberg, M.L. (1988): DNA-binding properties of the *Drosophila melanogaster* zeste gene product. *Mol. Cell. Biol.* **8**, 615-623.
- Maroni, G. (1994): The organization of *Drosophila* genes. *DNA Sequence* **4**, 347-354.
- Mason, J.O., Williams, G.T., Neuberger, M.S. (1985): Transcription cell type specificity is conferred by an immunoglobulin VH gene promoter that includes a functional consensus sequence. *Cell* **41**, 479-487.
- Mazo, A.M., Mizrokhi, L.J., Karavanov, A., Sedkov, Y.A., Krichevskaja, A.A. (1989): Suppression in *Drosophila*: su(Hw) and su(f) gene products interact with a region of gypsy (mdg4) regulating its transcriptional activity. *EMBO J.* **15**, 569-580.
- Meinkoth, J., Wahl, G. (1984): Hybridization of nucleic acids immobilized on solid supports. *Anal. Biochem.* **138**, 267-284.
- Melton, D.A., Krieg, P.A., Rebagliati, M.R., Maniatis, T., Zinn, K., Green, M.R. (1984): Efficient *in vitro* synthesis of biologically active RNA and DNA hybridization probes from plasmids containing a bacteriophage SP6 promoter. *Nucl. Acids Res.* **13**, 7035-7056.
- Milligan, G. (1993): Mechanisms of multifunctional signalling by G protein-linked receptors. *Trends Pharmacol. Sci.* **14**, 239-244.
- Minowa, T., Minowa, M.T., Mouradian, M.M. (1992): Analysis of the promoter region of the rat D₂ dopamine receptor gene. *Biochemistry* **31**, 8389-8396.
- Minowa, M.T., Minowa, T., Mouradian, M.M. (1993): Activator region analysis of the human D_{1A} dopamine receptor gene. *J. Biol. Chem.* **268**, 23544-23551.

- Minowa, M.T., Lee, S.H., Mouradian, M.M. (1996): Autoregulation of the Human D_{1A} dopamine receptor gene by cAMP. *DNA Cell. Biol.* **15**, 759-767.
- Mitchell, P.J., Tjian, R. (1989): Transcriptional regulation in mammalian cells by sequence specific DNA binding proteins. *Science* **245**, 371-378.
- Modolell, J., Bender, W., Meselson, M. (1983): *D. melanogaster* mutations suppressible by the suppressor of Hairy-wing are insertions of a 7.3 kb mobile element. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **80**: 1678-1682.
- Molina, C.A., Foulkes, N.S., Lalli, E., Sassone-Corsi, P. (1993): Inducibility and negative autoregulation of CREM: an alternative promoter directs the expression of ICER, an early response repressor. *Cell* **75**, 875-886.
- Monsma, F.J., Jr., Mc Vittie, L.D., Gerfen, C.R., Mahan, L.C., Sibley, D.R. (1989): Multiple D2 dopamine receptors produced by alternative RNA splicing. *Nature* **342**, 926-929.
- Mumby, S.M. (1997): Reversible palmitoylation of signaling proteins. *Curr. Opin. Cell. Biol.* **9**, 148-154.
- Neer, E.J. (1994): G proteins: critical control points for transmembrane signals. *Protein Sci.* **3**, 3-14.
- Nighorn, A., Qiu, Y., Davis, R.L. (1994): Progress in understanding the *Drosophila dnc* locus. *Comp. Biochem. Physiol.* **108**, 1-9.
- O'Dowd, B.F., Hnatowich, M., Caron, M.G., Lefkowitz, R.J., Bouvier, M. (1989): Palmitoylation of the human β_2 -adrenergic receptor. *J. Biol. Chem.* **264**, 7564-7569.
- O'Dowd, B.F. (1992): Repeat sequences in the gene encoding the human D4 dopamine receptor. *Gene* **118**, 301-302.
- O'Dowd, B.F. (1993): Structures of dopamine receptors. *J. Neurochem.* **60**, 804-816.
- Ogbourne, S., Antalis, T.M. (1998): Transcriptional control and the role of silencers in transcriptional regulation in eukaryotes. *Biochem. J.* **331**, 1-14.
- Okuma, Y., Reisine, T. (1992): Immunoprecipitation of α_{2a} -adrenergic receptor-GTP-binding complexes using GTP-binding protein selective antisera. *J. Biol. Chem.* **267**, 14826-14831.
- Papac, D.I., Thornburg, K.R., Bullesbach, E.E., Crouch, R.K., Knapp, D.R. (1992): Palmitoylation of G-protein-coupled receptor. Direct analysis by tandem mass spectrometry. *J. Biol. Chem.* **267**, 16889-16894.
- Pardue, M.L. (1985): *In situ* hybridization. In nucleic acid hybridization a practical approach. (Eds.: Hames B.D. & Higgins, S.J.) IRL Press Oxford.
- Parkhurst, S.M., Harrison, D.A., Remington, M.P., Spana, C., Kelley, R.L. (1988): The *Drosophila su(Hw)* gene, which controls the phenotypic effect of the gypsy transposable element, encodes a putative DNA binding protein. *Genes & Dev.* **2**, 1205-1215.

- Peifer, M., Bender, W. (1986): The anterobithorax and bithorax mutations of the bithorax complex. *EMBO J.* **9**, 2293-2303.
- Peterson, B.S. (1996): Considerations of natural history and pathophysiology in the psychopharmacology of Tourette's syndrome. *J. Clin. Psychiatry* **57**, 24-34.
- Piomelli, D., Pilon, C., Giros, B., Sokoloff, P., Martes, M.-P., Schwartz, J.-C. (1991): Dopamine activation of the arachidonic acid cascade as a basis for D1/D2 receptor synergism. *Nature* **353**, 164-167.
- Pirrotta, V., Manet, E., Hardon, E., Bickel, S.E., Benson, M. (1987): Structure and sequence of the *Drosophila* zeste gene. *EMBO J.* **6**, 791-799.
- Price, D.T., Chari, R.S., Berkowitz, D.E., Meyers, W.C., Schwinn, D.A. (1994): Expression of α 1-adrenergic receptor subtype mRNA in rat tissues and human SK-N-MC neuronal cells implications for α 1-adrenergic receptor subtype classification. *Mol. Pharmacol.* **46**, 221-226.
- Probst, W.C., Snyder, L.A., Schuster, D.I., Brosius, J., Sealfon, S.C. (1992): Sequence alignment of the G-protein coupled receptor superfamily. *DNA Cell. Biol.* **11**, 1-20.
- Pugh, E.N. Jr., Lamb, T.D. (1993): Amplification and kinetics of the activation steps in phototransduction. *Biochem. Biophys. Acta* **1141**, 111-149.
- Rands, E., Candelore, M.R., Cheung, A.H., Hill, W.S., Strader, C.D., Dixon, R.A.F. (1990): Mutational analysis of β -adrenergic receptor glycosylation. *J. Biol. Chem.* **265**, 10759-10764.
- Razik, M.A., Lee, K., Price, R.R., Williams, M.R., Ongjoco, R.R., Dole, M.K., Rudner, X.L., Kwatra, M.M., Schwinn, D.A. (1997): Transcriptional regulation of the human α 1a-adrenergic receptor gene. *J. Biol. Chem.* **272**, 28237-28246.
- Rehfuss, R.P., Walton, K.M., Loriaux, M.M., Goodman, R.H. (1991): The cAMP-regulated enhancer-binding protein ATF-1 activates transcription in response to cAMP-dependent protein kinase A. *J. Biol. Chem.* **266**, 18431-18434.
- Restifo, L.L., White, K. (1990): Molecular and genetic approaches to neurotransmitter and neuromodulator systems in *Drosophila*. *Adv. Insect Physiol.* **22**, 115-219.
- Roeder, R.G. (1991): The complexities of eukaryotic transcription initiation: regulation of preinitiation complex assembly. *TIBS* **16**, 402-408.
- Rosenthal, N. (1987): Identification of regulatory elements of cloned genes with functional assays. *Meth. Enzymol.* **152**, 704-720.
- Roy, A. L., Meisterernst, M., Pognonec, P., Roeder, R.G. (1991): Cooperative interaction of an initiator-binding transcription initiation factor and the helix-loop-helix activator USF. *Nature* **354**, 245-248.

- Ruchaud, S., Seite, P., Foulkes, N.S., Sassone-Corsi, P., Lanotte, M. (1997): The transcriptional repressor ICER and cAMP-induced programmed cell death. *Oncogene* **15**, 827-836.
- Rutledge, B.J., Mortin, M.A., Schwarz, E., Thierry-Mieg, D., Meselson, M. (1988): Genetic interactions of modifier genes and modifiable alleles in *Drosophila melanogaster*. *Genetics* **119**, 391-397.
- Sambrook, J., Frisch, E.F., Maniatis, T. (1989): Molecular cloning: A laboratory manual. Second edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Sanger, F., Nickeln, S., Coulson, A.R. (1977): DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **74**, 5463-5467.
- Santos, M.A. (1991): An improved method for the small scale preparation of bacteriophage DNA based on phage precipitation by zinc chloride. *Nucl. Acids Res.* **19**, 5442.
- Sassone-Corsi, P. (1995): Transcription factors responsive to cAMP. *Annu. Rev. Cell. Dev. Biol.* **11**, 355-377.
- Sauer, F., Tjian, R. (1997): Mechanisms of transcriptional activation: differences and similarities between yeast, *Drosophila*, and man. *Curr. Opinion Genet. & Dev.* **7**, 176-181.
- Schneider, J. (1972): Cell lines derived from late embryonic stages of *Drosophila melanogaster*. *J. Embryol. Exp. Morph.* **271**, 363-365.
- Seeman, P., Bzowej, N.H., Guan, H.C., Bergeron, C., Reynolds, G.P., Bird, E.D., Riederer, P., Jellinger, K., Tourtellotte, W.W. (1987): Human brain D1 and D2 dopamine receptors in schizophrenia, Alzheimer's, Parkinson's, and Huntingtons's diseases. *Neuropsychopharmacology* **1**, 5-15.
- Seeman, P. (1987a): Dopamine receptors and the dopamine hypothesis of schizophrenia, *Synapse* **1**, 133.
- Seeman, P. (1987b): Dopamine receptors in human brain diseases. *Dopamine Receptors, Receptor biochemistry and Methodology* **8**, 233.
- Short, J.M., Fernandez, J.M., Sorge, J.A., Huse, W.D. (1988): λ ZAP: a bacteriophage λ expression vector with *in vivo* excision properties. *Nuc. Acids Res.* **16**, 7583-7600.
- Sidhu, A. (1998): Coupling of D1 and D5 dopamine receptors to multiple G proteins. Implications for understanding the diversity in receptor-G protein coupling. *Mol. Neurobiol.* **16**, 125-134.
- Simon, M.I., Strathmann, M.P., Gautam, N. (1991): Diversity of G-proteins in signal transduction. *Science* **252**, 802-808.
- Skoulakis, E.M., Kalderon, D., Davis, R.L. (1993): Preferential expression in mushroom bodies of the catalytic subunit of protein kinase A and its role in learning and memory. *Neuron* **11**, 197-208.

- Smale, S.T., Baltimore, D. (1989): The „initiator“ as a transcriptional control element. *Cell* **57**, 102-113.
- Spana, C., Harrison, D.A., Corces, V.G. (1988): The *Drosophila melanogaster* suppressor of Hairy-wing protein binds to specific sequences of the *gypsy* retrotransposon. *Genes & Dev.* **2**, 1414-1423.
- Sprengel, R., Braun, T., Nikolics, K., Segaloff, D.L., Seeburg, P.H. (1990): The testicular receptor for follicle stimulating hormone. Structure and functional expression of cloned cDNA. *Mol. Endocrinol.* **4**, 525-530.
- Stehle, J.H., Foulkes, N.S., Molina, C.A., Simonneaux, V., Pévet, P., Sassone-Corsi, P. (1993): Adrenergic signals direct rhythmic expression of transcriptional repressor CREM in the pineal gland. *Nature* **365**, 314-320.
- Strader, C.D., Sigal, I.S., Candelore, M.R., Rands, E., Hill, W.S., Dixon, R.A.F. (1988): Conserved aspartic acid residues 79 and 113 of the beta-adrenergic receptor have different roles in receptor function. *J. Biol. Chem.* **263**, 10267-1027.
- Strader, C.D., Candelore, M.R., Hill, W.S., Sigal, I.S., Dixon, R.A.F. (1989): Identification of two serine residues involved in agonist activation of the β -adrenergic receptor. *J. Biol. Chem.* **264**, 16572-16578.
- Strader, C.D., Fong, T.M., Graziano, M.P., Tota, M.R. (1995): The family of G-protein-coupled receptors *FASEB J.* **9**, 745-754.
- Stryer, L. (1986): Cyclic GMP cascade of vision. *Ann. Rev. Neurosci.* **9**, 87-119.
- Stryer, L. (1991): Biochemistry, 6. Auflage. *Spektrum Akad. Verlag*.
- Sugamori, K.S., Demchyshyn, L.L., Chung, M., Niznik, H.B. (1994): D_{1A}, D_{1B} and D_{1C} dopamine receptors from *Xenopus laevis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**, 10536-10540.
- Takahashi, J.S. (1993): Circadian clocks à la CREM. *Nature* **365**, 299-300.
- Tempel, B.L., Livingstone, M.S., Quinn, W.G. (1984): Mutations in the dopa decarboxylase gene affect learning in *Drosophila*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **81**, 3577-3581.
- Tinti, C., Yang, C., Seo, H., Conti, B., Kim, C., Joh, T.H., Kim, K.-S. (1997): Structure/function relationship of the cAMP responsive element in tyrosine hydroxylase gene transcription. *J. Biol. Chem.* **272**, 19158-19164.
- Undie, A.S., Weinstock, J., Sarua, H.M., Friedman, E. (1994): Evidence for a distinct D₁-like dopamine receptor that couples to activation of phosphoinositide metabolism in brain. *J. Neurochem.* **62**, 2045-2048.
- Unger, V.M., Schertler, G.F. (1995): Low resolution structure of bovine rhodopsin determined by electron cryo-microscopy. *Biophys. J.* **68**, 1776-1786.
- Unger, V.M., Hargrave, P.A., Baldwin, J.M., Schertler, G.F. (1997): Arrangement of rhodopsin transmembrane alpha-helices. *Nature* **389**, 203-206.

- Valhmu, W. B., Palmer, G. D., Dobson, J., Fischer, S. G., Ratcliffe, A. (1998): Regulatory activities of the 5'- and 3'- untranslated regions and promoter of the human aggrecan gene. *J. Biol. Chem.* **273**, 6196-6202.
- Vickery, R.G., Zastrow von M. (1999): Distinct dynamin-dependent and -independent mechanisms target structurally homologous dopamine receptors to different endocytic membranes. *J. Cell. Biol.* **144**, 31-43.
- Wang, C.D., Buck, M.A., Fraser, C.M. (1991): Site-directed mutagenesis of $\alpha 2A$ -adrenergic receptors: Identification of amino acids involved in ligand binding and receptor activation by agonists. *Mol. Pharmacol.* **40**, 168-179.
- White, F.J. (1996): Synaptic regulation of mesocorticolimbic dopamine neurons. *Annu. Rev. Neurosci.* **19**, 405-436.
- Yin, J.C.P., Wallach, J.S., Del Vecchio, M., Wilder, E.L., Zhou, H. (1994): Induction of a dominant negative CREB transgene specifically blocks long-term memory in *Drosophila*. *Cell* **79**, 49-58.
- Yin, J.C., Del Vecchio, M., Zhou, H., Tully, T. (1995): CREB as a memory modulator: induced expression of dCREB2 activator isoform enhances long term memory in *Drosophila*. *Cell* **81**, 107-115.
- Yin, J.C., Tully, T. (1996): CREB and the formation of long term memory. *Curr. Opin. Neurobiol.* **6**, 264-268.
- Youssef, H.A., Waddington, J.L. (1987): Morbidity and mortality in tardive dyskinesia: Associations in chronic schizophrenia. *Acta Psychiatr. Scand.* **75**, 74-77.
- Ziff, E.B. (1990): Transcription factors: a new family gathers at the cAMP response site. *Trends Genet.* **6**, 69-72.

A. Anhang

- 2024 GAATTC AAGT GCAATTTAATAGGAGAAAAGATGCCAAGTTGTATTATGTATGCATGTAATTAGAATAATTTACTCAACTG
CTTAAGTTTACAGTTAAATATATCCTCTTTTCTACGGTTCAACATAATACATACGTACATTAATCTTATTAATGAGTTGAC
- 1944 ATTTTGTGCTTTTATTAATATACATTTTAAATCCTCTTGAGTTGGAGCTCCTAGCACAAAGGCTATCTTTGTGCGGAAGTC
TAAAAACGAAAATAATTATATGTAAAAATTAGGAGAACGTCAACCTCGAGGATCGTGTTCGGATAGAAACAGCGCTTGAG
TGCGAAGTTCTG-3' (1731)
- 1864 TGCGAAGTTCTGTGCTTTGGCAGCTATACCGCGCTCTCAGCGGACTGATCACC AATGGCCCCAGGCCCTCAGACAAAAC
ACGCTTGAAGACACGGAACCGTCGATATGGCGGCAGAGTCGCTGACTAGTGGTTACCGGGGTCCGGGAGTCTGTTTG
5'-GCGTCTCTTCGAGGCC-3' (1744)
- 1784 TACACTGTATATGAGGAGGAGGAGGAAGAGGAGCCAGTTCAAAGACGCCGCCACAAACAGCGTCCCTTCGAGGCCGCGTCC
ATGTGACATATACTCCTCCTCCTCTTCTCCTCGGTCAAGTTTCTGCGCGGGTGTGTGTCGAGGAAGCTCCGGCGCAGG
3'-GCAGGAAGCTCCGGCGC-5'
3'-GCAGGAAGCTCCGGCGC-5'
- 1704 ACAACAGGCGCCGTC AAGACCACGCGCCGAATCCGTGCCTCAATTGCCACAAGAACCAGAGTTCCAGACGTCAGCCGGAC
TGTTGTCCGCGGAGTTCTGGTCCCGGCGTTAGGCACGGAGTTAACGGTGTCTTGGTCTCAAGGTCTGCACTCGGCTG
(1910) 3'-GTCTGCAGTCGGCCTG
(1937)
- 1624 CTTCAAGTTCAATCCGTGCAATACGCCGCGCAAGCATCGAAGTTCTATCCCGAGCAATTGGTCAACTGAGCGGAATTTGT
GAAGTCAAGTAGGCAGCTTATGCGGGCGCGTTCCGTAGCTTCAAGATAGGGGTCTGTTAACCAGTTGACTCGCCTTAAACA
G-5' (1970)
- 5'-AAGGTCAATCCAGACACC-3' (1782)
- 1544 GGGCGTGAAAAGGTCAATCCAGACACCCCTTATCCACAACGGAATTGAAGTGGAGCGGGGTCAGCTGCCCTGGATGCCCGC
CCCGCACTTTTCCAGTAGGTCTGTGGGAAATAGGTGTTGCCTTAACTTCACTCGCCCCAGTCGACGGGACCTACCGGCG
- 1464 TCTTTTCGAGCACGTGGCAGGACTATAACTTTTGTGCGGCGGAACGCTGATCTCGGCCAGAACAGTGATCTCGGCTG
AGAAAAGCTCGTGCAACCGTCCCTGATATGAAAAACACGCGCCTTGCAGTACAGCCGGTCTGTCTACTAGAGCCGAC
3'-CGCCTTGCAGTACAGC-5' (1909)
- 1384 CCCACTGCTTCCGCTTTGGCAGTCGGAATTTGCCGGGCGAGCGGACTATGTTTTCGCTGGGGCGTAACCTCTGGATCTT
GGGTGACGAAGGCGAAACCGTCAGCCTTAAACGCGCCGCTCGCCTGATAACAAAGCGACCCCGCATTGAGGAACCTAGAA
- 5'-ATTAATCCACGAACAGT-3' (1903)
- 1304 TTTTTCGTCGGGAGCTACACTAGGTGTAGCGGACTATTAATCCACGAACAGTACAATCCCAATGTATACACCGATCGCGA
AAAAGCAGCCCTCGATGTGATCCACATCGCGCTGATAATTAGGTGCTTGTCTATGTAGGTTACATATGTGGCTACGCCT
- 1224 TTTAGCACTGCTCCAGTTGTCTAATCACGTGAGTAAGTACATTTATTTGATTAATTTATTTTGTCAAATTGATTAACCTT
AAATCGTGACGAGGTCAACAGATTAGTGCAACTCATTCATGTAATAACTAATTAATAAAACAGTTTAACTAATTTGAAA
- 5'-TTGCTCGAAGTGGC
- 1144 TAAATCGTAACACTACACTTAGTATTTGGGATTACATCAAGCCCCTCTGTTTGTGGAACGAGAATTTTGTGCTCGAAGTGGC
ATTTAGCATTTGATGTGAATCATAACCGCTAATGTAGTTCGGGTAGACAAACACCTTGCTCTTGAAAAACGAGCTTGACGG
3'-TAGACAAACACCTTGCT-5' (1908)
- CTC-3' (2356)
- 1064 CTCGGGTACAAAGTCCATATGTGGCTGGTTGGGGTGAGGATGAAAAGGGGAACCGAAACACGCGACTGGCCAAGATGACAG
GAGCCAGTGTTCAGGATACACCGACCAACCCCACTCTACTTTTCCCTTGCTTTGTGCGCTGACCGGTTCTACTGTC
- 5'-AATCTGTCCGAGGAGAA-3' (1904)
- 984 ACACGGACATCATACCCAGTGGGAATGTGCGTGAAATCTGTCCGAGGAGAACGCCAAGTTTATCACCTCGCACACGATC
TGTGCTGTAGTAGTGGGTCAACCTTACAGCACCTTTAGACAGGCTCCTCTTGCAGTTCAAATAGTGGAGCGTGTGCTAG
- 5'-CTGCAGCGGAGATTCGG-3' (2343)
- 904 TGCGCCAGCAATGCCCAGGCATCCGGTCCCTGCAGCGGAGATTCGGGTGGTGGACTGATGCTCCAGGAGCAGGACATCTG
ACGCGGTGCTTACGGGTCCGTAGGCCAGGACGTGCGCTCTAAGGCCACCACCTGACTACGAGGTCTCTGCTCTGTAGAC
3'-GGACGTGCGCTCTAAGG-5' (1783)
- 5'-GCCTGTCACTATACGG-3' (2358)
- 824 GATGCTGCGCGGCGTCTGCTCAGCCGGACAGCGAATGACCAACAGATGCAATCTGACACTGCCCTGTCTATACGGATG
CTACGACGCGCCGACGAGATCGGCTGTGCTTACTGTTGTCTACGTTAGACTGTGACGGACAGTAGATATGCGCTAC
3'-CGGACAGTAGATATGCC-5' (2357)

- 744 TGGCCAAGCACATCGAGTGGCTGCTCAGTAACATGTGGTTTTGAGAGGTATACAAGAGATTAGTTGAATTGAGTGCCAA
ACCGGTTTCGTGTAGCTCACCGACGAGTCATTGTACACCAAACTCTCCAATATGTTCTTAATCAACTTAACACGCTT
3'-TCACCGACGAGTCATTG-5' (1763)
- 5'-GTGACAGTTGCATTACC-3' (1905)
- 664 AATAAAGATAAACAATTTTTTAAAAAGTGACAGTTGCATTACCCCTATCCACACATAACTAAAGAGATGTAAGTCGGG
TTATTTTCTATTTGTTAAAAAATTTTTCACGTGTCAACGTAATGGGGATAGGTGTGTATTGATTTCTACATTACGCCC
- 584 GTTAAAGTTGATTTTAAATAGTATTTATATGGAGCTTTGGAGGTTTTTATCACTAAAGTAAGCAATTACCTAAGTTCACAT
CAATTTCAACTAAAAATATCATAAATATACCTCGAAACCTCCAAAAATAGTGATTTCAATTCGTTAATGGATTCAAGTGTA
3'-TTAATGGATTCAAGTGT-5' (1749)
- 504 TTTAAATGCCATATATTTGATAAATTTCTGAAATACCTCATATAGAAAAATCATATGTACAAAAAACTAACAAAACTTGTGGT
AAATTTACGGATATAAACTATTTAAAGACTTTATGAGTATATCTTTTAGTATACATGTTTTTTGATTGTTTGAACACCA
3
- 5'-AGACAGC
5'-AGACAGC
- 424 CCCCACCTTTATGTAAGGGTATCTCAATTGAAAGATTGCATCGGCCAGCAGATCTGCCAGCGGCGATTTGTCAAAGACAGC
GGGGTGAAATACATTCCCATAGAGTTAACTTTCTAACGTAGCCGGTCGTCTAGACGGTCGCCGCTAAACAGTTTCTGTCTG
3'-GGTGAATACATTCCCA-5' (2344) 3'-GCCGCTAAACAGTTTCT-5' (1745)
- AATTGCATTTC-3' (1936)
AATTGCATTTC-3' (1906)
- 344 AATTGCATTCCATTTCGCATGCAGTTGAGGCATTCACCTAGCCCAATGACATCGCAACGTTGTTCCAGTTTCGTAATGA
TTAACGTAAGGTAAACGTACGTCAACTCCGTAAGTGAGTCGGGTTTACTGTAGCGTTGCAACAAGGGTCAAAGCATTACT
- 5'-ACGCGTCGTTGGAACAA-3' (2359)
5'-AACAGGT
- 264 GAACAAATAGAGGTGGCGGCCAAAGTCGCGTCGGAGTCGCTAGTGAAACGCTGGGAAAACGCGTCGTTGGAACAACAGGT
CTTGTTCATCTCCACCGCCGGTTTCAGCGCAGCCCTCAGCGATCATTTCGCGACCCCTTTGCGCAGCAACCTTGTGTCTCA
- GCTTTCCCTC-3' (1969)
- 184 GCTTTCCCTCATGCTTATTTGCTCCAAGTCTCTCTTGTCTTGCAGCGCATATATTCGCGCTGGTGAGCGACATATC
CGAAAGGGAGTACGAATAAACGAGGTTTCAGAGAGAGAACGAGACGCGTCGCGTATATAAGGCGGACCACTCGCTGTATAG
- 5'-CATTGGTCGTTCTCCGC-3' (2361)
- 104 CTGTTGAATGGACTTCGCGGCTCCGGCGGAACCTCGAAAGTTGTTGCATACCTCTACGGCATTTGGTCGTTCTCCGCGGTACT
GACAACTTACCTGAAGCGCCGAGGCCCTTGAGCTTTCAACAACGTATGAGATGCCGTAACCAGCAAGAGGCGGCATGA
3'-ACCTGAAGCGCCGAGGC-5' (1732) 3'-GTAACCAGCAAGAGGCG-5' (2360)
- 24 GATACCGTTAGTCGTGCGTATCCGGACAGTCGACGTTTCAGCCTTCAGTTCGCACGGTTCGTCAAGCGGTGGCCCCGTGGA
CTATGGCAATCAGCACGCATAGGCTGTGAGCTGCAAGTCGGAAGTCAAGCGTGCCAAGCAGTTGCGCCACCGGGCGACCT
3'-CTGTCAGCTGCAAGTCGGAAGTC-5' (1807)
- 5'-AATTCCGAGTGCCGATC-3' (2363)
- +56 AAGATAGTGCCAGATAACACCAACCAACCCATTTAATCGGACAAAATTCGAGTGCCGATCGAGAATTC
TTCTATCACGGTCTATTGTGGTTGGTTGGTAAATTAGCCTGTTTAAAGGCTCACGGCTAGCTCTTAAG
3'-TTAAGGCTCACGGCTAG-5' (2362)
3'-AGCCTGTTTAAAGGCTCACGGCTAGCTCTTAAG-5' (1894)

Abb. A1: Sequenz des DmDop1-Promotors (32/ProDop1) mit den zur Sequenzierung und für die PCR verwendeten Oligonukleotiden. Oligonukleotide, deren Sequenzen dem Promotor und kodierenden Strang der cDNA entsprechen, stehen über der DNA-Sequenz. Unter der Sequenz sind die Oligonukleotide aufgeführt, die komplementär zum Promotor und kodierenden Strang sind. Die Bezeichnung der Oligonukleotide ist in Klammern angegeben

- 365 TTGACGGGCGTACGTGTGTGTGTGTGTGCGAGAAGCGTGTGTTCAGTTAAGTGTGTGCATACCACAAGCATATATATAT
AACTGCCCCGATGCACACACACACACACGCTCTTCGCACACAGTCAATTCACACACGTATGGTGTTCGTATATATATA
3'-CGCTCTTCGCACACAGTCAATTC-5' (1636)
- 5'-CAATCATTTAAGCAGTG-3' (809)
- 285 TATATATATGGCATATTTATCAATCATTTAAGCAGTGACTTTAATGCTGTAATTTCCGCTGATTTGATGGCTGGACATGAC
ATATATATACCGTATAAATAGTTAGTAAATTCGTCACGTAAATTCACGACATTAAAGCGGACTAACTACCGACCTGTACTG
3'-TTCGTCACTGAAATTCAGACATT-5' (1750)
- 5'-CCGC
- 205 TCTGGGTCGCGTTCTCCGCGATGCCTGAATCTGAAACCCAGCGAGTTTCTCAGTTCGTCGTAACATGCTTCAATTGCCGC
AGACCCAGCGCAAGAGGCGCTACGGACTTAGACTTTGGGTCGCTCAAAGAGTCAAGCAGACTTGTACGAAGTTAACGGCG
3'-GCCCTACGGACTTAGACTTTG-5' (1630)
- ATTTAGTATCGAA-3' (262)
- 125 ATTTAGTATCGAAGAAGTGTATAGCAGAATGCTGCATTTGCCGTAGTCGGGCAATTTATTTGCCGTACCCGCAACTAAGAA
TAAATCATAGCTTCTTCACATAATCGTCTTACGACGTAACGGCATCAGCCCGTTAAATAACGGCATGGCGCTTGATTCCTT
- 45 TCTCTCGCTGAAAAGAGGAAGCAACCATCCACCAACCATCCATTCATGTACACACCACACCCATTGGTTTCCATATCAT
AGAGAGCGACTTTTCTCCTTCGTTGGTAGGTGGTTGGTAGGTAAAGTAAACCAAGGATTAGTA
3'-GGTAAGTACATGTGTGG-5' (285)
3'-GGTAAGTACATGTGTGGTGTGG-5' (1631)
- 5'-GAGTGGGTTCAAGTGGCC-3' (807)
- +36 CCTCGTTCCAATGACAAATGCAATGCCGGCGATTTGCTGCAATCGCAGCAGGAGTGGGTTCAAGTGGCCGCCACGGTCCGAA
GGAGCAAGGTTACTGTTTACGTTACGCCCGCTAACGACGTTAGCGTCGTCCTCACCACAGTCAACGGCGGTGCCAGCGTT
- +116 CCAGCACCACCAGTTCATCAGCAGCAGCACCACCATCATCAACACCAGTAGCGCCACTACCATCGGCGGAATCACACC
GGTCGTGGTGGTCAAGGTAGTCGTGCTGCTGGTGGTAGTAGTTGTGGTATCGCGGTGATGGTAGCCGCCCTTAGTGTGG
- +196 AGTGGGAGCACCGGATTTCTCCACGAATTCACGCTGCTGGACGCCGATCATCTGCCGCTGCAGCTCACGACCGCCAAGGT
TCACCCCTCGTGGCCTAAGAGGTGCTTAAGGTGCGACGACCTGCGGCTAGTAGACGCGACGTCGAGTGTGGCGGTTCCA
- +276 GGACCTGGACATTTGAAATCGACATCCAACTGCTGACAAATGGCTACGATGGCACAACGTTGACATCGTTCTACAATGAGA
CCTGGACCTGTAACTTTAGCTGTAGGTTGACGACTGTTTACCGATGCTACCGTGTGCAACTGTAGCAAGATGTTACTCT
- +356 GCAGCTGGACAAATGCGTCTGAAATGGATACAATAGTTGGTGAGGAACCGAGCCGCTGTCACCTTGTGTCAATTTAGTT
CGTCGACCTGTTTACGCGAGACTTTACCTATGTTATCAACCACTCCTTGGCCTCGGCGACAGTGAACACAGTTAACATCAA
- +436 GTTGGCATCTTCTATCGGTGCTGATATTCCTTTCCGGTGGCCGGAACATCCTGGTGTGCTGGCCATCTACACGGACGG
CAACCGTAGAAGGATAGCCACGACTATAAGGAAAGCCACCGGCCTTTGTAGGACCACACGGACCGGTAGATGTGCTGCC
- +516 CAGCCTGCCGCGGATCGGCAATCTGTCTGCTGCTGCTAGCGATTTGCGGATCTCTTCGTGGCCTCGCTGGTGTGACCT
GTCCGACGGCGCTAGCCGTTAGACAAGGACCGGAGCAATCGCTAACGCCCTAGAGAAGCACCAGGAGGACCACTACTGGA
- 5'-GCAATTTTGTGATACTT-3' (2215)
- +596 TTGCCGCTGTCAACGATTTGCTGGGATATTGGATCTTTGGAGCGCAATTTTGTGATACTTGGGTGGCCCTTTGATGTCATG
AACGGCCACAGTTGCTAAACGACCCATAACCTAGAAACCTCGCGTTAAACACTATGAACCCACCGGAACTACAGTAC
- +676 TGCTCGACGGCGTCAATTCGAACCTGTGCGCCATCTCGATGGACCGCTACATTCACATCAAGGATCCGCTCAGATACGG
ACGAGCTGCCGAGTTAAGACTTGGACACGCGGTAGAGCTACCTGGCGATGTAAGTGTAGTTCTTAGGCGAGTCTATGCC
- +756 CCGTTGGGTGACACGACGCGTGGCTGTCATCACCATCGCCGCCATTTGGCTGCTGGCCGCGTTCTGCTCTCTTTGTGCCCA
GGCAACCCACTGTGCTGCGCACCGACAGTAGTGGTAGCGGCGGTAACCGACGACCGGCGCAAGCAGAGGAAACACGGGT
- +836 TCTCGTTGGGCATCCATCGGCCCCGACGCGCTGATTTTCGAGGACAATGGCAAAAAGTATCCAACATGCGCTCTGGAC
AGAGCAACCCGTAGGTAGCCGGCTGGTGGCGACTAAAAGCTCCTGTTACCGTTTTCATAGGTTGTACGCGAGACCTG
- +916 CTCACGCCCACCTACGCGCTCGTGTCCAGCTGTATCAGTTTCTACTTCCCCTGCGTGGTTCATGATTGGCATCTACTGTCC
GAGTGGCGGTGGATGCGGCAGCACAGGTCGACATAGTCAAAGATGAAGGGGACGACCACTAACCCTAGATGACAGC
3'-CTAACCGTAGATGACAG-5' (2216)
- +996 GCTATACTGCTATGCCAGAGCAGCTGAAGTCCATCAAGGCGGTAACCTCGACAGGTGAGGTGGCCGAGAAGCAGCGGT
CGATATGACGATACGGGCTTCGTGCACTTCAGGTAGTTCCGCCATTTAGAGTGGTCCACTCCACCGGCTCTTCGTGCGCA

5'-TGGGTTCCTAAAACCAA-3' (265)

- 102 -

Bezeichnung	Sequenz (5'→3')	Verwendung
# rev	CAGGAAACAGCTATGAC	M13-Reverse-Primer; Sequenzierung
# uni	GTAAAACGACGGCCAGT	M13-Universal-Primer; Sequenzierung
# 2089	GTGCTCGAGAATGGATGGTTGGTGGGA	Mutagenese-Oligonukleotid zur Herstellung der pCATBasPD1 bzw. pCATEnhPD1 (2024/+495)- Konstrukte (3.2.1)
oligo-dT-anchor- Primer	GACCACGCGTATCGATGTCGAC (T) ₁₆ N	Oligonukleotid zur Herstellung der 5'- bzw. 3'-RACE-Klone (3.1.2/3)
PCR anchor-Primer	GACCACGCGTATCGATGTCGAC	Oligonukleotid zur Herstellung der 5'- bzw. 3'-RACE-Klone (3.1.2/3)
# 1894	GAATTCTCGATCGGCACTCGGAATTTGTCCGA	Oligonukleotid für die Primer- Extension-Analyse zur Identifizierung des Transkriptionsstarts von DmDop1 (3.1.5)
# 2262	GGCGGATCCTGTCGGCTATACTGCTA	Mutagenese-Oligonukleotid zur Herstellung von pQEDmDop1 (3.5)
# 2263	CGCTTCGAATGACGGCCGCCCTTGT	Mutagenese-Oligonukleotid zur Herstellung von pQEDmDop1 (3.5)
# 2282	CCATCATGATTGTCACCTAC	Oligonukleotid für die RT-PCR- Analyse des hDop1 (3.4.1)
# 2283	GAGACGTCAGTGCATAGTC	Oligonukleotid für die RT-PCR- Analyse des hDop1 (3.4.1)

Tab. A1: Weitere Oligonukleotide, die zum Sequenzieren, für PCR und zur Primer-Extension-Analyse verwendet wurden.

Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde am Institut für Biologische Informationverarbeitung (IBI) des Forschungszentrums Jülich angefertigt. Ich danke allen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern für ihre Unterstützung und die gute Zusammenarbeit. Insbesondere gilt meinen Dank:

- Herrn Prof. Dr. U.B. Kaupp für die Überlassung des Themas und seine stete Diskussionsbereitschaft,
- Herrn Dr. A. Baumann für die sehr gute Betreuung, seine wertvollen Ratschläge und vielen, hilfreichen Diskussionen, sowie für seine Unterstützung bei der Niederschrift der Arbeit
- Frau S. Balfanz für die Unterstützung bei den *in situ*-Hybridisierungen und bei der Anfertigung der Fotografien
- Herrn Dr. W. Bönigk für die Unterstützung in allen Fragen der Molekularbiologie
- Frau H. Vent für die Bereitstellung der Enzyme
- Herrn Dr. I. Weyand, Herrn Dr. H.G. Körschen, Herrn Dr. D. Weitz und Herrn M. Meyer für ihre Unterstützung bei allen biochemischen Fragen
- Frau M. Bruns für ihre Unterstützung bei der Arbeit in der Zellkultur
- Herrn D. Grammig, Herrn Dr. W. Schröder, Herrn H. Erkens und Frau Eckert für ihre technische Unterstützung
- Herrn R. Esser und Herrn A. Becker für die Behebung technischer Probleme

Herrn Prof. Dr. R. Krämer möchte ich für die Übernahme der Beurteilung dieser Arbeit als Gutachter der Universität zu Köln danken.

Forschungszentrum Jülich



Jül-3665

Juni 1999

ISSN 0944-2952