



Institut für Biologische Informationsverarbeitung

**Funktion von zyklischen Nukleotiden und
zyklisch Nukleotid-gesteuerten Ionenkanälen
im visuellen und olfaktorischen System von
*Drosophila melanogaster***

Falko Drews

**Funktion von zyklischen Nukleotiden und
zyklisch Nukleotid-gesteuerten Ionenkanälen
im visuellen und olfaktorischen System von
*Drosophila melanogaster***

Falko Drews

Berichte des Forschungszentrums Jülich ; 3997

ISSN 0944-2952

Institut für Biologische Informationsverarbeitung Jül-3997

D 38 (Diss., Köln, Univ., 2002)

Zu beziehen durch: Forschungszentrum Jülich GmbH · Zentralbibliothek

D-52425 Jülich · Bundesrepublik Deutschland

☎ 02461/61-5220 · Telefax: 02461/61-6103 · e-mail: zb-publikation@fz-juelich.de

Zusammenfassung

Die funktionelle Bedeutung von zyklisch Nukleotid-gesteuerten Ionenkanälen (CNG-Kanäle) beim Seh- und Riechvorgang der Wirbeltiere ist intensiv untersucht und gut verstanden. Für die Fruchtfliege *Drosophila melanogaster* war dagegen bisher unklar, wieviele CNG-Kanalgene im Genom vorhanden sind, in welchem Gewebe CNG-Kanäle exprimiert werden und welche Funktion sie besitzen.

In dieser Arbeit wurden zum ersten Mal durch Datenbankanalysen vier Gene identifiziert, die für CNG-Kanaluntereinheiten bei *Drosophila* kodieren. Ein Gen (*Dmcngb*) wurde aus einer cDNA-Bibliothek isoliert. Es kodiert vermutlich für eine β -Untereinheit eines CNG-Kanals. Das *Dmcngb*-, *Dmcnga*- und *Dmcng3*-Gen wurde mit einem Expressions-Tag versehen. Sowohl DmCNGA- als auch DmCNGB-Proteine werden in HEK293-Zellen exprimiert. Das DmCNG3-Protein war nicht nachweisbar. Mit immunzytochemischen Färbungen kotransfizierter HEK-TSA-Zellen wurden die DmCNGA- und DmCNGB-Proteine in einigen Zellen kolokalisiert. Die elektrischen Eigenschaften der CNG-Kanäle aus *Dmcnga/Dmcngb* kotransfizierten Zellen unterscheiden sich nicht von CNG-Kanälen aus Zellen, die nur mit dem *Dmcnga*-Gen transfiziert wurden.

In dieser Arbeit wurden spezifische Antikörper gegen die DmCNGA-Kanaluntereinheit hergestellt und charakterisiert. Immunhistochemische Färbungen von Gewebeschnitten adulter Fliegenköpfe zeigten, dass das Protein in der Retina exprimiert wird. Homooligomere DmCNGA-Kanäle werden ~ 50 Mal besser durch cGMP als durch cAMP geöffnet. In der Retina wird eine lösliche Guanylatzyklase exprimiert. Erstmals konnte in der vorliegenden Arbeit mit zwei unabhängigen Methoden gezeigt werden, dass auch eine Stickoxid-Synthase (NOS) in der Fliegenretina exprimiert wird. Die NOS synthetisiert den gasförmigen Botenstoff NO, der für die Aktivierung der löslichen Guanylatzyklase benötigt wird. Damit ist in der Retina die Enzymausstattung vorhanden, um einen cGMP-abhängigen Signalweg zu regulieren. Welche Aufgabe CNG-Kanäle in diesem Signalweg haben, muss durch weitere Untersuchungen geklärt werden.

Abstract

The physiological function of cyclic nucleotide-gated channels (CNG channels) are well known in vision and olfaction of vertebrates. In contrast, neither the total number of genes encoding CNG channel-subunits nor their cellular expression patterns and physiological functions are known in *Drosophila melanogaster*. Only one gene (*Dmcnga*) has been cloned from a *Drosophila* head-specific cDNA library and was functionally expressed in foster cells.

In the present study three novel genes (*Dmcngb*, *Dmcng3*, *Dmcng4*) coding for potential CNG channel-subunits were identified by screening the *Drosophila* genome data bank with the *Dmcnga*-sequence. The cDNA of *Dmcngb* was cloned by library screening and PCR amplification. The *Dmcngb*-gene most likely encodes a β -subunit of a CNG channel. The *Dmcngb*-gene as well as the *Dmcnga*- and *Dmcng3*-genes were HA-epitope tagged. Immunostaining of transiently transfected HEK293 cells with either construct revealed that only DmCNGA and DmCNGB-HA proteins were synthesized. As shown by immunostaining, the cotransfection of HEK-TSA-cells with *Dmcnga*- and *Dmcngb*-constructs resulted in a few cells that expressed both proteins. The electrical properties of CNG channels in cotransfected cells, however, were identical to homooligomeric DmCNGA-channels.

In this study specific antibodies were raised against the DmCNGA-subunit. Immunohistochemical stainings of adult *Drosophila* head sections showed that DmCNGA is located in the retina. Homooligomeric DmCNGA-channels are ~ 50-fold more sensitive to cGMP than to cAMP. An enzyme synthesizing cGMP (soluble guanylyl cyclase) has already been described in the retina. In addition, in this study the nitric oxide synthase was also identified in the *Drosophila* retina. The nitric oxide synthase produces the gaseous messenger NO which is necessary for activation of soluble guanylyl cyclases. Therefore the retina contains the enzymatic components for a cGMP-regulated signaling pathway in which CNG channels probably suit as the downstream targets.

I Inhaltsverzeichnis

I Inhaltsverzeichnis	I
II Abkürzungsverzeichnis	VII
1 Einleitung.....	1
1.1 Zyklisch Nukleotid-gesteuerte Ionenkanäle.....	2
1.2 CNG-Kanalgene in Wirbeltieren	4
1.3 Funktion von CNG-Kanälen beim Seh- und Riechvorgang	5
1.4 CNG-Kanalgene in Wirbellosen	8
1.5 Zielsetzung der Arbeit	11
2 Material und Methoden	12
2.1 Chemikalien und Enzyme.....	12
2.2 Stämme und Kulturmedien.....	12
2.2.1 Bakterienstämme	12
2.2.2 Medien zur Anzucht von Bakterien	13
2.2.3 Zelllinien.....	13
2.2.4 Kulturbedingungen eukaryonter Zellen	13
2.2.5 Fliegenstämme (<i>Drosophila melanogaster</i>)	14
2.2.6 Fliegenhaltung	14
2.3 Molekularbiologische Methoden.....	15
2.3.1 Plasmide	15
2.3.2 DNA-Größenstandard	15
2.3.3 Synthese und Reinigung von Oligonukleotiden.....	15
2.3.4 Quantifizierung von Nucleinsäuren	16
2.3.4.1 Photometrische Bestimmung.....	16
2.3.4.2 Ethidiumbromid-Fluoreszenz.....	16
2.3.5 Präparation von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i>	16
2.3.5.1 Mini-Präparation	16
2.3.5.2 Midi-Präparation	17

2.3.6	Modifizierung von DNA-Fragmenten.....	17
2.3.6.1	Glätten überhängender Einzelstrang-Enden.....	17
2.3.6.2	Phosphorylierung der 5'-Enden von DNA-Fragmenten	18
2.3.6.3	Dephosphorylierung von Plasmidvektoren	18
2.3.7	Analyse von DNA.....	18
2.3.7.1	Restriktionen.....	18
2.3.7.2	Agarose-Gelelektrophorese	19
2.3.8	Isolierung von DNA aus Agarosegelen	19
2.3.9	Klonierung von DNA-Fragmenten	19
2.3.9.1	Herstellung kompetenter Zellen.....	19
2.3.9.2	Ligation von DNA-Fragmenten	20
2.3.9.3	Transformation von <i>E. coli</i> Zellen	20
2.3.10	Amplifizierung von DNA durch Polymerase-Ketten Reaktion (PCR).....	20
2.3.11	Nichtradioaktive Sequenzierung	21
2.4	Herstellung gewebespezifischer <i>Drosophila</i> cDNA	23
2.4.1	Präparation von Gesamt-RNA aus <i>Drosophila melanogaster</i> Geweben..	23
2.4.2	Anreicherung von poly(A) ⁺ -RNA aus Gesamt-RNA von <i>Drosophila melanogaster</i>	23
2.4.3	Synthese von Erst- und Zweitstrang-cDNA.....	23
2.5	Durchmustern einer <i>Drosophila</i> cDNA-Bibliothek.....	24
2.5.1	Genbibliothek.....	24
2.5.2	Herstellung von "Mg ²⁺ -Zellen" zur Infektion mit λ-Phagen	24
2.5.3	Titerbestimmung einer λ-Phagen-cDNA-Bibliothek.....	25
2.5.4	Transfer und Immobilisierung von λ-Phagen-DNA.....	25
2.5.5	Radioaktive Markierung von DNA-Sonden	25
2.5.6	Hybridisierung von immobilisierter DNA mit DNA-Sonden und Autoradiographie.....	26
2.5.7	Isolierung von λ-Phagen und Präparation von λ-Phagen-DNA aus (kleinen) Lysaten.....	27
2.6	Heterologe Expression und Affinitätschromatographie.....	27
2.6.1	Transiente Transfektion von HEK293-Zellen	27

2.6.2	Expression und Reinigung von Fusionsproteinen.....	28
2.6.2.1	Glutathion S-Transferase (GST)-Fusionsproteine	29
2.6.2.2	Reinigung von Maltose-Bindeprotein (MBP)-Fusionsproteinen	29
2.6.2.3	Affinitätschromatographische Reinigung von Histidin-Tag- Fusionsproteinen	30
2.7	Herstellung und Reinigung polyklonaler Antikörper.....	30
2.7.1	Immunisierung von Kaninchen.....	30
2.7.2	Affinitätschromatographische Reinigung polyklonaler Antikörper	31
2.8	Isolierung von Membranproteinen und Konzentrationsbestimmungen.....	32
2.8.1	Isolierung von Membranproteinen aus HEK293-Zellen.....	32
2.8.2	Präparation von Membranproteinen aus nativem <i>Drosophila</i> Gewebe	32
2.8.3	Konzentrationsbestimmung von Proteinlösungen	33
2.8.3.1	Konzentrationsbestimmung löslicher Proteine.....	33
2.8.3.2	Konzentrationsbestimmung von Membranproteinen	33
2.8.4	Modifikation von Proteinen.....	34
2.8.4.1	Deglykosylierung von Membranproteinen.....	34
2.9	Immunpräzipitation	34
2.9.1	Immunpräzipitation von Membranproteinen an einer Antikörper- Säulenmatrix	35
2.10	Nachweis immobilisierter Proteine	35
2.10.1	Protein-Größenstandard	35
2.10.2	Gelelektrophorese.....	36
2.10.3	Transfer von Proteinen auf PVDF-Membranen ("Western-Blot")	37
2.10.4	Immunologischer Proteinnachweis auf Western-Blot Membranen.....	37
2.10.5	Wiederverwendung von Western-Blot Membranen.....	38
2.11	Immunzyto- und Immunhistochemie.....	38
2.11.1	Immunzytochemie an HEK293-Zellen.....	38
2.11.2	Immunhistochemie an Gewebeschnitten von <i>Drosophila melanogaster</i> ..	39
2.11.2.1	Anfertigung von Gewebeschnitten.....	39
2.11.2.2	Farbniederschlag und Durchlichtmikroskopie.....	40
2.11.2.3	Fluoreszenzmarkierte Antikörper und konfokale Mikroskopie	40
2.11.3	Immunhistochemie an larvalen Gehirnen von <i>Drosophila melanogaster</i> .	42

2.12 Diaphorase-Färbung.....	42
2.12.1 Diaphorase-Färbung an larvalen Gehirnen von <i>Drosophila melanogaster</i>	42
2.12.2 Diaphorase-Färbung an Gewebeschnitten adulter Fliegen	42
2.13 Elektrophysiologische Messungen	43
3 Ergebnisse.....	44
3.1 Die <i>Drosophila</i> CNG-Kanalgenfamilie	44
3.1.1 Datenbankrecherche zur Identifizierung potentieller CNG-Kanalgene	44
3.1.2 Einordnung der <i>Drosophila</i> CNG-Kanalproteine in α - und β -Untereinheiten	47
3.1.3 Klonierung des <i>Dmcngb</i> -Gens	51
3.1.4 Modifizierung der <i>Dmcng</i> -Klone für die heterologe Expression in HEK293-Zellen.....	55
3.1.4.1 Anfügen des Hämagglutinin A Epitops (HA-Tag) an die <i>Dmcnga</i> -Sequenz	56
3.1.4.2 Anfügen des Hämagglutinin A Epitops (HA-Tag) an die <i>Dmcngb</i> -Sequenz	58
3.1.4.3 Anfügen des (Histidin) ₆ -Epitops (His-Tag) an die <i>Dmcng3</i> -Sequenz	60
3.2 Heterologe Expression	63
3.2.1 Immunzytochemie an transfizierten HEK293-Zellen	63
3.2.1.1 Immunzytochemie an <i>Dmcnga</i> -HA transfizierten HEK293-Zellen	63
3.2.1.2 Immunzytochemie an <i>Dmcngb</i> -HA transfizierten HEK293-Zellen	63
3.2.1.3 Immunzytochemie an <i>Dmcng3</i> -His transfizierten HEK293-Zellen	64
3.2.2 Immunologischer Nachweis der heterolog exprimierten <i>Drosophila</i> CNG-Kanaluntereinheiten	66
3.2.2.1 Nachweis des DmCNGA-Proteins	66
3.2.2.2 Nachweis des DmCNGB-Proteins	68
3.2.2.3 Nachweis des DmCNG3-Proteins	69
3.2.3 Koexpression der <i>Drosophila</i> CNG-Kanalgene <i>Dmcnga</i> und <i>Dmcngb</i>	70
3.2.3.1 Western-Blot <i>Dmcnga</i> / <i>Dmcngb</i> -HA kotransfizierter HEK293-Zellen	71
3.2.3.2 Immunzytochemie an kotransfizierten HEK293-Zellen	72

3.2.4	Elektrophysiologische Eigenschaften heterolog exprimierter DmCNGB und DmCNGA/DmCNGB CNG-Kanäle.....	73
3.2.4.1	Leitfähigkeit	73
3.2.4.2	Ligandensensitivität der exprimierten Kanäle	76
3.2.5	Immunpräzipitation.....	77
3.3	Immunhistochemischer Nachweis des DmCNGA-Proteins in <i>Drosophila</i> Geweben	79
3.3.1	Herstellung und Charakterisierung von Antikörpern gegen DmCNGA.....	79
3.3.1.1	Reinigung und Charakterisierung DmCNGA-spezifischer, polyklonaler Antikörper	80
3.3.1.2	Herstellung und Test monoklonaler Antikörper.....	84
3.3.2	Nachweis der DmCNGA-Expression in <i>Drosophila</i> Geweben	84
3.3.3	Immunhistochemischer Nachweis des DmCNGA-Proteins in adulten Fliegenköpfen	85
3.4	Lokalisation der Stickoxid-Synthase in <i>Drosophila</i> Geweben.....	90
3.4.1	Diaphorase-Färbung im Gewebe	92
3.4.1.1	Diaphorase-Färbung larvaler Gehirne	92
3.4.1.2	Diaphorase-Färbung in Gewebeschnitten adulter Fliegenköpfe	95
3.4.2	Immunhistochemischer Nachweis der NO-Synthase	97
3.4.2.1	Immunhistochemischer Nachweis der NO-Synthase in larvalen Gehirnen.....	97
3.4.2.2	Immunhistochemischer Nachweis der NO-Synthase in Gewebeschnitten adulter Fliegenköpfe.....	98
4	Diskussion	101
4.1	Klonierung und Charakterisierung der <i>Drosophila</i> DmCNGB-Kanaluntereinheit	101
4.2	Vergleich der <i>Drosophila</i> CNG-Kanaluntereinheiten mit anderen CNG-Kanälen	104
4.2.1	Das Spannungsfühler-Motiv (S4).....	104
4.2.2	Die Porenregion	106
4.2.3	Die Bindestelle für zyklische Nukleotide	109
4.2.4	Sequenzmotive mit besonderen Aufgaben	111

4.3 Immunhistochemischer Nachweis einer CNG-Kanaluntereinheit in <i>Drosophila</i> Geweben	112
4.4 Modell eines cGMP-gesteuerten Signalweges in sensorischen Geweben von <i>Drosophila</i>	114
4.5 Ausblick	115
5 Literaturverzeichnis	117
Anhang	
A Nuklein- und Aminosäuresequenzen	133
B Exon/Intron-Übergänge und Aminosäureanzahl ausgewählter Proteinbereiche	145
C Verwendete Oligonukleotide	146

II Abkürzungsverzeichnis

α	Anti- / CNG-Kanaluntereinheit
A	Absorption
Abb.	Abbildung
Ac	Acetat
AC	Adenylatzyklase
APS	<u>A</u> mmoniumperoxodisulfat
ATP	<u>A</u> denosin <u>t</u> riphosphat
β	CNG-Kanaluntereinheit
b	Rind (<u>b</u> ovine)
bp	Basenpaare
BES	N,N,-bis-(2-Hydroxyethyl)-2-Aminoethansulfonsäure
BSA	Rinderserum-Albumin (<u>b</u> ovine <u>s</u> erum <u>a</u> lbumine)
bspw.	beispielsweise
bzw.	beziehungsweise
c	Ligandenkonzentration
ca.	circa
CaM	Calmodulin
cAMP	Adenosin-3',5'-zyklisches Monophosphat
CAP	<u>c</u> atabolite <u>a</u> ctivator <u>p</u> rotein
cDNA	revers-transkribierte DNA (<u>c</u> omplementary <u>DNA</u>)
cGMP	Guanosin-3',5'-zyklisches Monophosphat
CHAPS	3-[(3-Cholamidopropyl)-dimethylammonio]-propan-sulfonat
Ci	Curie
cm	Zentimeter (10^{-2} m)
CNG-Kanal	zyklisch Nukleotid-gesteuerter Ionenkanal (<u>c</u> yclic <u>n</u> ucleotide- <u>g</u> ated channel)
cNMP-Bindestelle	zyklisch Nukleotid-Bindestelle
cpm	Zählereignisse pro Minute (<u>c</u> ounts <u>p</u> er <u>m</u> inute)
C-Terminus	Carboxy-Terminus einer Polypeptidkette
d	Esel
Da	Dalton
DAB	Diaminobenzidin
DAG	Diacylglycerin
dCTP	Desoxycytidintriphosphat
d. h.	das heißt
Dm	<i>Drosophila melanogaster</i>
DMSO	<u>D</u> imethyl <u>s</u> ulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure (<u>D</u> esoxyribon <u>n</u> ucleotide <u>a</u> cid)
dNTP	<u>D</u> esoxyribon <u>n</u> ucleotid <u>t</u> riphosphat
DTT	<u>D</u> ithio <u>t</u> hreitol

<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	<u>E</u> thylend <u>a</u> mintetra <u>a</u> acetat
EGTA	<u>E</u> thylenglycoldiamintetra <u>a</u> acetat
g	Gramm / Erdbeschleunigung
GC	Guanylatzyklase
GCAP	Guanylatzylase-aktivierendes Enzym (guanylyl-cyclase-activating protein)
GST	<u>G</u> lutathion <u>S</u> - <u>T</u> ransferase
gt	Ziege
GTP	<u>G</u> uanosin <u>t</u> riphosphat
h	Stunde(n) / Mensch (<u>h</u> uman)
HA	Hämagglutinin A
HEK293-Zellen	Menschliche embryonale Nierenzelllinie (<u>h</u> uman <u>e</u> mbrionic <u>k</u> idney cells)
HEPES	N-(2-Hydroxyethyl)-Piperazin-N'-(2-Ethansulfonsäure)
His-Tag	(Histidin) ₆ -Epitop-Tag
Hrsg.	Herausgeber
I	Strom
IP ₃	Inositol-(1,4,5)-trisphosphat
IPTG	<u>I</u> sopropyl- β -D- <u>t</u> hiogalactopyranosid
J	Joule
kDa	Kilodalton (10 ³ Dalton)
kHz	Kilohertz (10 ³ Hertz)
l	Liter
LB-Medium	<u>L</u> uria- <u>B</u> roth Medium
m	Meter
M	Molar (mol/l)
mA	Milliampere (10 ⁻³ Ampere)
MBP	<u>M</u> altose- <u>B</u> indeprotein
mGC	membrangebundene Guanylatzyklase
min	Minute(n)
ml	Milliliter (10 ⁻³ l)
mm	Millimeter (10 ⁻³ m)
mM	Millimolar (10 ⁻³ M)
mmol	Millimol (10 ⁻³ mol)
mRNA	Boten-Ribonukleinsäure (<u>m</u> essenger <u>R</u> NA)
mV	Millivolt (10 ⁻³ V)
n	Hill-Koeffizient / Anzahl der Messungen
NBT	4-Nitrotetrazoliumchloridblau
NGS	Normales Ziegenserum (<u>n</u> ormal <u>g</u> oat serum)
ng	Nanogramm (10 ⁻⁹ g)

nm	Nanometer (10^{-9} m)
nM	Nanomolar (10^{-9} M)
NO	Stickoxid
NOS	Stickoxid-Synthase
N-Terminus	Amino-Terminus einer Polypeptidkette
OD	Optische Dichte
pA	Picoampere (10^{-12} A)
PA	Paraformaldehyd
PAA	Polyacrylamid
pB	Plasmid pBluescript SK ⁻
pc	Plasmid pcDNA1.1/Amp
PCR	Polymerase-Ketten Reaktion (<u>P</u> olymerase <u>c</u> hain <u>r</u> eaction)
PDE	Phosphodiesterase
pers.	persönlich
pg	Picogramm (10^{-12} g)
pH-Wert	Negativer dekadischer Logarithmus der Protonenkonzentration einer Lösung
PKC	<u>P</u> rotei <u>n</u> ki <u>n</u> ase <u>C</u>
PLC	<u>P</u> hospho <u>l</u> ipase <u>C</u>
PNK	T4- <u>P</u> olynu <u>k</u> leoti <u>d</u> ki <u>n</u> ase
poly(A) ⁺ -RNA	Polyadenylierte Ribonukleinsäure
pS	Picosiemens (10^{-12} S)
rb	Kaninchen
Rh	Rhodopsin
RNA	Ribonukleinsäure
rt	Ratte
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse Transkription mit nachfolgender PCR (= Amplifikation von RNA)
s	Sekunde(n)
SDS	Natriumdodecylsulfat
sGC	lösliche (zytoplasmatische) Guanylatzyklase
s.o.	siehe oben
T _a	Annealingtemperatur
T _m	Schmelztemperatur
Tab.	Tabelle
TCA	Trichloressigsäure
TEMED	<u>T</u> etra <u>m</u> ethylethylendi <u>a</u> min
Tris	2-Amino-2-(hydroxymethyl)-1,3-propandiol
TRP	<u>t</u> ransient <u>r</u> eceptor <u>p</u> otential
TRPL	TRP-like

μ	Mikro- (10 ⁻⁶)
μm	Mikrometer (10 ⁻⁶ m)
μg	Mikrogramm (10 ⁻⁶ g)
U	Umdrehungen / Enzymaktivität (unit)
üN	über Nacht
UV	Ultraviolett
V	Volt
vgl.	vergleiche !
v/v	Volumenprozent
W	Watt
w/v	Gewichtsprozent
x	-fach / -mal
ZNS	Zentrales Nervensystem
°C	Temperatur in Grad Celsius
%	Prozent

Nukleotide innerhalb einer Nukleinsäuresequenz sind durch die Anfangsbuchstaben der Basen bezeichnet (A: Adenin, C: Cytosin, G: Guanin, T: Thymin).

Aminosäuren sind nach dem Einbuchstabenkode abgekürzt:

Alanin	A	Serin	S
Arginin	R	Threonin	T
Asparagin	N	Tryptophan	W
Aspartat	D	Tyrosin	Y
Cystein	C	Valin	V
Glutamin	Q		
Glutamat	E		
Glycin	G		
Histidin	H		
Isoleucin	I		
Leucin	L		
Lysin	K		
Methionin	M		
Phenylalanin	F		
Prolin	P		

1 Einleitung

Die Überlebensfähigkeit eines Organismus wird durch die Eigenschaften und das Zusammenspiel seiner Zellen gewährleistet. Einige Körperzellen sind darauf spezialisiert, Signale und Reize aus der Umwelt (Licht, Duftstoffe u.a.) zu registrieren und in biochemische oder elektrische Antworten umzuwandeln. Dieser Vorgang wird als Signaltransduktion bezeichnet. Alle Zellen sind von einer Lipiddoppelschicht umgeben, so dass ein aktiver Stoffaustausch nur über die Endo- oder Exozytose bzw. über Membranproteine erfolgen kann. Zu diesen Membranproteinen gehören Ionenkanäle und energieabhängige Transporter.

Ionenkanäle sind integrale Membranproteine, die hydrophile Poren in der Zellmembran ausbilden und den passiven Fluss von Ionen ermöglichen (Übersicht: HILLE, 2001). Diese Eigenschaft ist entscheidend für die Entstehung und Weiterleitung elektrischer Signale, beispielsweise in sensorischen Zellen, Nerven- und Muskelzellen.

Ionenkanäle werden aufgrund ihrer funktionellen und strukturellen Eigenschaften in Familien zusammengefasst. Spannungsaktivierte Ionenkanäle werden durch Änderungen der Membranspannung geöffnet (Übersicht: TERLAU & STÜHMER, 1998; ARMSTRONG & HILLE, 1998). Ligandengesteuerte Ionenkanäle öffnen nach der Bindung spezifischer Liganden wie Acetylcholin (ACh), Glutamat oder γ -Aminobuttersäure (GABA). Die Bindung der Liganden kann sowohl auf der extrazellulären Seite (ACh, Glutamat, GABA; Übersicht: BARNARD, 1996) als auch auf der zyttoplasmatischen Seite erfolgen (zyklische Nukleotide (cAMP, cGMP); KAUPP & SEIFERT, 2002).

Eine weitere Unterscheidungsmöglichkeit ist die Ionenselektivität der Kanäle. So sind einige Ionenkanäle überwiegend nur für eine Ionensorte permeabel, beispielsweise für Natrium- (Übersicht: CATTERALL, 2000), für Kalium- (DOYLE et al., 1998; Zhou et al., 2001; Übersicht: JAN & JAN, 1997) oder für Chlorid-Ionen (DUTZLER et al., 2002). Andere Ionenkanäle diskriminieren nur schlecht zwischen verschiedenen Ionensorten. Sie werden als nicht-selektive Ionenkanäle bezeichnet.

Für die Funktion sensorischer Neurone, wie beispielsweise Seh- und Riechzellen, ist eine Familie von Ionenkanälen sehr wichtig. Dies sind die zyklisch Nukleotid-gesteuerten Ionenkanäle (CNG-Kanäle).

1.1 Zyklisch Nukleotid-gesteuerte Ionenkanäle

CNG-Kanäle gehören funktionell zur Familie der ligandengesteuerten Ionenkanäle. Sie werden durch die kooperative Bindung der intrazellulären Botenstoffe cGMP und cAMP aktiviert (Übersicht: ZUFALL et al., 1994; KAUPP, 1995; KAUPP & SEIFERT, 2002). In Sebstäbchen (FESENKO et al., 1985; KOCH & KAUPP, 1985), Sehzapfen (HAYNES & YAU, 1985) und Riechzellen (NAKAMURA & GOLD, 1987) von Wirbeltieren sind sie die Endglieder von Signaltransduktionsketten. CNG-Kanäle kommen aber nicht nur in Wirbeltieren vor. Aus verschiedenen Wirbellosenpezies wurden ebenfalls CNG-Kanalgene kloniert (BAUMANN et al., 1994; COBURN & BARGMANN, 1996; KOMATSU et al., 1996; CHEN et al., 1999; MIYAZU et al., 2000). Die strukturellen Eigenschaften dieser Kanäle unterscheiden sich nicht grundlegend von denen der Wirbeltiere. Charakteristische Merkmale der CNG-Kanäle sollen im folgenden näher beschrieben werden.

Aufgrund ihrer strukturellen Eigenschaften gehören CNG-Kanäle zur Super-Familie der spannungsaktivierten Ionenkanäle (JAN & JAN, 1990; ZAGOTTA & SIEGELBAUM, 1996), obwohl sie durch die Bindung eines Liganden und nicht durch Spannungsänderungen aktiviert werden (KAUPP et al., 1989; YAU & BAYLOR, 1989; LYNCH & LINDEMANN, 1994). CNG-Kanäle bilden eine eigene Unter-Familie von nicht-selektiven Kationenkanälen. Sie sind für monovalente (Na^+ , K^+) und divalente (Ca^{2+} , Mg^{2+}) Kationen permeabel (Übersicht: KAUPP & SEIFERT, 2002).

CNG-Kanäle bestehen *in vivo* aus zwei verschiedenen Untereinheiten-Typen, den α - und den β -Untereinheiten (Abb. 1). Diese Untereinheiten besitzen charakteristische Strukturelemente (Übersicht: EISMANN et al., 1993). Dazu gehören sechs transmembranale Segmente (S1-S6) (HENN et al., 1995). Sowohl der N- als auch der C-Terminus sind intrazellulär lokalisiert (COOK et al., 1989; MOLDAV et al., 1991). Zwischen dem 5. und 6. transmembranalen Segment liegt die Pore (GOULDING et al., 1993; ROOT & MACKINNON, 1993; EISMANN et al., 1994; RHO & PARK, 1998).

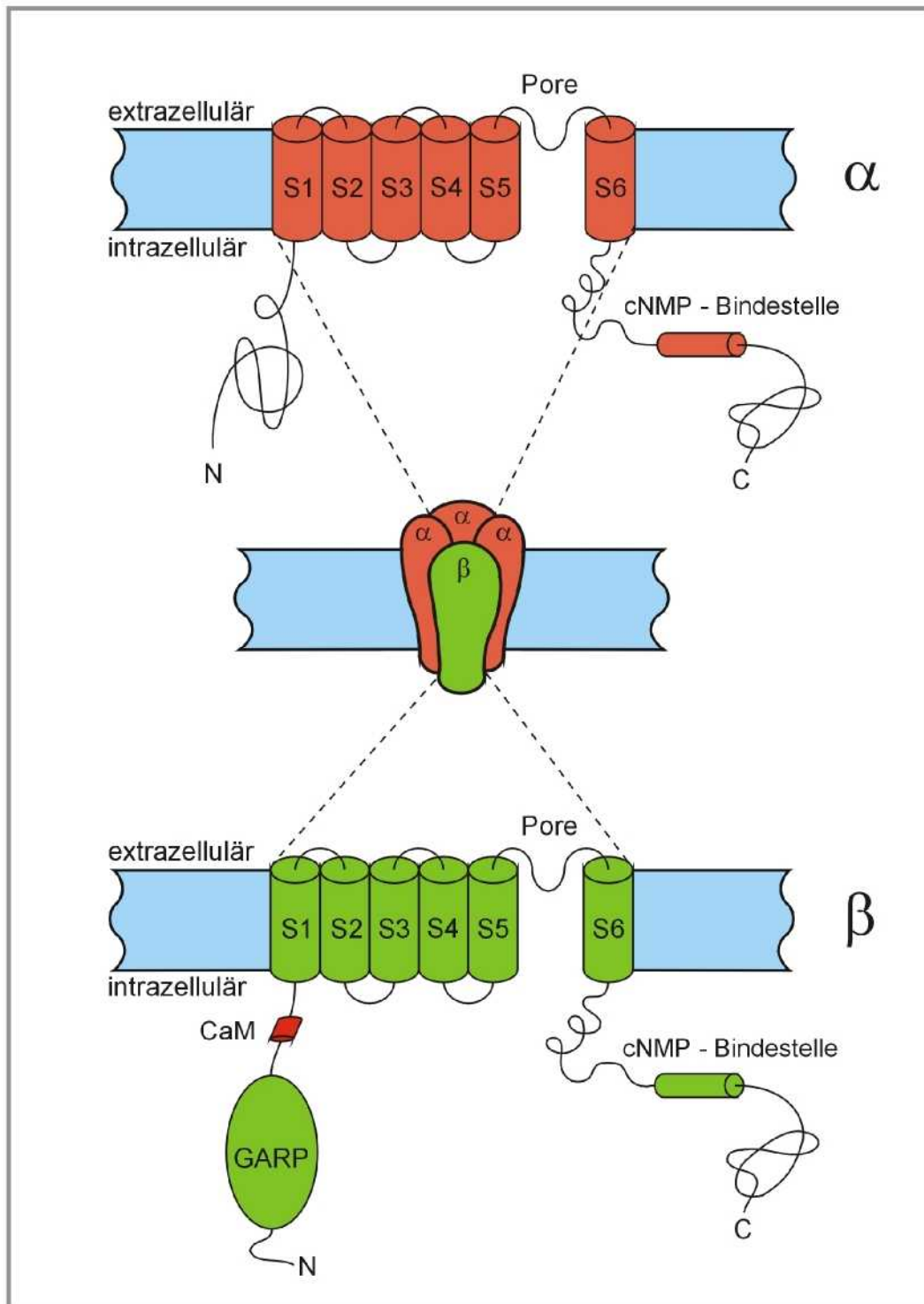


Abb. 1: Transmembranale Topologie einer α - und einer β -Untereinheit des CNG-Kanals aus Sehstäbchen. Die Abbildung zeigt die transmembranalen Segmente S1-S6, die Porenregion (Pore) und die Bindestelle für zyklische Nukleotide (cNMP-Bindestelle). Die N-terminalen Enden der Proteine sind mit N, die C-terminalen Enden mit C bezeichnet. Die N- und C-Termini befinden sich intrazellulär. Der Glutamat-reiche Abschnitt der β -Untereinheit ist mit GARP und die Calmodulin-Bindestelle mit CaM bezeichnet. Native CNG-Kanäle sind vermutlich aus vier Untereinheiten (z.B. $\alpha\alpha\alpha\beta$) zusammengesetzt. Die genaue Stöchiometrie ist noch nicht abschließend geklärt.

Im C-Terminus befindet sich bei allen CNG-Kanaluntereinheiten eine Bindestelle für zyklische Nukleotide (cAMP/cGMP (cNMP)-Bindestelle). Sie besitzt große Sequenzähnlichkeit zu den Bindestellen für zyklische Nukleotide in cAMP- und cGMP-abhängigen Proteinkinasen (WEBER et al., 1987; WEBER et al., 1989) und zum catabolite activator protein (CAP) aus *E. coli* (MCKAY & STEITZ, 1981).

Das S4-Segment der CNG-Kanäle ähnelt dem Spannungsfühler der spannungsaktivierten Ionenkanäle. Anders als bei spannungsaktivierten K⁺-Kanälen, in denen das Sequenzmotiv (^R/KXX)_n bis zu sieben Mal wiederholt wird (Übersicht: JAN & JAN, 1992; PONGS, 1992), ist dieses Motiv in CNG-Kanälen verkürzt und wird von negativ geladenen Aminosäuren flankiert.

Die β-Untereinheit der CNG-Kanäle in Sehstäbchen (CNGB1a) besitzt, im Gegensatz zur α-Untereinheit (CNGA1), einen viel längeren N-Terminus (⇒ Abb. 1). In dieser Verlängerung befindet sich ein Sequenzabschnitt, der zu zwei löslichen Glutamat-reichen Proteinen (glutamic acid-rich protein, GARP) aus der Rindernetzhaut sehr ähnlich ist (SUGIMOTO et al., 1991; COLVILLE & MOLDAY, 1996; GRUNWALD et al., 1998; KÖRSCHEN et al., 1999). Es wird angenommen, dass dieser geladene Bereich an der Organisation makromolekularer Komplexe beteiligt ist (KÖRSCHEN et al., 1999; POETSCH et al., 2001). In der Retina sind native CNG-Kanäle vermutlich aus vier Untereinheiten (bspw. αααβ) aufgebaut, deren genaue Stöchiometrie jedoch noch nicht abschließend geklärt ist (SHAMMAT & GORDON, 1999; HE et al., 2000).

1.2 CNG-Kanalgene in Wirbeltieren

Mehrere CNG-Kanalgene sind aus Wirbeltieren kloniert und nach heterologer Expression elektrophysiologisch untersucht worden (Übersicht: KAUPP, 1995; FINN et al., 1996; ZAGOTTA & SIEGELBAUM, 1996; WEI et al., 1998; KAUPP & SEIFERT, 2002). In Sehstäbchen und Sehzapfen werden unterschiedliche α-Untereinheiten (Sehstäbchen: CNGA1, KAUPP et al., 1989; Sehzapfen: CNGA3, BÖNIGK et al., 1993; WEYAND et al., 1994) exprimiert. Die Untereinheiten bilden in heterologen Expressionssystemen funktionelle Kanäle. Einige ihrer Eigenschaften unterscheiden sich deutlich von denen der nativen CNG-Kanäle (KAUPP & SEIFERT, 2002). Werden jedoch die α-Untereinheiten mit den photorezeptorspezifischen β-Untereinheiten koexprimiert (Sehstäbchen: CNGB1a, CHEN et al., 1994; KÖRSCHEN et al., 1995;

Sehzapfen: CNGB3, GERSTNER et al., 2000), unterscheiden sich die heterolog exprimierten Kanäle kaum von den nativen CNG-Kanälen.

Aus dem Riechepithel von Wirbeltieren wurden drei CNG-Kanal α -Untereinheiten (CNGA2: DHALLAN et al., 1990; LUDWIG et al., 1990; CNGA3: MEYER et al., 2000; CNGA4: BRADLEY et al., 1994; LIMAN & BUCK, 1994) und bisher eine β -Untereinheit (CNGB1b, SAUTTER et al., 1998; BÖNIGK et al., 1999) kloniert.

1.3 Funktion von CNG-Kanälen beim Seh- und Riechvorgang

Die funktionelle Bedeutung der CNG-Kanäle bei der Phototransduktion soll anhand eines Sehstäbchens verdeutlicht werden (Abb. 2). Licht wird bei Wirbeltieren in den Sehstäbchen und -zapfen der Netzhaut (Retina) absorbiert und durch eine Enzymkaskade („Sehkaskade“) in ein elektrisches Signal umgewandelt (Übersicht: STRYER, 1991; KAUPP & KOCH, 1992; YAU, 1994; MÜLLER & KAUPP, 1998). Sehstäbchen ermöglichen das Sehen bei schwachem Licht. Das Sehen bei höheren Lichtintensitäten und die Farbwahrnehmung wird durch drei unterschiedliche Typen von Sehzapfen ermöglicht, die unterschiedliche spektrale Empfindlichkeiten besitzen. Beide Sehzell-Typen - Sehstäbchen und -zapfen - sind morphologisch in ein Außen- und ein Innensegment unterteilt (Abb. 2A). Im Innensegment befinden sich der Zellkern und andere Organellen. Hier findet auch die Proteinbiosynthese statt. An der Basis des Innensegments schließt sich der synaptische Endfuß an. Innen- und Außensegment sind durch ein Zilium miteinander verbunden. Das Außensegment enthält alle molekularen Komponenten, die an der Phototransduktion beteiligt sind (Abb. 2B). Das Außensegment der Sehstäbchen besitzt etwa 1.000 Membranscheibchen (engl. „discs“), die sowohl elektrisch als auch morphologisch von der Plasmamembran getrennt sind. In diesen „discs“ ist das Sehpigment Rhodopsin eingelagert. Sehzapfen besitzen keine isolierten Membranscheibchen. Ihre Plasmamembran ist jedoch vielfach gefaltet und verleiht dem Zapfenaußensegment ebenfalls eine stapelförmige Struktur. Das Sehpigment der Sehzapfen befindet sich in der Plasmamembran.

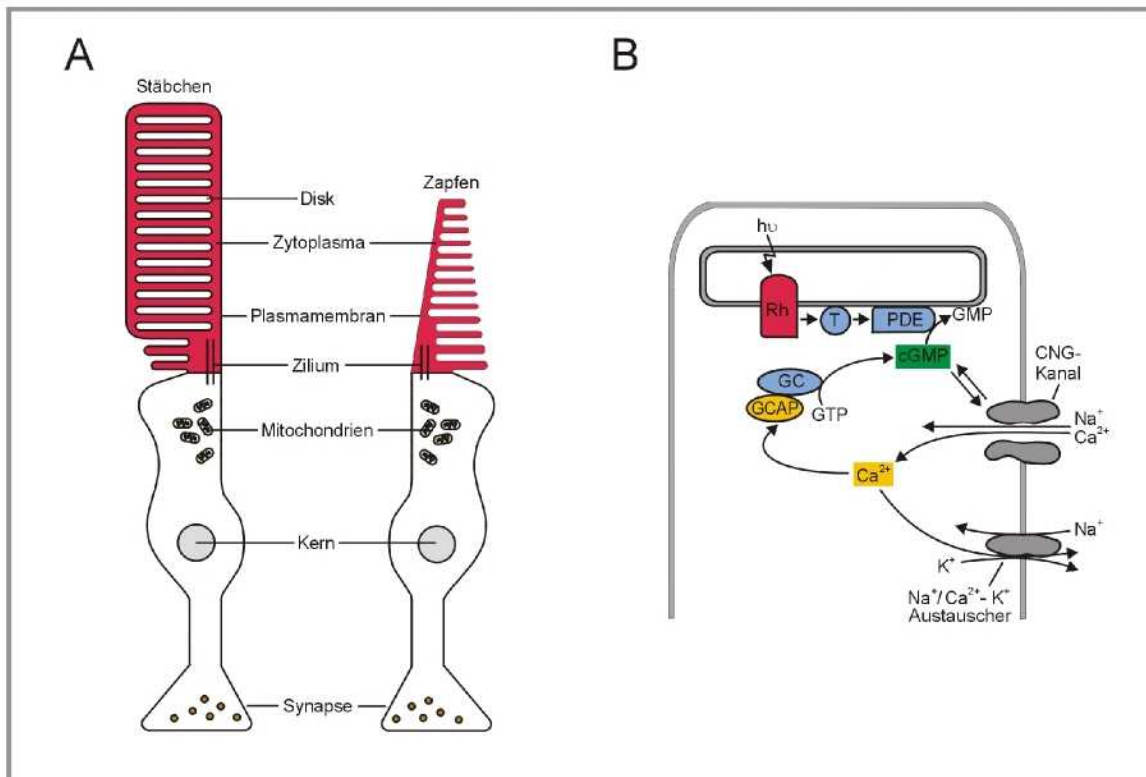


Abb. 2: Schematische Darstellung der Sehzellen und der Phototransduktion. A) Sehstäbchen- (Stäbchen) und Sehzapfenzelle (Zapfen). Die Außensegmente sind rot markiert. **B)** Schematische Darstellung der Phototransduktion im Außensegment eines Sehstäbchens (Erklärung im Text). Verwendete Abkürzungen: GC: Guanylatzyklase; GCAP: Guanylatzyklase-aktivierendes Protein; PDE: cGMP-Phosphodiesterase; Rh: Rhodopsin; T: Transducin.

Im Dunkeln sind die CNG-Kanäle der Sehzelle durch eine erhöhte cGMP-Konzentration geöffnet. Sie leiten Na^+ - und Ca^{2+} -Ionen in die Zelle. Etwa 15% des Dunkelstroms wird von Ca^{2+} getragen (HODGKIN et al., 1987; NAKATANI & YAU, 1988). Die intrazelluläre freie Ca^{2+} -Konzentration ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) beträgt ca. 220-550 nM (RATTO et al., 1988; GRAY-KELLER & DETWILER, 1994). Die Sehzelle wird durch den Kationeneinstrom depolarisiert (~ -35 mV). Am synaptischen Endfuß wird im Dunkeln der Neurotransmitter Glutamat ausgeschüttet.

Was passiert bei Belichtung der Sehzelle? Die Absorption eines Lichtquants löst eine Konformationsänderung im Rhodopsinmolekül (Rh) aus. Das angeregte Rhodopsin aktiviert ein GTP-bindendes Protein, das Transducin (T). Aktiviertes Transducin stimuliert seinerseits die cGMP-Phosphodiesterase (PDE). Die Phosphodiesterase hydrolysiert den Botenstoff der Phototransduktion cGMP. Wenn die cGMP-

Konzentration abnimmt, schließen die CNG-Kanäle in der Plasmamembran. Das Schließen der CNG-Kanäle im Außensegment und die Aktivität von Kaliumkanälen im Innensegment hyperpolarisiert die Sehzelle. Als Folge wird die Freisetzung des Neurotransmitters Glutamat aus dem synaptischen Endfuß vermindert und die Aktivität nachgeschalteter Neurone verändert.

Die Erholungsphase nach Belichtung der Sehzelle soll nur kurz angesprochen werden (Übersicht: KAUPP & KOCH, 1992; PALCZEWSKI & SAARI, 1997; MÜLLER & KAUPP, 1998; BURNS & BAYLOR, 2001). Aufgrund der andauernden Aktivität des $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}\text{-K}^+$ Austauschers sinkt, nach dem Schließen der CNG-Kanäle, die $[\text{Ca}^{2+}]_i$ der Sehzelle auf einen Wert von 50-100 nM (GRAY-KELLER & DETWILER, 1994). Daraufhin dissoziiert Ca^{2+} von dem Ca^{2+} -Bindeprotein GCAP (guanylyl-cyclase-activating protein) ab. Die Guanylatzyklase wird aktiviert. Die intrazelluläre cGMP-Konzentration steigt wieder an und die CNG-Kanäle öffnen. Durch die geöffneten CNG-Kanäle fließt Ca^{2+} in die Zelle. Die freie $[\text{Ca}^{2+}]_i$ erreicht schließlich wieder den Wert von 250-500 nM (= Dunkelzustand). GCAP bindet Ca^{2+} -Ionen und wird dadurch inhibiert.

CNG-Kanäle fungieren ebenfalls als Endglieder von Signalketten bei der Duftstoffwahrnehmung von Wirbeltieren (Übersicht: SCHILD & RESTREPO, 1998; FIRESTEIN, 2001). Duftstoffmoleküle binden an spezifische Rezeptoren in der Zilienmembran olfaktorischer Neurone (Übersicht: BUCK & AXEL, 1991; BREER et al., 1996; FREITAG et al., 1998). Die Bindung aktiviert, ähnlich wie Lichtquanten in Photorezeptoren, eine G-Protein vermittelte Signalkette (Abb. 3). In den meisten Riechzellen wird nach Duftstoffbindung der intrazelluläre Botenstoff cAMP synthetisiert. Das cAMP bindet an CNG-Kanäle in der Plasmamembran der Zilien (NAKAMURA & GOLD, 1987; LOWE et al., 1989; BAKALYAR & REED, 1990). Die nativen Kanäle sind aus drei verschiedenen Untereinheiten aufgebaut. Sie werden von den Genen *cnga2*, *cnga4* und *cngb1b* kodiert (CNGA2: DHALLAN et al., 1990; LUDWIG et al., 1990; CNGA4: BRADLEY et al., 1994; LIMAN & BUCK, 1994; CNGB1b: SAUTTER et al., 1998; BÖNIGK et al., 1999). Durch die geöffneten CNG-Kanäle fließt Ca^{2+} in die Zelle und aktiviert Ca^{2+} -abhängige Cl^- -Kanäle (KLEENE & GESTELAND, 1991; KLEENE,

1993 und 1997; HALLANI et al., 1998). Der Cl^- -Ausstrom führt zur Depolarisation der Zelle. Ein Aktionspotential entsteht und wird an das Gehirn weitergeleitet.

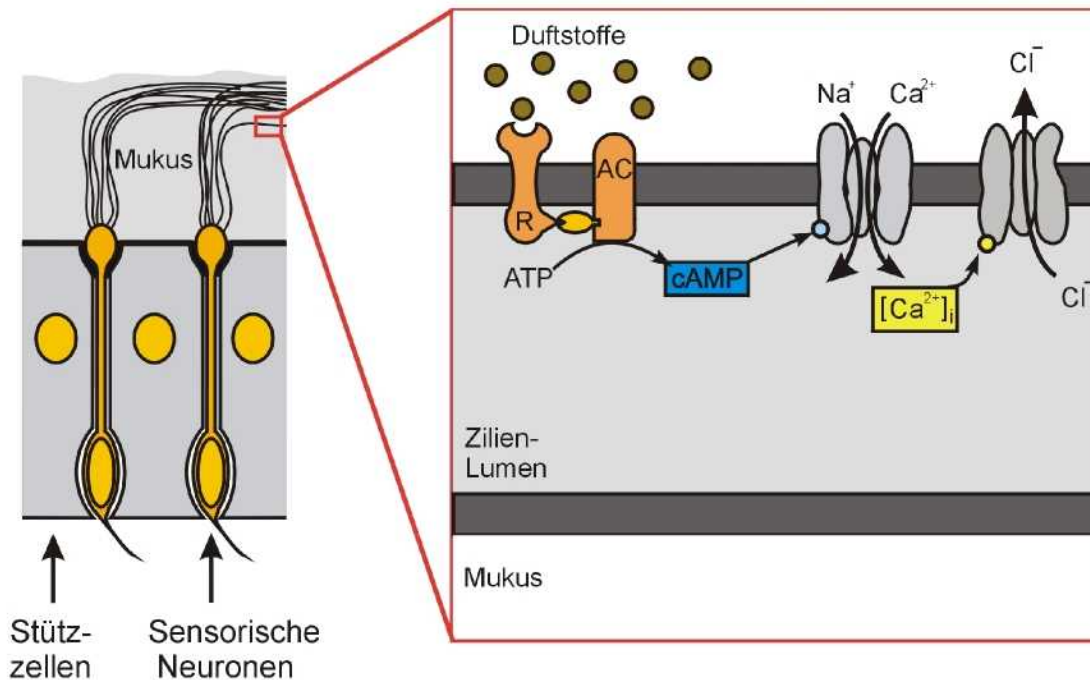


Abb. 3: Schematische Darstellung des Riechepithels und der Olfaktion. Die Abbildung zeigt nur den cAMP-abhängigen Signalweg, der in den meisten Riechzellen benutzt wird. Links sind olfaktorische sensorische Neurone mit ihren Zilien, die in den Mukus ragen, abgebildet. Der Ausschnitt stellt schematisch die Olfaktion in der Zilienmembran der Riechzelle dar (Erklärung im Text). Verwendete Abkürzungen: AC: Adenylatzyklase; R: Duftstoffrezeptor.

Neben dem Signalweg, der cAMP als Botenstoff benutzt, existiert in einer Subpopulation von Riechzellen ein cGMP-gesteuerter Signalweg (MEYER et al., 2000). In diesen Zellen wird durch Duftstoffe die Synthese von cGMP ausgelöst. Das cGMP bindet an einen CNG-Kanal, der eine Spleißvariante des *cnga3*-Gens enthält (CNGA3: MEYER et al., 2000). Es wird vermutet, dass diese Riechzellen am Sozialverhalten von Wirbeltieren beteiligt sind.

1.4 CNG-Kanalgene in Wirbellosen

Auch bei einigen Wirbellosenspezies sind Gene bekannt, die für α - und β -Untereinheiten von CNG-Kanälen kodieren. Sie werden in Anlehnung an die Wirbeltier CNG-Kanal-Nomenklatur als *cnga*- oder *cngb*-Gene bezeichnet. Es existieren jedoch noch weitere Untereinheiten, die sich nicht eindeutig zuordnen lassen.

Eine CNG-Kanaluntereinheit wurde aus dem Pfeilschwanzkrebs *Limulus polyphemus* kloniert (LimCNG1; CHEN et al., 1999). Sie wird im Gehirn (CHEN et al., 1999) und im ventralen Photorezeptor exprimiert (CHEN et al., 2001). Diese Untereinheit konnte bisher nicht funktionell exprimiert werden (CHEN et al., 1999).

In den vollständig sequenzierten Genomen von *Caenorhabditis elegans* und *Drosophila melanogaster* wurden 6 (BARGMANN, 1998) bzw. 4 (LITTLETON & GANETZKY, 2000) potentielle CNG-Kanalgene identifiziert. Zwei Gene des Nematoden *Caenorhabditis elegans* sind inzwischen kloniert. Das *tax-4* Gen (*cecnga*) kodiert für eine α - (KOMATSU et al., 1996) und das *tax-2* Gen (*cecngb*) kodiert für eine β -Untereinheit (COBURN & BARGMANN, 1996). Sie lagern sich zu einem heterooligomeren funktionellen CNG-Kanal zusammen (KOMATSU et al., 1999). Diese CNG-Kanäle sind sowohl an der Temperatur- und Duftstoffwahrnehmung, als auch am Auswachsen sensorischer Neurone während der Entwicklung des Nematoden beteiligt (COBURN & BARGMANN, 1996; COBURN et al., 1998). Über die Funktion der restlichen CNG-Kanalgene (*cecng3-cecng6*) ist noch nichts bekannt.

Aus *Drosophila melanogaster* wurden bisher zwei CNG-Kanaluntereinheiten kloniert. Ein Gen (*Dmcnga*; BAUMANN et al., 1994) kodiert für eine α -Untereinheit, die große Sequenzähnlichkeit zu den Wirbeltier-Untereinheiten CNGA1-CNGA3 besitzt. Heterolog exprimierte, homooligomere DmCNGA-Kanäle werden durch cGMP geöffnet und sind Ca^{2+} -permeabel (BAUMANN et al., 1994). Mit RT-PCR-Experimenten wurde die mRNA in den Antennen und im visuellen System der Fliege nachgewiesen. Die physiologische Bedeutung dieser Untereinheit ist unbekannt (BAUMANN et al., 1994). Ein weiteres CNG-Kanalgen (*Dmcng3*) wird während der gesamten *Drosophila* Entwicklung exprimiert (MIYAZU et al., 2000). Die abgeleitete Aminosäuresequenz (DmCNG3) läßt sich weder den α - noch den β -Untereinheiten der Wirbeltier CNG-Kanäle eindeutig zuordnen. Das DmCNG3-Protein wird im Gehirn und im visuellen System exprimiert. Mit *in situ* Hybridisierungen wurde die mRNA auch in der Retina nachgewiesen (MIYAZU et al., 2000). Nach der heterologen Expression des Gens in HEK293-Zellen wurden jedoch keine zyklisch Nukleotid-induzierten Ströme gemessen (MIYAZU et al., 2000). Obwohl die Expression der *Dmcnga*- und *Dmcng3*-Gene mit molekularbiologischen Methoden im visuellen System von *Drosophila* nachgewiesen wurde, gibt es keinen gesicherten Hinweis, dass sie an der Phototransduktion beteiligt sind.

Wie bei Wirbeltieren, existiert in den mikrovillären Photorezeptoren von *Drosophila* ebenfalls eine lichtabhängige G-Protein vermittelte Signalkaskade (Übersicht: RANGANATHAN et al., 1995; SCOTT & ZUKER, 1997; MONTELL, 1999; HARDIE, 2001; HARDIE & RAGHU, 2001). Anders als in Wirbeltier Photorezeptoren wird jedoch eine Phospholipase C β stimuliert (BÄHNER et al., 2000), die die intrazellulären Botenstoffe Inositol-(1,4,5)-trisphosphat (IP $_3$) und Diacylglycerin (DAG) synthetisiert. Die Endglieder dieses Signalwegs sind Ca $^{2+}$ -permeable Kationen-Kanäle (HARDIE & MINKE, 1993; PERETZ et al., 1994; ZUKER, 1996; REUSS et al., 1997). Sie werden als TRP- (transient receptor potential) und TRPL (TRP-like)-Kanäle bezeichnet (SCOTT et al., 1995; NIEMEYER et al., 1996; Übersicht: HARTENECK et al., 2000; CLAPHAM et al., 2001). Ein weiteres Gen (TRP γ) kodiert für eine Untereinheit, die sich mit TRPL-Proteinen zusammenlagert (XU et al., 2000). Die Aktivierung dieser Kanäle führt zur Depolarisierung der Photorezeptoren. Der genaue Öffnungsmechanismus der TRP-Kanäle ist noch nicht bekannt. Bisher wurde ausgeschlossen, dass sie durch cGMP, IP $_3$ und Änderungen der Membranspannung aktiviert werden (HU & SCHILLING, 1995; NIEMEYER et al., 1996; VACA et al., 1994).

Im Gegensatz zur Phototransduktion sind die molekularen Komponenten des Riechvorgangs bei *Drosophila* (Übersicht: CARLSON, 1996; SMITH, 1996) bislang kaum verstanden. Inzwischen sind zwar einige Duftstoffrezeptoren kloniert worden (CLYNE et al., 1999; GAO & CHESS, 1999; Übersicht: CLYNE et al., 2000; GALINDO & SMITH, 2001); wie die Signaltransduktion in den olfaktorischen Neuronen jedoch abläuft, ist nicht geklärt.

Es ist aber interessant, dass zwei CNG-Kanaluntereinheiten (*Dm $cnga$* und *Dm $cng3$*) im visuellen System und *Dm $cnga$* zusätzlich in den Antennen von *Drosophila* exprimiert wird. Im vollständig sequenzierten *Drosophila* Genom finden sich noch zwei weitere Gene, die für CNG-Kanaluntereinheiten kodieren. Das *Dm $cngb$* -Gen ist den β -Untereinheiten und das *Dm $cng4$* -Gen den α -Untereinheiten der Wirbeltier CNG-Kanäle am ähnlichsten. Über die physiologische Bedeutung der vier *Drosophila* CNG-Kanaluntereinheiten (*DmCNGA*, *DmCNGB*, *DmCNG3*, *DmCNG4*) ist nichts bekannt.

Für *Caenorhabditis elegans* wurde gezeigt, dass ein CNG-Kanal an der Chemotaxis und an der Neurogenese beteiligt ist (COBURN & BARGMANN, 1996; COBURN et al., 1998). Es ist interessant zu untersuchen, ob die *Drosophila* CNG-Kanäle

vergleichbare Aufgaben übernehmen. Dazu ist die Klonierung aller Untereinheiten sowie die Aufklärung der genauen zellulären Verteilung der Proteine erforderlich.

1.5 Zielsetzung der Arbeit

Im Rahmen dieser Arbeit sollte das Expressionsmuster des DmCNGA-Proteins immunhistochemisch bestimmt werden. Dazu mussten spezifische Antikörper gegen die Kanaluntereinheit hergestellt und charakterisiert werden.

Die nativen CNG-Kanäle der Wirbeltiere sind heterooligomere Proteine. Möglicherweise sind *Drosophila* CNG-Kanäle ebenfalls aus verschiedenen Untereinheiten aufgebaut. Deshalb sollten die *Drosophila* CNG-Kanalgene *Dmcngb* und *Dmcng4* aus cDNA-Präparationen kloniert werden. Die heterologe Expression in HEK293-Zellen sollte zeigen, ob und welche CNG-Kanaluntereinheiten homooligomere Kanäle bilden oder ob Untereinheiten-Kombinationen exprimiert werden müssen, damit funktionelle CNG-Kanäle entstehen.

Der DmCNGA-Kanal wird durch cGMP aktiviert. *In vivo* wird cGMP von membranständigen oder löslichen Guanylatzyklasen (GC) synthetisiert. Untereinheiten einer löslichen GC sind im visuellen System von *Drosophila* exprimiert. Lösliche GCs können durch Stickoxid (NO) aktiviert werden. Ob eine Stickoxid-Synthase (NOS), die NO synthetisiert, im visuellen System exprimiert wird, sollte mit Farbreaktionen und immunhistochemisch überprüft werden.

2 Material und Methoden

2.1 Chemikalien und Enzyme

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

Enzyme und die dazugehörigen Puffer wurden von Ambion (Austin, Texas, USA), Biometra (Göttingen), Roche Diagnostics (Mannheim), GIBCO BRL (Eggenstein), New England BioLabs (NEB) (Schwalbach), Amersham Pharmacia Biotech (APB) (Freiburg), Promega (Heidelberg) und Stratagene (Heidelberg) bezogen. Das LB-Medium wurde von der Firma Sigma (Deisenhofen) 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 Kulturmedien

2.2.1 Bakterienstämme

Im Rahmen dieser Arbeit wurden folgende *Escherichia coli* (*E. coli*) K12 Bakterienstämme eingesetzt:

Der Stamm XL1-Blue (BULLOCK et al., 1987) (*recA1*, *endA1*, *gyrA96*, *thi*, *hsdR17* (rk-, mk+), *supE44*, *relA1*, λ -, *lac*, [F', *proAB*, *lacI^qZΔM15*, Tn10(tet)]) wurde zur Anreicherung von pBluescript-Derivaten verwendet.

Der Stamm *E. coli* BL21 (APB, Freiburg) (*E. coli* B F⁻, *ompT*, *hsdS* (r_B⁻, m_B⁻), *gal*, *dcm*) wurde zur Expression von pGEX-Derivaten und der Stamm M15[pREP4] (Qiagen, Hilden) zur Expression von pQE-Konstrukten eingesetzt.

2.2.2 Medien zur Anzucht von Bakterien

Bakterienkulturen wurden in Luria-Broth Medium (LB) (10 g/l Bacto-Trypton, 5 g/l Hefeextrakt, 10 g/l NaCl) bei 37°C kultiviert. LB-Agarschalen enthielten 1,5% (w/v) Agar-Agar. Kleine Flüssigkulturen (5 ml), die zur Präparation von Plasmid-DNA dienten, wurden in einem Rotationsinkubator (New Brunswick, Nürtingen), größere Kulturen (≥ 50 ml) wurden in einem Warmluftschüttler (Braun-Dissel, Melsungen) angezogen. Dem Medium wurde Ampicillin in einer Endkonzentration von 100 $\mu\text{g/ml}$ zugesetzt. Für Plasmid-Präparationen wurden Kulturen verwendet, die über Nacht (üN) bei 37°C inkubiert wurden.

2.2.3 Zelllinien

In dieser Arbeit wurden HEK293-Zellen (human embryonal kidney – Zelllinie, ECACC Nr. 85120602, UK) für die heterologe Expression von cDNA-Konstrukten verwendet. Diese Zellen sind stabil mit einem Adenovirus transformiert.

Alternativ wurde auch mit einer HEK-TSA-Zelllinie gearbeitet. Diese Zellen haben das große T-Antigen des Rous Sarcoma Virus (RSV) stabil in ihr Genom integriert. Die Zellen wurden von Prof. Chr. Fahlke (RWTH Aachen) zur Verfügung gestellt.

2.2.4 Kulturbedingungen eukaryonter Zellen

Die HEK293-Zellen wurden mit „Minimal Essential Medium“ (MEM + GLUTAMAX I, Life Technologies, Karlsruhe) kultiviert. Das Medium war zusätzlich mit 10% fötalem Rinderserum (Life Technologies), 10 ml/l Antibiotika/Antimykotika-Lösung (100x, Life Technologies) sowie 10 ml/l nichtessentiellen Aminosäuren (100x, Life Technologies) versetzt (Laborbezeichnung des kompletten Mediums: M10).

Die Anzucht der Zellen erfolgte bei 37°C, 5% CO₂ und 95%iger Luftfeuchtigkeit in sterilen Petrischalen (\varnothing 5-9 cm). Die Generationszeit der Zellen betrug etwa 24 h. Das Medium wurde zweimal wöchentlich gewechselt. Bei einer Dichte von ca. 10^7 Zellen/9 cm Schale wurden die Zellen abgelöst und in geringerer Dichte auf neuen Schalen ausgesät. Dazu wurden die Zellen mit 5 ml PBS (8 g/l NaCl, 0,2 g/l KCl, 1,15 g/l Na₂HPO₄, 0,2 g/l KH₂PO₄) gewaschen und mit 1 ml 0,05%

Trypsin/0,02% EDTA (Life Technologies) bei 37°C abgelöst. Die Zellen wurden mit 9 ml M10 Medium versetzt, in ein Greiner Röhrchen überführt und zentrifugiert (Sigma 3K12, 200 x g, 5 min, RT). Der Zelleniederschlag wurde in 10 ml M10 resuspendiert. Die Zellzahl wurde in einer Neubauer Zählkammer bestimmt. Für die Erhaltung wurden $6-12 \times 10^5$ Zellen auf 9 cm Schalen ausgesät. Für transiente Transfektionen wurden 2×10^5 Zellen auf 5 cm Schalen bzw. 9×10^5 Zellen auf 9 cm Schalen ausgesät.

2.2.5 Fliegenstämme (*Drosophila melanogaster*)

Zur Isolierung von RNA und zur Anfertigung von Gewebeschnitten für immunhistochemische Färbungen wurde der *Drosophila melanogaster* Stamm *Oregon R* (Wildtyp) verwendet. Zusätzlich wurde der weißäugige Stamm *w1118* für den immunhistochemischen Nachweis mit fluoreszenzmarkierten Sekundärantikörpern und für Diaphorase-Färbungen eingesetzt.

2.2.6 Fliegenhaltung

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

Die für die Diaphorase-Färbung (\Rightarrow 2.12) benötigten Fliegenlarven wurden in einer Flughalle innerhalb des Brutschrankes gezüchtet. Dazu wurden etwa 10.000 Fliegen in einem Plexiglaswürfel (20 x 20 x 20 cm) gehalten. Die Fliegen legten die Eier auf Fruchtsaftagarplatten (22,5 g/l Agar-Agar, 25 g/l Saccharose, 1,5 g/l Nipagin, 0,25 l Traubensaft) ab. Larven des 3. Häutungsstadiums konnten nach etwa einer Woche mit einem Pinsel von der Agarschale abgesammelt werden.

2.3 Molekularbiologische Methoden

2.3.1 Plasmide

Für Subklonierungen wurde das Plasmid pBluescript SK⁻ (pB) (SHORT et al., 1988) von Stratagene (Heidelberg) benutzt.

Die Herstellung der Fusionsproteine erfolgte mit den Vektoren pQE-60 (Qiagen, Hilden) (\Rightarrow Histidin (His)-Epitop), pGEX-2T (APB, Freiburg) (\Rightarrow Glutathion S-Transferase (GST)-Epitop) und pMal-c2X (NEB, Schwalbach) (\Rightarrow Maltose-Bindeprotein (MBP)-Epitop).

Als Expressionsvektor für die HEK293-Zellen wurde pcDNA1.1/Amp (pc) (Invitrogen, Groningen) eingesetzt.

2.3.2 DNA-Größenstandard

Als DNA-Größenstandard für Agarosegele wurde EcoRI/HindIII geschnittene λ (cl857 Sam 7)-DNA (MBI Fermentas, St. Leon-Rot) verwendet. Auf jedes Gel wurden 500 ng DNA aufgetragen. Die Fragmentgrößen und DNA-Mengen betragen: 21.226 bp (\approx 291,8 ng), 5.148 bp (\approx 70,8 ng), 4.973 bp (\approx 68,4 ng), 4.268 bp (\approx 58,7 ng), 3.530 bp (\approx 48,5 ng), 2.027 bp (\approx 27,9 ng), 1.904 bp (\approx 26,2 ng), 1.584 bp (\approx 23,5 ng), 1.375 bp (\approx 18,9 ng), 947 bp (\approx 13,0 ng), 831 bp (\approx 11,4 ng), 564 bp (\approx 7,8 ng), 124 bp (\approx 1,7 ng).

2.3.3 Synthese und Reinigung von Oligonukleotiden

Oligonukleotide für PCR-Reaktionen wurden mit einem DNA-Synthesizer (Applied Biosystems 391 DNA Synthesizer) hergestellt. Für die Abtrennung der Oligonukleotide von der Matrix wurde das Säulenmaterial in 1 ml Ammoniak überführt und \approx 1 N bei 55°C inkubiert. Der Ammoniak wurde abgedampft. Die „trockenen“ Oligonukleotide wurden bei RT gelagert. Bevor die Oligonukleotide für PCR-Reaktionen verwendet werden konnten, wurden sie in H₂O resuspendiert und mit Ethanol gefällt. Die Lagerung erfolgte bei -20°C. Die Sequenzen der in dieser Arbeit verwendeten Oligonukleotide sind im Anhang (\Rightarrow Tab. A3) aufgeführt.

2.3.4 Quantifizierung von Nukleinsäuren

2.3.4.1 Photometrische Bestimmung

Für die photometrische Bestimmung (Ultrospec 3000, APB, Freiburg) 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.

2.3.4.2 Ethidiumbromid-Fluoreszenz

Für die Konzentrationsabschätzung mit Hilfe der Ethidiumbromid-Fluoreszenz wurde die DNA-Lösung und ein DNA-Standard bekannter Konzentration (0,5 µg/10 µl) in einem 0,75%igen Agarosegel (\Rightarrow 2.3.7.2) in Gegenwart von Ethidiumbromid (Endkonzentration 1 µg/ml) aufgetrennt. Ein Vergleich der Fluoreszenz-Intensitäten der Banden unter UV-Licht (302 nm) erlaubte eine Konzentrationsabschätzung.

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

2.3.5.1 Mini-Präparation

Plasmid-Präparationen wurden durch alkalische Lyse nach der Methode von BIRNBOIM & DOLY (1979) durchgeführt. Die zentrifugierten Bakterienzellen aus 1,5 ml Kulturvolumen wurden in 100 µl Lösung I (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 Kalium-Acetat, 11,5% Essigsäure (v/v), mit HCl auf pH 4,8 eingestellt) gefällt. Nach einer Zentrifugation (Sigma 2K15, 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 absolutem Ethanol gefällt. Die Nukleinsäuren wurden mit 70%igem Ethanol gewaschen, getrocknet und in 20 µl TE-Puffer (10 mM Tris/HCl pH 7,4, 1 mM EDTA) resuspendiert.

2.3.5.2 Midi-Präparation

Bakterienzellen aus 50 ml Kulturvolumen wurden zentrifugiert (Sigma 3K12, 5.000 x g, 10 min, 4°C). Der Niederschlag wurde in 4 ml Lösung I (⇒ 2.3.5.1) resuspendiert und mit 8 ml Lösung II lysiert. SDS, Proteine sowie bakterielle DNA wurden mit 8 ml Lösung III gefällt. Nach einer Zentrifugation (Sigma 3K12, 5.000 x g, 10 min, 4°C) wurde der Überstand filtriert und mit 25 ml Isopropanol versetzt. Die gefällten Nukleinsäuren wurden durch Zentrifugation präzipitiert (Sigma 3K12, 5.000 x g, 10 min, 4°C). Der Niederschlag 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 (Sigma 3K12, 5.000 x g, 10 min, 4°C) wurde der Überstand mit 10 ml absolutem Ethanol versetzt. Die Nukleinsäuren wurden zentrifugiert (Sigma 3K12, 5.000 x g, 10 min, 4°C), kurz im Heizblock getrocknet und anschließend in 300 µl TE-Puffer (10 mM Tris/HCl pH 7,4, 1 mM EDTA) resuspendiert. Die verbliebene RNA wurde durch Zugabe von 2,5 µl RNase-Cocktail (Ambion, Austin, USA) 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 30 µl 3 M LiCl und 900 µl Ethanol versetzt und die DNA durch Zentrifugation präzipitiert (Sigma 2K15, 18.000 x g, 5 min, RT). Der Niederschlag wurde mit 200 µl 70%igem Ethanol gewaschen, getrocknet und in 200 µl TE-Puffer resuspendiert.

2.3.6 Modifizierung von DNA-Fragmenten

2.3.6.1 Glätten überhängender Einzelstrang-Enden

Mit dem Klenow-Fragment der *E. coli* DNA-Polymerase I wurden überhängende 5'-Enden aufgefüllt (5'-3'-Polymeraseaktivität). Aufgrund der 3'-5'-Exonukleaseaktivität des Enzyms wurden überhängende 3'-Enden abgeschnitten. Ein Reaktionsansatz enthielt 2 U Klenow-Enzym/µg DNA im vom Hersteller empfohlenen Inkubationspuffer und 200 µmol dNTPs. Es wurde 30 min bei 37°C inkubiert und anschließend das Enzym 10 min bei 68°C inaktiviert.

2.3.6.2 Phosphorylierung der 5'-Enden von DNA-Fragmenten

PCR-Fragmente besitzen keine endständigen 5'-Phosphatreste und mussten, bevor sie zur Ligation eingesetzt werden konnten, mit T4-Polynukleotidkinase (PNK) phosphoryliert werden. Die PNK katalysiert die Übertragung der endständigen Phosphatgruppe des ATP an das 5'-Ende eines DNA-Fragments. Die DNA-Fragmente wurden mit 5-10 U PNK (Roche Diagnostics, Mannheim) in dem mitgelieferten Puffer und 1 mM ATP 30 min bei 37°C inkubiert. Nach einer Inaktivierung der Kinase (15 min, 65°C) wurden die Fragmente gelelektrophoretisch aufgetrennt, aus dem Gel eluiert und für die Ligation verwendet.

2.3.6.3 Dephosphorylierung von Plasmidvektoren

Zur Vermeidung von Religationen wurden nach der Restriktion der Plasmide die endständigen 5'-Phosphatgruppen mit alkalischer Phosphatase (Roche Diagnostics, Mannheim) entfernt. Die Plasmid-DNA wurde mit 1 U des Enzyms in dem mitgelieferten Puffer für 1 h bei 37°C inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 1/10 Volumen EGTA (250 mM) und 20 minütiger Inkubation bei 65°C inaktiviert. Der Inkubationsansatz wurde mit Phenol/Chloroform extrahiert und die DNA durch Zugabe von absolutem Ethanol ausgefällt oder gelelektrophoretisch aufgetrennt und aus dem Gel eluiert.

2.3.7 Analyse von DNA

2.3.7.1 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 (⇒ 2.3.7.2) aufgetrennt oder mit Phenol/Chloroform (1:1) und Chloroform extrahiert und anschließend mit Ethanol gefällt.

2.3.7.2 Agarose-Gelelektrophorese

Zur Auftrennung von DNA-Fragmenten wurden horizontale Agarosegele benutzt. Die Konzentration der Agarose variierte zwischen 0,5% (Auftrennung von Fragmenten >5.000 bp) und 2% (Auftrennung von Fragmenten <500 bp). Die Ethidiumbromid-Konzentration betrug sowohl im Gel als auch im Laufpuffer 1 µg/ml. Vor dem Auftragen wurden die Proben mit 1/5 Volumen Probenpuffer (100 mM EDTA, 20% (w/v) Ficoll400, 0,001% (w/v) Bromphenolblau, 0,001% (w/v) Xylencyanol) versetzt. Die Elektrophorese wurde bei 60 bis 100 V durchgeführt. Als Puffersystem diente 1x TBE (121,1 g/l TrisBase, 61,8 g/l Borsäure, 7,4 g/l EDTA).

2.3.8 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 Glaswolle verschlossen. Das Agarosestück, das das gewünschte DNA-Fragment enthielt, wurde auf die Glaswolle gelegt. Das Reaktionsgefäß wurde in ein zweites Gefäß gesetzt und zentrifugiert (Eppendorf Zentrifuge 5415 C, 7000 U/min, 4 min, RT). Das Eluat enthielt das DNA-Fragment.

2.3.9 Klonierung von DNA-Fragmenten

2.3.9.1 Herstellung kompetenter Zellen

50 ml LB-Medium wurde mit einer Bakterienkultur angeimpft und bis zu einer OD_{600} von 0,4 bei 37°C inkubiert. Die Zellen wurden 10 min auf Eis abgekühlt und zentrifugiert (Sigma 3K12, 5.000 x g, 10 min, 4°C). Der Zellniederschlag wurde in 25 ml 100 mM $CaCl_2$ resuspendiert und 20 min auf Eis inkubiert. Nach erneuter Zentrifugation wurden die Zellen in 5 ml kaltem 100 mM $CaCl_2$ /30% Glycerin resuspendiert und 2 bis 4 h auf Eis inkubiert. Die Zellen wurden aliquotiert und bei -80°C gelagert.

2.3.9.2 Ligation von DNA-Fragmenten

Für Ligationen wurden die zu ligierenden Fragmente in einem molaren Verhältnis von 3:1 bis 10:1 (Insert zu Vektorfragment) eingesetzt. Der Reaktionsansatz wurde mit T4-DNA-Ligase (1 U/ μ l) in dem vom Hersteller (Roche Diagnostics, Mannheim) gelieferten Inkubationspuffer und 0,1 mM ATP (Endkonzentration) für 2-3 h bei RT oder \bar{u} N bei 16°C inkubiert.

2.3.9.3 Transformation von *E. coli* Zellen

Der Ligationsansatz wurde zu 100 μ l kompetenten Zellen gegeben und 20 min auf Eis inkubiert. Nach Hitzeschockbehandlung für 90 s bei 42°C wurden die Zellen auf LB-Agarplatten (LB-Medium mit 1,5% (w/v) Agar), die das benötigte Antibiotikum enthielten, ausplattiert und \bar{u} N bei 37°C bebrütet.

Für Retransformationen von Plasmiden wurde eine Pipettenspitze in die Plasmid-Lösung getaucht und mit den kompetenten Zellen gemischt. Der Ansatz wurde für 20 min auf Eis inkubiert, hitzebehandelt und ausplattiert (s.o.).

2.3.10 Amplifizierung von DNA durch Polymerase-Ketten Reaktion (PCR)

Die Polymerase-Ketten Reaktion (PCR) (MULLIS et al., 1986) wurde in Geräten von Perkin Elmer (DNA Thermal Cycler) oder Biometra (TRIO-Thermoblock) durchgeführt. Die für die PCR eingesetzten Oligonukleotide werden als Primer bezeichnet. Ein Standard-Ansatz (100 μ l) hatte folgende Zusammensetzung (Endkonzentrationen):

Plasmid-DNA: 20 ng
Primer: 10 ng/Base x μ l (d.h. 200 - 400 ng/ μ l)
1x PCR-Puffer (Roche Diagnostics, Mannheim)
0,2 mM dNTP's
1 mM MgCl₂
2 U Taq-DNA Polymerase (Roche Diagnostics, Mannheim)

Die Amplifikation der DNA erfolgte mit 20-45 Zyklen.

Reaktionsbedingungen:

1. Denaturierung: 94°C, 3 min

Denaturierung: 94°C, 45 s

Hybridisierung: Niedrigere Schmelztemperatur (T_m)*
der beiden Primer minus 2°C, 45 s

Polymerisation: 72°C, 45 s

1 Zyklus

25 - 40

Zyklen

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

Für spezielle Amplifikationen wurde die Primerkonzentration erhöht bzw. die Reaktionszeiten verlängert. 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 eingefügt wurde.

2.3.11 Nichtradioaktive Sequenzierung

Die Sequenzierung wurde nach der Didesoxy-Kettenabbruchmethode (SANGER et al., 1977) durchgeführt. Die Proben wurden in einer PCR-Reaktion mit IRD800-Fluorophor-markierten Oligonukleotiden und Didesoxynukleotiden synthetisiert. Die Fragmente wurden auf denaturierenden Polyacrylamid-Gelen im „LICOR DNA Sequencer Long ReadIR 4200“ (MWG-Biotech, Ebersberg) aufgetrennt.

Sequenzierreaktion

Für die PCR-Reaktion wurde das „Thermo Sequenase DYEnamic Direct sequencing“-Kit von APB (Freiburg) nach Angaben des Herstellers verwendet. Pro Reaktion wurden 0,5 µg bis maximal 2 µg DNA eingesetzt, 1,6 pmol IRD800-Fluorophor-markierter Primer zugegeben und der Ansatz mit Wasser auf ein Endvolumen von 7 µl aufgefüllt. Je 1,5 µl dieses Ansatzes wurde auf vier PCR-Reaktionsgefäße verteilt, in die je 1 µl Terminationsmische (1:1 mit Wasser verdünnt) vorgelegt waren. Die Ansätze wurden mit 20 µl „Chill-out Wax/14“ (Biozym Diagnostik, Hess. Oldendorf) überschichtet und die PCR gestartet.

PCR-Bedingungen

Die Sequenzierreaktionen wurden wie folgt durchgeführt:

1. Denaturierung: 94°C, 3 min	1 Zyklus
Denaturierung: 94°C, 40 s	} 35 Zyklen
Hybridisierung: $T_m - 2^\circ\text{C}$ (je nach verwendetem Primer), 40 s	
Polymerisation: 70°C, 1 min	

Nach der Reaktion wurden die Ansätze mit 3 μl Stopppuffer (Stopppuffer des Kits) versetzt und für 2 min auf 70°C erhitzt. Die Proben wurden auf ein denaturierendes Sequenziergel aufgetragen.

Denaturierende Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die Sequenziergellösung (21 g Harnstoff, 30,5 ml H_2O , 0,5 ml DMSO, 5 ml 10x TBE, 5,6 ml Acrylamid (Rapid Gel XL 40% von USB, Bad Homburg)) wurde frisch angesetzt, im Ultraschallbad entgast und durch einen Sterilfilter filtriert. Unmittelbar vor dem Gießen wurden 50 μl TEMED und 350 μl 10%iges Ammoniumperoxodisulfat (APS) als Radikalstarter zugegeben.

Als Laufpuffer wurde 1x TBE (134 mM Tris, 45 mM Borsäure, 2,5 mM EDTA) verwendet. Nach einem Vorlauf von 45-60 min wurden jeweils 1,5 μl der PCR-Ansätze aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte $\ddot{u}\text{N}$ mit 2.200 V, 40 mA, 45 W bei 45°C. Durchschnittlich konnten 800-1.000 bp pro Gellauf gelesen werden.

Zur Auswertung der Sequenzreaktionen wurde die Software des Geräteherstellers benutzt. Die Datensätze wurden mit den Programmen *PCGene* und *PCSupp* (Dr. W. Bönigk, IBI 1, Forschungszentrum Jülich) formatiert und bearbeitet.

2.4 Herstellung gewebespezifischer *Drosophila* cDNA

2.4.1 Präparation von Gesamt-RNA aus *Drosophila melanogaster* Geweben

Die RNA aus Köpfen adulter Fliegen wurde mit der LiCl/Harnstoff-Methode isoliert. Etwa 1 g Gewebe wurde in 7 ml Lösung I (5 M Harnstoff, 3 M LiCl) mit einem Ultra-Turrax homogenisiert und anschließend zentrifugiert (Sigma 3K12, 5.000 x g, 15 min, 4°C). Der Überstand wurde in SW28.1 Zentrifugenröhrchen überführt. Nach einer Inkubation von mindestens 4 h bei 4°C wurde die RNA zentrifugiert (Beckman L7 Ultrazentrifuge, SW28, 18.000 x g, 10 min, 4°C) und der Niederschlag 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.

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

Die Anreicherung polyadenylierter RNA erfolgte affinitätschromatographisch (OligotexTM Qiagen, Hilden) nach den Angaben des Herstellers. Die Ausbeute wurde photometrisch bestimmt (⇒ 2.3.4.1). Die poly(A)⁺-RNA wurde mit Ethanol gefällt und bei -20°C gelagert.

2.4.3 Synthese von Erst- und Zweitstrang-cDNA

Für die Durchführung von PCR-Reaktionen musste die poly(A)⁺-RNA in cDNA umgeschrieben werden. Das Reaktionsvolumen betrug 50 µl. Ein Annealing-Ansatz (2,5 µg poly(A)⁺-RNA und Primer (random- oder oligo-dT-Primer)) wurde 10 min bei 70°C inkubiert, direkt auf Eis abgekühlt und kurz zentrifugiert, bevor die weiteren Komponenten zugefügt wurden:

10 µl cDNA Synthese-Puffer (5x)

2,5 µl dNTP's (10 mM)

5 µl DTT (Dithiothreitol) (0,1 M)

1 µl M-MLV Reverse Transkriptase (200 U/µl)

Die cDNA-Synthese erfolgte für 2 h bei 37°C. Nach einer gelelektrophoretischen Kontrolle der Reaktion wurde die Zweitstrangsynthese durchgeführt. Dazu wurde der Reaktionsansatz wie folgt erweitert:

- 50 µl Erststrang-cDNA
- 7,5 µl dNTP's (10 mM)
- 40 µl Zweitstrangsynthesepuffer (10x)
- 10 µl *E. coli* DNA Polymerase I (10 U/µl)
- 1,75 µl *E. coli* RNase H (2 U/µl)
- 1,25 µl *E. coli* DNA Ligase (10 U/µl)

Die Synthese erfolgte für 2 h bei 16°C. Zum Glätten der cDNA-Enden wurde T4 DNA Polymerase (6 U) zugegeben und für weitere 5 min bei 16°C inkubiert. Anschließend wurde die cDNA zweimal mit Phenol/Chloroform (1:1) und zweimal mit Chloroform extrahiert und mit Ethanol gefällt.

2.5 Durchmustern einer *Drosophila* cDNA-Bibliothek

2.5.1 Genbibliothek

Eine cDNA-Bibliothek war aus poly(A)⁺-RNA von Fliegenköpfen des *Drosophila melanogaster* Wildtyp-Stammes *Berlin* hergestellt und von Prof. E. Buchner (Universität Würzburg) zur Verfügung gestellt worden.

2.5.2 Herstellung von „Mg²⁺-Zellen“ zur Infektion mit λ-Phagen

Für die Herstellung von „Mg²⁺-Zellen“ wurden 50 ml LB-Medium, das 0,2% (w/v) Maltose und 10 mM MgSO₄ enthielt, mit einer Einzelkolonie des Bakterienstammes *E. coli* Y1090 angeimpft und für 6-8 h im Warmluftschüttler bei 37°C (185 U/min) inkubiert. Die OD₅₆₀ der Suspension wurde bestimmt und die Zellen zentrifugiert (Sigma 3K12, 5.000 x g, 5 min, 4°C). Die Bakterien wurden in einer 10 mM MgSO₄-Lösung resuspendiert (10 OD₅₆₀/ml).

2.5.3 Titerbestimmung einer λ -Phagen-cDNA-Bibliothek

Es wurden verschiedene Verdünnungen einer Phagensuspension in SM⁺-Puffer (10 mM Tris/HCl pH 7,5, 100 mM NaCl, 10 mM CaCl₂, 10 mM MgSO₄, 0,01% Gelatine) hergestellt. Jeweils 1 μ l der Verdünnung wurde mit 50 μ l „Mg²⁺-Zellen“ (\Rightarrow 2.5.2) für 15 min bei 37°C inkubiert. Die Suspensionen wurden mit 3,5 ml auf 48°C vorgewärmtem NZY-Topagar (NZY-Medium: 10 g/l NZ-Amine, 5g/l Hefeextrakt, 5 g/l NaCl, 2 g/l MgSO₄ x 7 H₂O; für Top-Agar zusätzlich: 0,7% (w/v) Agarose) gemischt und auf NZY-Agarplatten (NZY-Medium mit 1,5% (w/v) Agar) ausgebracht. Die Platten wurden bei 37°C bis zur Lyse der Bakterien inkubiert (9-14 h). Die Plaques wurden ausgezählt und der Titer der Phagensuspension bestimmt.

2.5.4 Transfer und Immobilisierung von λ -Phagen-DNA

Die Herstellung von Filterabzügen der cDNA-Bibliothek auf Nylonmembranen erfolgte in Anlehnung an BENTON & DAVIS (1977). Auf die abgekühlte NZY-Agarplatte wurde die Nylonmembran luftblasenfrei aufgelegt. Die Orientierung der Filter wurde durch Einstiche mit einer heißen Kanüle in den Agar markiert.

Die auf das Filter übertragenen λ -Phagen 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 Nukleinsäuren wurden durch UV-Quervernetzung (254 nm, 0,12 J/cm², Stratalinker, Stratagene) immobilisiert.

2.5.5 Radioaktive Markierung von DNA-Sonden

DNA-Fragmente, die als Sonde für Hybridisierungen eingesetzt werden sollten, wurden radioaktiv mit der "random priming" Methode (FEINBERG & VOGELSTEIN, 1983) markiert. Es wurde das "Megaprime DNA Labeling Kit" (APB, Freiburg) benutzt. Die Reaktionen wurden nach den Angaben des Herstellers durchgeführt. Als Radionuklid wurde α [³²P]dCTP (spezifische Aktivität > 6.000 Ci/mmol) benutzt. Nicht eingebaute Nukleotide wurden durch eine Gelfiltration mit Sephadex G75 (APB, Freiburg) abgetrennt. Ein Teil der Probe wurde zur Bestimmung der Markierungseffizienz in einem Szintillationszähler (Tricarb 2000 CA, United Technologies Packart)

gemessen. Vor der Hybridisierung wurde die Sonde für 5 min bei 95°C im Heizblock denaturiert.

2.5.6 Hybridisierung von immobilisierter DNA mit DNA-Sonden und Autoradiographie

Die Inkubationen wurden in einem Hybridisierungssofen (Biometra APT Line) in Spezialflaschen durchgeführt. Vor der Hybridisierung wurden die Membranen mit Wasser benetzt, in die Glasflaschen überführt und für 2 h vorhybridisiert (5x SET¹⁾, 5x Denhardt's Lösung²⁾, 0,1% SDS, 0,1 mg/ml denaturierte Heringssperma-DNA). Die Hybridisierungs- und Waschbedingungen sowie die verwendeten Puffer sind in der nachfolgenden Tabelle zusammengefasst (Tab. 1). Es wurde mit hoher Stringenz (62°C) hybridisiert.

Tabelle 1: Zusammensetzung der Hybridisierungs- und der Waschlösung

	Hybridisierungslösung	Waschlösung
SET ¹⁾	5 x	1 x
Denhardt's ²⁾	5 x	-
SDS	0,1%	0,1%
ssDNA	100 µg/ml	-
Sonde	1 x 10 ⁶ cpm/ml	-
Temperatur	62°C	62°C
Zeit	2-16 h	2 x 30 min

¹⁾ 1x SET: 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 20 mM Tris/HCl pH 7,4

²⁾ 100x Denhardt's Lösung: je 2% (w/v) BSA, Ficoll 400, und Polyvinylpyrrolidon

Spezifische Hybride, die aus Nukleinsäuren und radioaktiv markierten DNA-Sonden bestanden, wurden durch Autoradiographie mit einem „XAR5“-Röntgenfilm (Kodak) unter Verwendung von Verstärkungsfolien (Cronex Hi plus, Du Pont) nachgewiesen (1-72 h bei -80°C).

2.5.7 Isolierung von λ -Phagen und Präparation von λ -Phagen-DNA aus (kleinen) Lysaten

Nach der Autoradiographie wurden die Signale auf dem Röntgenfilm den λ -Phagen-Plaques auf den Agarplatten zugeordnet. Die entsprechenden Regionen wurden mit Pasteurpipetten ausgestochen und in 500 μ l SM⁺-Puffer eluiert. Zur Vereinzelnung („Feinscreen“) wurden die eluierten Phagen erneut ausplattiert.

Die Präparation der λ -Phagen-DNA erfolgte nach SANTOS (1991). 50 μ l „Mg²⁺-Zellen“ wurden mit 2-5 μ l des Phageneluats versetzt. Der Ansatz wurde 15 min bei 37°C inkubiert, anschließend in 5 ml NZY-Medium (\Rightarrow 2.5.3) überführt und bis zur Lyse der Bakterien (etwa 6 h) im Rotationsinkubator bei 37°C inkubiert. Das Phagenlysat wurde mit 2 μ l DNaseI (1 mg/ml) und 2 μ l RNase-Cocktail (Ambion, Austin, USA) 20 min bei 37°C inkubiert. Nach Zugabe von 100 μ l 2 M ZnCl₂-Lösung wurde die Inkubation für weitere 5 min bei 37°C fortgesetzt. Die Lösung wurde zentrifugiert (Sigma 3K12, 5.000 x g, 10 min, 4°C). Der Niederschlag wurde in 500 μ l TES-Puffer (0,1 M Tris/HCl pH 8,0, 0,1 M EDTA pH 8,0, 0,3% (w/v) SDS) resuspendiert und 15 min bei 60°C inkubiert. Nach Zugabe von 60 μ l 3 M KAc (pH 4,8) erfolgte eine 5 min Zentrifugation (Sigma 2K15, 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 2,5fachen Volumen Ethanol versetzt. Die Nukleinsäuren wurden abzentrifugiert (Sigma 2K15, 18.000 x g, 5 min, 4°C), einmal mit 70% Ethanol gewaschen und in 50-100 μ l TE-Puffer (10 mM Tris/HCl pH 7,4, 1 mM EDTA) aufgenommen.

2.6 Heterologe Expression und Affinitätschromatographie

2.6.1 Transiente Transfektion von HEK293-Zellen

Die Transfektionsrate der HEK293-Zellen ist u.a. von der eingesetzten DNA-Menge abhängig. Deshalb wurden verschiedene DNA-Mengen (1–15 μ g) jedes Konstrukts zur Transfektion eingesetzt und die Transfektionsrate immunzytochemisch bestimmt. Die DNA-Menge, die die größte Anzahl gefärbter Zellen ergab, wurde dann für alle nachfolgenden Transfektionen verwendet.

Die Transfektion der HEK293-Zellen erfolgte mit der Calcium-Phosphat-Methode (CHEN & OKAYAMA, 1987). Für eine 5 cm Schale wurde die DNA mit H₂O auf 124 µl aufgefüllt, mit 41 µl 1 M CaCl₂ versetzt und nach der Zugabe von 165 µl 2x BBS (50 mM BES, pH 6,95, 280 mM NaCl, 1,5 mM Na₂HPO₄) für 20 min bei RT inkubiert. Für Transfektionsansätze in 9 cm Schalen wurde das Volumen verdreifacht. Die Ansätze wurden tropfenweise zu den Zellen gegeben und für 20-22 h im Brutschrank (Heraeus Instruments BB 6060) bei 35°C, 3% CO₂ und 95% Luftfeuchtigkeit inkubiert. Das Calcium-Phosphat-DNA-Präzipitat wurde lichtmikroskopisch ausgewertet (Zeiss Mikroskop ID 03) und durch Waschen mit 5 ml 1x PBS sowie 1 ml 1x PBS/EDTA (2 g EDTA/Liter PBS, pH 7,3) entfernt. Die Zellen wurden mit frischem M10 Medium (5 ml) versetzt und für weitere 24 h bei 37°C, 5% CO₂ und 95% Luftfeuchtigkeit inkubiert. Für immunzytochemische Nachweise wurden die Zellen nach dem Entfernen des Präzipitats mit 300 µl Trypsin (0,05% Trypsin, 0,2 g/l EDTA) bei 37°C abgelöst, mit frischem Medium (M10) versetzt und in „Multiwell-Platten“ ausplattiert. Alternativ wurden die Zellen für immunzytochemische Nachweise mit fluoreszenzmarkierten Antikörpern auf Poly-L-Lysin (0,1 mg/ml) beschichteten Glasplättchen ausgesät. Die Syntheserate der heterolog exprimierten Gene wurde durch Zugabe von Butyrat (Endkonzentration 3 mM) gesteigert.

2.6.2 Expression und Reinigung von Fusionsproteinen

Für die Herstellung und Reinigung polyklonaler Antikörper wurden bakteriell exprimierte Fusionsproteine verwendet. Als „bakterieller“ Fusionsanteil wurde die Glutathion S-Transferase (GST) bzw. das Maltose-Bindeprotein (MBP) benutzt. Zusätzlich wurde ein Konstrukt hergestellt, das hinter den 101 C-terminalen Aminosäuren der CNG-Kanaluntereinheit ein (Histidin)₆-Epitop (His-Tag) exprimiert.

Die Expression der GST-Fusionsproteine erfolgte in LB-Medium (⇒ 2.2.2) mit 100 µg/ml Ampicillin. Fusionsproteine mit MBP-Anteil wurden in LB-Medium (⇒ 2.2.2) mit 0,2% Glucose und 100 µg/ml Ampicillin exprimiert. Konstrukte, die am C-Terminus ein His-Tag trugen, wurden in YT-Medium (8 g/l Trypton, 5 g/l Hefeextrakt, 2,5 g/l NaCl) mit 100 µg/ml Ampicillin exprimiert.

250 ml Medium wurden mit einer Vorkultur beimpft und bei 37°C bis zu einer $OD_{600} \approx 0,4$ gezüchtet. Durch die Zugabe von Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid (IPTG; Endkonzentration 0,5 mM) wurde die Expression der Fusionsproteine gestartet. Etwa 3 h nach der IPTG-Zugabe wurden die Zellen geerntet (Zentrifugation: Beckman J2-21, 3.000 x g, 10 min, 4°C).

Der Bakterienniederschlag wurde in PBS mit 0,5 mg/ml Pefabloc SC (Roche Diagnostics, Mannheim) resuspendiert. Die Zellen wurden mit 0,1 mg/ml Lysozym (Merck, Darmstadt) für 30 min auf Eis inkubiert und anschließend sonifiziert (Sonifier B-12, Branson, 6x 30 s, etwa 90 W, 4°C).

Unlösliche Bestandteile wurden durch einen Zentrifugationsschritt (Sigma 3K12, 15.000 x g, 10 min, 4°C) abgetrennt. Der Überstand wurde für die Affinitätschromatographie verwendet oder über ein präparatives PAA/SDS-Gel gereinigt.

2.6.2.1 Glutathion S-Transferase (GST)-Fusionsproteine

GST-Fusionsproteine wurden aus präparativen PAA/SDS-Gelen (\Rightarrow 2.10.2) eluiert. Dazu wurde das Lysat (\Rightarrow 2.6.2) gelelektrophoretisch aufgetrennt und die Proteine durch Anfärbung mit 3 M Kupfersulfat ($CuSO_4$) sichtbar gemacht. Das GST-Fusionsprotein wurde ausgeschnitten und μ N bei 4°C gegen 0,5 M Ammoniumhydrogencarbonat ($(NH_4)HCO_3$) in PBS) dialysiert. Die isolierten Proteine waren ausreichend rein und wurden zur Herstellung von Affinitätsmatrizes (\Rightarrow 2.7.2) und für Western-Blots (\Rightarrow 2.10) verwendet.

2.6.2.2 Reinigung von Maltose-Bindeprotein (MBP)-Fusionsproteinen

Das Maltose-Bindeprotein (MBP) bindet an die Maltosereste einer Amylose-Affinitätsmatrix. Lösliche MBP-Fusionsproteine können daher affinitätschromatographisch über eine Amylose-Säule gereinigt werden (KELLERMANN & FERENCI, 1982). Als Säulenmaterial wurden 3 ml Amylose-Agarose (NEB, Schwalbach) benutzt. Der Überstand des Bakterienlysates (\Rightarrow 2.6.2) wurde 1:1 mit Säulenpuffer (200 mM NaCl, 20 mM Tris/HCl pH 7,4, 10 mM β -Mercaptoethanol, 1 mM EDTA) verdünnt und auf die Säule (Biorad, München) aufgetragen. Unspezifisch gebundene Proteine wurden durch Waschen mit 10 Säulenvolumen

des Säulenpuffers entfernt. Die spezifisch gebundenen Fusionsproteine wurden mit 5 ml 20 mM Maltose (im Säulenpuffer) eluiert. Die Qualität der Reinigung wurde gelelektrophoretisch überprüft. Das Fusionsprotein wurde zur Immunisierung von Kaninchen (\Rightarrow 2.7.1) verwendet.

2.6.2.3 Affinitätschromatographische Reinigung von Histidin-Tag-Fusionsproteinen

Fusionsproteine, die ein Epitop mit sechs Histidinen (His-Tag) tragen, binden an Nickel-Nitrilotriessigsäure Matrizes (Ni-NTA). Lösliche His-Tag-Fusionsproteine können deshalb ebenfalls affinitätschromatographisch gereinigt werden (CROWE et al., 1994).

Die Ni-NTA Agarose (Qiagen, Hilden) (1 ml Bettvolumen) wurde in Sonifizierungspuffer (50 mM Tris/HCl pH 8, 300 mM NaCl) äquilibriert. Der Überstand des Bakterienlysats wurde unverdünnt aufgetragen und die Säule zweimal mit 10 ml Sonifizierungspuffer gewaschen. Die Elution der gebundenen Fusionsproteine erfolgte schrittweise (jeweils 1 ml) durch eine ansteigende Imidazolkonzentration (0,1 bis 1 M). Die eluierten Proteine wurden zur Herstellung von Affinitätsmatrizes bzw. für Western-Blots (\Rightarrow 2.10) verwendet.

2.7 Herstellung und Reinigung polyklonaler Antikörper

2.7.1 Immunisierung von Kaninchen

Polyklonale Antikörper gegen die CNG-Kanaluntereinheit wurden durch Injektion von gereinigten His-Tag-Fusionsproteinen bzw. von gereinigten MBP-Fusionsproteinen in Kaninchen (Rasse: Weißer Neuseeländer) hergestellt.

Zur Immunisierung wurden jeweils 500 μ g Fusionsprotein verwendet. Die Proteinlösung wurde mit PBS auf 1 ml aufgefüllt, mit Adjuvans (ABM-3 komplett; PAN Biotech, Aidenbach) gemischt und im Abstand von 3 Wochen den Tieren subkutan gespritzt. Die Immunantwort der Kaninchen wurde im Abstand von 3 Wochen getestet. Das Serum der getöteten Tiere wurde durch eine Zentrifugation

(Sigma 3K12, 3.000 x g, 30 min, 4°C) vom Blutkuchen getrennt und bei -80°C gelagert.

2.7.2 Affinitätschromatographische Reinigung polyklonaler Antikörper

Für die Reinigung der spezifischen Antikörper aus dem Serum wurden Affinitätsmatrizes (KENT, 1994) hergestellt. An das Säulenmaterial (CNBr-aktivierte Sepharose; APB, Freiburg) wurden Fusionsproteine gekoppelt, die den gleichen zur Immunisierung verwendeten CNG-Kanalbereich besaßen, sich im bakteriellen Abschnitt jedoch unterschieden. His-Tag-CNG-Seren wurden über eine GST-CNG-Matrix und MBP-CNG-Seren wurden über eine His-Tag-CNG-Matrix gereinigt.

Es wurden 0,6 g Säulenmaterial (s.o.) in 1 mM HCl für 15 min auf Eis aufgeschwemmt. Das Säulenmaterial wurde auf einer Fritte abgenutscht und mit 200 ml kalter 1 mM HCl in eine Leersäule (Biorad, München) überführt. Die Säule wurde mit 10 ml Kopplungspuffer (100 mM NaHCO₃ pH 8,3, 0,5 M NaCl) äquilibriert und anschließend mit dem Fusionsprotein (üN, 4°C dialysiert gegen Kopplungspuffer; beim GST-Fusionsprotein zusätzlich mit 0,5% (w/v) SDS) für 2-3 h bei RT unter Schütteln gekoppelt. Es wurde einmal mit Kopplungspuffer gewaschen bevor unbesetzte, aktive Gruppen der Matrix blockiert wurden (Blockierlösung: 100 mM Tris/HCl pH 8, 1 h, RT).

Durch viermaliges Waschen mit 100 mM Tris/HCl pH 8, 0,5 M NaCl und 100 mM Na-Acetat pH 4, 0,5 M NaCl wurden nicht kovalent-gekoppelte Fusionsproteine entfernt. Abschließend wurde die Säulenmatrix mit der Blockierlösung äquilibriert. Vor dem Auftragen des polyklonalen Serums wurde die Antigensäule mit jeweils 10 Säulenvolumen der nachfolgenden Puffer äquilibriert:

10 mM Tris/HCl pH 7,5

100 mM Glycin pH 2,5

10 mM Tris/HCl pH 8,8

10 mM Tris/HCl pH 7,5

Zur Reinigung wurde 1 ml Serum (1:10 verdünnt in 10 mM Tris/HCl pH 7,5) dreimal über die Säule gegeben. Es wurde mit jeweils 20 Säulenvolumen 10 mM Tris/HCl pH 7,5 und 10 mM Tris/HCl pH 7,5, 0,5 M NaCl gewaschen. Die Elution der Antikörper erfolgte mit 10 Säulenvolumen Glycin (100 mM pH 2,5). Die sauren Eluate wurden mit 1 M Tris/HCl pH 8 neutralisiert und über Centricon30 (Millipore, Eschborn) eingeeengt. Die gereinigten Antikörper wurden in 0,1 mg/ml BSA, 0,01% NaN₃, 50% Glycerin, 50 mM NaCl bei -80°C gelagert.

2.8 Isolierung von Membranproteinen und Konzentrationsbestimmungen

2.8.1 Isolierung von Membranproteinen aus HEK293-Zellen

Für Western-Blot Analysen wurden Membranproteine aus zuvor transient transfizierten HEK293-Zellen isoliert. Das Kulturmedium wurde abgenommen und die Zellen zweimal mit sterilem PBS gewaschen. Die adhärent wachsenden Zellen wurden mit einem Zellschaber von der Kulturschale abgelöst und zentrifugiert (Eppendorf Zentrifuge 5415 C, 2.000 U/min, 5 min, RT). Der Niederschlag wurde in 0,5 ml (9 cm Schale) bzw. 0,2 ml (5 cm Schale) Puffer A (10 mM NaCl, 2 mM EDTA, 25 mM HEPES pH 7,5, 0,5 mg/ml Pefabloc SC) aufgenommen, mit einem Pistill homogenisiert und zur Lyse der Zellen für 10 min auf Eis inkubiert.

Nach erneuter Zentrifugation (Sigma 2K15, 18.000 x g, 30 min, 4°C) wurde der Niederschlag in 0,1 ml (9 cm Schale) bzw. 0,03 ml (5 cm Schale) Puffer B (200 mM NaCl, 50 mM HEPES pH 7,5, 0,5 mg/ml Pefabloc SC) vollständig resuspendiert. Tropfenweise wurde das gleiche Volumen einer 2%igen CHAPS-Lösung zugegeben. Die Membranproteine wurden 10 min auf Eis solubilisiert und die entstandenen Micellen zentrifugiert (Sigma 2K15, 8.000 x g, 10 min, 4°C). Der Überstand enthielt die solubilisierten Membranproteine.

2.8.2 Präparation von Membranproteinen aus nativem *Drosophila* Gewebe

Proteinextrakte aus nativem Fliegengewebe wurden für Western-Blot Analysen, mit kleinen Änderungen, nach der Methode von SHAH & HYDE (1995) präpariert. 50 Köpfe und 50 Körper adulter Fliegen wurden präpariert und eingefroren (-80°C).

Die Proben wurden in Extraktionspuffer (60 mM Tris/HCl pH 7,0, 2% SDS, 10% Glycerin, 0,001% Bromphenolblau, 1% β -Mercaptoethanol, 0,5 mg/ml Pefabloc SC) aufgenommen und mit einem Pistill homogenisiert. Die Ansätze wurden 5 min bei 95°C denaturiert und anschließend zentrifugiert (Sigma 2K15, 1.000 x g, 2 min, 4°C). Die Proteinkonzentration des Überstandes wurde mit der Amido-Schwarz-Methode (\Rightarrow 2.8.3.2) bestimmt.

2.8.3 Konzentrationsbestimmung von Proteinlösungen

2.8.3.1 Konzentrationsbestimmung löslicher Proteine

Die Proteinkonzentration löslicher Proteine wurde nach BRADFORD (1976) bestimmt. Die Proteinprobe wurde mit Wasser auf ein Gesamtvolumen von 800 μ l aufgefüllt und mit 200 μ l Bradford-Reagenz (Protein Assay, Bio-Rad, München) versetzt. Nach 10 minütiger Inkubation bei RT wurde die Absorption der Lösung bei 595 nm bestimmt. Die Proteinkonzentration wurde anhand einer mit Rinderserum-Albumin (BSA) (NEB, Schwalbach) erstellten Kalibrierkurve bestimmt.

2.8.3.2 Konzentrationsbestimmung von Membranproteinen

Detergenzien und Lipide stören die Konzentrationsbestimmung nach BRADFORD (1976). Deshalb wurden Proteinkonzentrationen alternativ mit der Amido-Schwarz-Methode bestimmt.

Zum Vergleich wurden BSA-Lösungen bekannter Konzentration (NEB, Schwalbach) verwendet. Die Proben sowie die BSA-Lösungen (1-10 μ g) wurden mit Wasser auf 200 μ l aufgefüllt und mit 20 μ l 10% SDS gemischt. Es wurden 30 μ l 1 M Tris/HCl pH 7,5, 1% SDS hinzugegeben und vermischt. Zur Fällung der Proteine wurden 60 μ l 104% (w/v) Trichloressigsäure (TCA) zugegeben und für 30 min bei RT inkubiert. Ein Membranfilter (Type HA, Porengröße 0,45 μ m, Millipore, Eschborn) wurde mit 2 ml 6% TCA auf einer Vakuumfilteranlage (Millipore, Eschborn) benetzt. Die Protein-Proben wurden auf den Filter aufgetragen und anschließend mit 2 ml 6% TCA gewaschen. Der Filter wurde für 3 min in einer Färbelösung (0,5% (w/v) Amidoschwarz 10B, 45% Methanol, 10% Essigsäure, 45% Wasser) inkubiert, kurz mit Wasser gespült und dreimal für 1 min in Entfärbelösung (90% Methanol, 2% Essigsäure, 8% Wasser) gegeben. Die angefärbten Bereiche (Protein) wurden

ausgeschnitten und 20 min in 1 ml Elutionslösung (25 mM NaOH, 50 μ M EDTA, 50% (v/v) Ethanol) in einem Tischschüttler (Eppendorf Mixer 5432) extrahiert. Die Absorption der Lösung wurde mit einem Ultrospec 3000 (APBiotech, Freiburg) bei 630 nm gegen eine Nullprobe ermittelt. Anhand der BSA-Referenzwerte konnte die Proteinkonzentration der Probenlösung bestimmt werden.

2.8.4 Modifikation von Proteinen

2.8.4.1 Deglykosylierung von Membranproteinen

Membranproteine sind häufig posttranslational modifiziert. Zu den bekanntesten Modifikationen gehört die Glykosylierung. Ob ein Protein modifiziert vorliegt, kann enzymatisch geprüft werden. Das Enzym Peptid N-Glykosidase F (PNGase F) aus *Flavobacterium meningosepticum* spaltet N-glykosidisch gebundene Zucker ab.

Membranproteinlösungen (\Rightarrow 2.8.1) wurden für 10 min bei 37°C denaturiert (0,5% SDS, 1% β -Mercaptoethanol). Die Deglykosylierung erfolgte für 4 h bei 37°C in 50 mM PBS pH 7,5, 1% Nonidet P 40 mit 500 U PNGase F (NEB, Schwalbach). Kontrollreaktionen wurden ohne Zugabe des Enzyms durchgeführt.

2.9 Immunpräzipitation

Die Immobilisierung eines monoklonalen Maus- α -HA-Antikörpers (12CA5; zur Verfügung gestellt von Frau Dr. E. Kremmer, GSF München) an Protein G-Sepharose und die Immunpräzipitation von Membranproteinen an der Antikörper-Säulenmatrix wurden in Anlehnung an BONIFACINO et al. (1999) durchgeführt. Für die Antikörper-Säulenmatrix wurden 2 mg Maus- α -HA-Antikörper an Protein G-Sepharose 4B Fast Flow (1 ml Säulenvolumen) (Sigma, Deisenhofen) mit dem quervernetzenden Reagenz Dimethylpimelimidatdihydrochlorid (DMP; Sigma, Deisen) gekoppelt. Die Antikörper-Säulenmatrix wurde mir von Dr. A. Scholten (IBI 1, Forschungszentrum Jülich) zur Verfügung gestellt.

2.9.1 Immunpräzipitation von Membranproteinen an einer Antikörper-Säulenmatrix

Immunpräzipitationen wurden mit 50 µg Membranproteinen aus heterolog transfizierten HEK293-Zellen (⇒ 2.8.1) in einem Eppendorf-Reaktionsgefäß durchgeführt. Zum Wechseln der Flüssigkeit wurde die Säulenmatrix zentrifugiert (Sigma 3K12, 200 x g, 5 min, 4°C), der Überstand entfernt und das Säulenmaterial resuspendiert. Während der Inkubationen wurde das Säulenmaterial durch Invertieren in Suspension gehalten.

Die in Puffer B resuspendierten Membranproteine (⇒ 2.8.1) wurden zunächst für 1 h bei 4°C mit dem gleichen Volumen Triton X-100 (in Puffer D: 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 0,1 mM EGTA, 1 mM DTT, 0,1% (w/v) Triton X-100, 20 mM HEPES/NaOH pH 7,4, 0,5 mg/ml Pefabloc SC) solubilisiert. Anschließend wurden sie für 30 min bei 4°C mit 100 µl Protein G-Sepharose 4B Fast Flow (äquilibriert in Puffer D) vorinkubiert, um die Proteine zu entfernen, die unspezifisch mit der Gelmatrix wechselwirken. Die Protein G-Sepharose wurde zentrifugiert und die vorinkubierte Proteinsuspension zu 100 µl der in Puffer D äquilibrierten Antikörper-Säulenmatrix gegeben. Der Ansatz wurde für 2 h bei 4°C inkubiert und anschließend zentrifugiert. Der Überstand enthält die nicht gebundenen Proteine (Durchfluss) und wurde abgenommen. Die Säule wurde insgesamt fünfmal mit vier Säulenvolumen Puffer D gewaschen. Die Elution der gebundenen Membranproteine erfolgte durch Zugabe von 100 µl Elutionspuffer (100 mM Glycin pH 2,5, 0,1% (w/v) Triton X-100). Alle noch gebundenen Proteine wurden mit einer SDS-haltigen Lösung (2% (w/v) SDS, 5 mM EDTA, 20 mM Tris/HCl pH 7,5) entfernt. Die einzelnen Fraktionen wurden in einem PAA/SDS-Gel (⇒ 2.10.2) aufgetrennt und im Western-Blot ausgewertet.

2.10 Nachweis immobilisierter Proteine

2.10.1 Protein-Größenstandard

Denaturierende Protein-Gele wurden mit dem LMW-Größenstandard (APB, Freiburg) in 1x SDS-Probenpuffer (1,6% (w/v) SDS, 1% (v/v) β-Mercaptoethanol, 50 mM Tris/HCl pH 7,6, 12,5% (w/v) Glycerin, 0,013% (w/v) Bromphenolblau) beladen. Der Größenstandard enthält folgende Proteine: Phosphorylase b aus Kaninchenmuskel

(94 kDa), Albumin aus Rinderserum (67 kDa), Ovalbumin aus Hühnereiweiß (43 kDa), Carboanhydrase aus Rinder-Erythrozyten (30 kDa), Trypsin-Inhibitor aus Sojabohne (20,1 kDa), α -Lactalbumin aus Kuhmilch (14,4 kDa). Zwischenzeitlich wurden für einige Komponenten die Größenangaben vom Hersteller (APB, Freiburg) korrigiert: Phosphorylase b aus Kaninchenmuskel (97 kDa), Albumin aus Rinderserum (66 kDa) und Ovalbumin aus Hühnereiweiß (45 kDa).

Zusätzlich wurde der HMW-Größenstandard (APB, Freiburg) benutzt. Dieser Größenstandard enthält folgende Proteine: Myosin aus Kaninchenmuskel (220 kDa), α -2-Makroglobulin aus Rinderplasma (170 kDa), β -Galaktosidase aus *E. coli* (116 kDa), Transferrin aus dem Menschen (76 kDa), Glutamat Dehydrogenase aus Rinderleber (53 kDa).

2.10.2 Gelelektrophorese

Die elektrophoretische Trennung der Proteine wurde nach LAEMMLI (1970) in 7,5%igen bis 12,5%igen denaturierenden PAA/SDS-Gelen (Verhältnis Acrylamid : Bisacrylamid = 37.5 : 1) durchgeführt. Für lineare Gradientengele wurden Acrylamidkonzentrationen zwischen 5 und 15% verwendet. Zur elektrophoretischen Auftrennung wurde eine Minigel Twin Kammer (Biometra, Göttingen) (Gelmaße 10 x 8 x 0,1 cm) benutzt. Die Proteinproben wurden mit 3-4 Volumen SDS-Probenpuffer (\Rightarrow 2.10.1) versetzt. Die Elektrophorese (Elektrodenpuffer: 25 mM Tris, 0,1% SDS, 192 mM Glycin) erfolgte im Sammelgel bei 15 mA und im Trenngel bei 20 mA bis die Bromphenolblaufront gerade aus dem Gel ausgetreten war.

Die Auftrennung von Proteinextrakten aus *Drosophila melanogaster* und präparative Trennungen von Fusionsproteinen erfolgten in 10%igen PAA/SDS-Gelen in einer Hofer-Gelkammer (Studier 400, 15 x 14 x 0,15 cm) bei 70 mA üN.

Die PAA/SDS-Gele wurden mit Coomassie-Blau angefärbt (MEYER & LAMBERTS, 1965). Gele wurden für 1-2 h in Färbelösung (30% Ethanol, 10% Essigsäure, 0,2% Coomassie Brilliant Blue R 250 (Serva, Heidelberg)) inkubiert und anschließend in Entfärbelösung (30% Ethanol, 10% Essigsäure) wieder entfärbt, auf Whatman-Papier übertragen und getrocknet.

2.10.3 Transfer von Proteinen auf PVDF-Membranen („Western-Blot“)

Für immunologische Nachweise wurden die Proteine im Semi-Dry-Verfahren (TOWBIN et al., 1979) mit einem Multiblot-Transfergerät (Roth, Karlsruhe) nach den Angaben des Herstellers (30 min bei 5 mA/cm² Gelfläche, d.h. ~ 245 mA) aus PAA/SDS-Gelen auf eine PVDF-Membran (Immobilon-P-Membran, Millipore, Eschborn) übertragen. Der Transfer wurde durch eine reversible Anfärbung mit 2%iger Ponceau-Rot-Lösung (2% Ponceau S, 5% Essigsäure) kontrolliert.

Die Spezifität und Affinität von Seren und gereinigten Antikörpern wurde auch mit „Tüpfeltests“ (Dot-Blots) getestet. Dazu wurden verschiedene Mengen (0,2-20 ng) gereinigter Fusions- und Kontrollproteine auf eine Nitrocellulose-Membran (Protran Nitrocellulose, Schleicher & Schuell, Dassel) aufgetropft. Nach dem Antrocknen erfolgte der Nachweis analog dem Western-Blot-Verfahren (⇒ 2.10.4).

2.10.4 Immunologischer Proteinnachweis auf Western-Blot Membranen

Western-Blots wurden einmal für 10 min bei RT in 1x PBS gewaschen. Die Membranen wurden für 30 min bei RT in Blockierlösung I (0,5% (w/v) Magermilchpulver in PBS) inkubiert und anschließend zweimal für je 10 min mit Lösung I (0,05% (w/v) Tween 20 in PBS) gewaschen. Für Blots mit Membranpräparationen aus HEK293-Zellen und aus *Drosophila* Geweben wurde Blockierlösung II (2,5% (w/v) Magermilchpulver, 0,5% (w/v) BSA in 1x PBS) verwendet.

Die Membranen wurden mit dem Erstantikörper (verdünnt in Lösung I) für 1 h bei RT inkubiert und danach zweimal für 10 min bei RT in Lösung I gewaschen. Es folgte eine 30 minütige Inkubation bei RT mit dem Zweitantikörper (verdünnt in Lösung I). Die Membranen wurden zweimal für 10 min mit Lösung I und einmal für 10 min mit 1x PBS gewaschen. Der Nachweis der spezifisch gebundenen Antikörper erfolgte mit „ECL-Western blotting detection reagents“ (APB, Freiburg). Dazu wurden die Blot-Membranen 1 min bei RT in ECL-Inkubationslösung (ECL-Lösung 1 und ECL-Lösung 2 im Verhältnis 1:1) überführt. Der Nachweis gebundener Antikörper erfolgte durch Belichtung von Röntgenfilmen (Hyperfilm ECL, APB, Freiburg) für 10 s bis 2 h.

2.10.5 Wiederverwendung von Western-Blot Membranen

Die Membran wurde nach der Entwicklung des Röntgenfilms mit 1x PBS gewaschen. Die Ablösung der gebundenen Antikörper erfolgte durch zweimal 5 minütige Inkubation mit 0,2 M NaOH bei RT. Die Membran wurde mehrfach mit 1x PBS gewaschen und bei 4°C in PBS mit 0,01% NaN₃ gelagert.

2.11 Immunzyto- und Immunhistochemie

2.11.1 Immunzytochemie an HEK293-Zellen

Der Nachweis heterolog exprimierter Proteine erfolgte 45 Stunden nach der Transfektion der HEK293-Zellen (⇒ 2.6.1). Die Zellen wurden zweimal mit 1x PBS gewaschen und für 15 min bei RT mit einer 4%igen Paraformaldehyd-Lösung (PA) fixiert. Das PA wurde durch drei Waschschrte mit 1x PBS entfernt und die Zellen mit Präinkubationslösung (10% Normal goat serum (v/v) (NGS), 0,5% Triton X-100 (w/v) in 1x PBS) für 30 min bei RT inkubiert. Der Erstantikörper wurde in Verdünnungen von 1:10 bis 1:100 in PBS⁻ (5% NGS (v/v), 0,5% Triton X-100 (w/v) in 1x PBS) für 60 min bei RT eingesetzt. Nach drei 15 minütigen Waschschrten mit 1x PBS wurde Zweitantikörperlösung (1:100 verdünnt in PBS⁻) für 30 min bei RT zugegeben. An den Zweitantikörper ist das Enzym Meerrettichperoxidase (HRP) kovalent gebunden. Nach der Inkubation wurde dreimal für 15 min mit PBS gewaschen. Der Nachweis der gebundenen Antikörper erfolgte durch eine HRP-katalysierte Oxidationsreaktion. Eine Farbstofflösung, die Diaminobenzidin (DAB) (0,05% (w/v) DAB, 0,01% Wasserstoffperoxid in 1x PBS) enthielt, wurde für 30 s bis 15 min zu den Zellen pipettiert.

Das oxidierte DAB bildet einen unlöslichen braunen Niederschlag. Die Reaktion wurde durch dreimaliges Waschen mit 1x PBS gestoppt. Die Glasplättchen wurden in AquaPoly/Mount (Poly sciences, Warrington, USA) eingebettet und lichtmikroskopisch (Axiovert 35, Zeiss) ausgewertet bzw. photographiert (Nikon F3).

Alternativ wurden Fluoreszenzfarbstoff-gekoppelte Zweitantikörper (⇒ Tabelle 2) verwendet, um koexprimierte Proteine nachweisen zu können. Die Zweitantikörperlösung wurde 1 : 500 in PB (81 mM Na₂HPO₄, 19 mM NaH₂PO₄)

verdünnt und für 30 min bei RT zugegeben. Nach dem Waschen mit 1x PBS erfolgte der Nachweis gebundener Antikörper mit einem konfokalen Lasermikroskop (\Rightarrow 2.11.2.3). Die Anregung der Fluorophore der Sekundärantikörper erfolgte seriell.

Für den immunzytochemischen Nachweis des His-Tag-Epitops wurde ein monoklonaler Antikörper (Penta•His Alexa Fluor 488 Conjugate, Qiagen, Hilden) verwendet, der gegen 5 Histidine gerichtet und mit dem Fluorophor Alexa-488 konjugiert ist. Die Erstantikörperlösung wurde in einer Verdünnung von 1 : 1.000 in PB für 60 min bei RT eingesetzt. Nach der Inkubation wurde dreimal mit 1x PBS gewaschen, die Glasplättchen eingebettet und mikroskopisch ausgewertet.

2.11.2 Immunhistochemie an Gewebeschnitten von *Drosophila melanogaster*

2.11.2.1 Anfertigung von Gewebeschnitten

Adulte Fliegen wurden mit Ethylether betäubt und dorsal mit Nagellack auf einem Zahnstocher fixiert. Nach Zugabe einer frisch angesetzten Fixierlösung (4% Paraformaldehyd in 1x PBS pH 7,2 oder 5% Glutardialdehyd (Merck, Darmstadt) in Tris/HCl pH 7,6) wurden die Luftsäcke im Kopf der Tiere mit einer Kanüle angestochen, um die Fixierung des Gewebes zu erleichtern. Die vorbehandelten Tiere wurden für 3 h bei 4°C inkubiert und anschließend in *Drosophila* Ringer-Lösung (182 mM KCl, 46 mM NaCl, 3 mM CaCl₂, 10 mM Tris/HCl pH 7,2) mit 25% Sucrose bei 4°C gelagert.

Die Köpfe der fixierten Fliegen wurden in Einbettmedium (Tissue Freezing Medium, Leica Instruments, Nussloch) überführt und in flüssigem Stickstoff eingefroren. Es wurden 12 µm dicke Gefrierschnitte (Kryostat: 2800 Frigocut E, Reichert/Jung/Leica) bei einer Umgebungstemperatur von -24°C und einer Objekttemperatur von -20°C angefertigt. Die Schnitte wurden auf gelatinisierte Objektträger aufgenommen, getrocknet und entweder sofort für die Immunhistochemie verwendet oder bei -20°C gelagert.

Für die Gelatinisierung wurden SuperFrost-Objektträger eingesetzt. Nach dem Entfetten in absolutem Alkohol (üN) wurden die Objektträger für 5 min in 2% Gelatine bei 42°C inkubiert und üN bei 60°C getrocknet.

2.11.2.2 Farbniederschlag und Durchlichtmikroskopie

Gewebeschnitte adulter *Drosophila* Köpfe wurden mit einem Fettstift (Pap Pen, Kisker, Mühlhausen) eingegrenzt und mit Lösung I (0,2% (w/v) Triton X-100 in 1x PBS, pH 7,4) gewaschen. Anschließend wurde Präinkubationslösung (0,2% (w/v) Triton X-100, 1% (v/v) NGS in 1x PBS) für 30 min bei RT zugegeben. Sie wurde durch die Erstantikörper-Verdünnung (gereinigter Antikörper 1 : 50 bis 1 : 100 in Lösung I) ersetzt und üN bei 4°C auf den Schnitten belassen.

Die Schnitte wurden am nächsten Tag zweimal für 15 min mit Lösung I gewaschen. Der Nachweis der Erstantikörperbindung erfolgte mit der ABC-Methode (Avidin-Biotinylierter Peroxidase-Complex, Hsu et al., 1981). Dabei trägt der Zweitantikörper (rbBio, Sigma) kovalent gebundenes Biotin, das hochaffin an HRP-markiertes Avidin (ExtrAvidin-Peroxidase konjugiert, Sigma) bindet.

Die Inkubation mit dem biotinylierten Zweitantikörper (1 : 1.000 in NG⁻ (5% (v/v) NGS, 0,5% (w/v) Triton X-100 in PB)) erfolgte für 3 h bei RT. Es wurde zweimal für 15 min mit Lösung I gewaschen. Anschließend wurde das markierte Avidin (1 : 300 in PB) für 2 h bei RT zugegeben. Nach der Inkubation wurde zweimal für 15 min mit Lösung I und einmal für 15 min mit 1x PBS gewaschen. Der Nachweis des spezifisch gebundenen Antikörpers erfolgte durch eine HRP-Reaktion mit dem Chromogen Diaminobenzidin (DAB) (\Rightarrow 2.11.1) für 30 min bei RT. Nach mehrmaligem Waschen mit 1x PBS wurden die Schnitte eingebettet und der braune Niederschlag lichtmikroskopisch ausgewertet.

2.11.2.3 Fluoreszenzmarkierte Antikörper und konfokale Mikroskopie

Der Einsatz von Fluoreszenzfarbstoff-gekoppelten Zweitantikörpern in Kombination mit einem konfokalen Mikroskop erhöhte die Nachweis-Empfindlichkeit deutlich. Die Gewebeschnitte adulter *Drosophila* Köpfe bzw. Gehirne von Larven (3. Stadium) wurden mit einem Fettstift eingegrenzt und Präinkubationslösung (0,012% (w/v) Tween 20 in PBS) für 20 min bei RT zugegeben. Nach zwei Waschschritten mit PB wurde Blockierlösung (0,5% BSA, 0,1% Kaltwasserfischgelatine in PB) für 30 min bei RT zugegeben. Sie wurde durch die Erstantikörperlösung (gereinigter Antikörper

1 : 50, α -rb-uNOS (Sigma, Deisenhofen) 1 : 50 bis 1 : 100, α -rb-Opsin (Dr. A. Huber, Karlsruhe) 1 : 20 in Blockierlösung) ersetzt und üN bei 4°C inkubiert.

Die Präparate wurden dreimal 15 min mit PB gewaschen. Der Nachweis der Erstantikörperbindung erfolgte mit Fluoreszenzfarbstoff-gekoppelten Zweitantikörpern für 3 h bei RT.

Nach mehrmaligem Waschen mit PB wurde die Bindung der Zweitantikörper mit einem inversen konfokalen Lasermikroskop (TCS SP, Leica) nachgewiesen. Dieses Mikroskop war mit einem Ar/Kr-Laser ausgerüstet, der vier Spektrallinien emittiert (476, 488, 568, 647 nm). Die Eigenschaften und Verdünnungen der verwendeten Fluoreszenzfarbstoff-gekoppelten Zweitantikörper sind in Tabelle 2 zusammengefasst.

Tabelle 2: Eigenschaften und verwendete Verdünnungen der Fluoreszenzfarbstoff-gekoppelten Zweitantikörper

Fluorophor *	Verdünnung	Anregungs-Maximum [nm]	Hersteller
gt- α -rt-Alexa-488	1 : 500	488	Molecular Probes, Leiden, Niederlande
gt- α -rt-Alexa-568	1 : 500	568	Molecular Probes, Leiden, Niederlande
d- α -rb-CY3	1 : 500	554	Dianova, Hamburg
d- α -rb-CY5	1 : 100	652	Dianova, Hamburg

*) **Abkürzungsverzeichnis der Zweitantikörper:** d = donkey (im Esel hergestellt), gt = goat (Ziege); α = Anti-; gerichtet gegen Erstantikörper aus: rb = rabbit (Kaninchen), rt = rat (Ratte)

Das emittierte Fluoreszenzlicht wurde mit verstellbaren Bandpassfiltern einem Fluoreszenzdetektor („Photomultiplier“) zugeführt und zu einem digitalen Bild weiterverarbeitet. Durch das konfokale Prinzip gewinnt man Bilder aus sehr dünnen Gewebeschnittebenen, die kaum Fluoreszenzlicht aus anderen Objektebenen enthalten. Der räumliche Eindruck eines Gewebeschnittes wurde im Computer durch Überlagerung mehrerer Schnittebenen eines Präparates erzeugt. Die in dieser Arbeit vorgestellten Fluoreszenzabbildungen stellen Projektionen aus 2 bis maximal 16 Bildebenen dar. Durchlichtaufnahmen wurden ebenfalls mit dem konfokalen

Mikroskop und einer Differenziellen Interferenz Kontrast (DIC oder Normarski)-Optik digital aus einer einzigen Bildebene erzeugt.

2.11.3 Immunhistochemie an larvalen Gehirnen von *Drosophila melanogaster*

Larvale Gehirne wurden üN bei 4°C in 1x PBS mit 1% Saponin permeabilisiert und wie unter 2.11.2.3 beschrieben weiterbehandelt.

2.12 Diaphorase-Färbung

2.12.1 Diaphorase-Färbung an larvalen Gehirnen von *Drosophila melanogaster*

Für die Präparation larvaler Gehirne wurden Tiere des 3. Larvenstadiums verwendet. Sie wurden in eiskaltem 1x PBS immobilisiert. Das Gehirn wurde unter einem Binokular (Zeiss STEMI DV 4) präpariert. Das Gewebe wurde 1 h in 4%igem Paraformaldehyd bei 4°C fixiert. Die Gehirne wurden mehrmals mit 1x PBS gewaschen und über Nacht bei 4°C mit 1% (w/v) Saponin in 1x PBS permeabilisiert. Die Gehirne wurden dreimal mit 1x PBS gewaschen und dann für 5 Stunden bei RT im Dunkeln mit einer Färbelösung (0,1 mM 4-Nitrotetrazoliumchloridblau (NBT), 0,1 mM β -NADPH, 0,1% (w/v) Triton X-100 in 1x PBS) inkubiert. Die Kontrollgehirne wurden in einer Färbelösung inkubiert, die kein β -NADPH enthielt. Unmittelbar nach der Inkubation wurde die Färbung lichtmikroskopisch ausgewertet und dokumentiert.

2.12.2 Diaphorase-Färbung an Gewebeschnitten adulter Fliegen

Für die Färbung von Gewebeschnitten wurde sowohl der Wildtyp-Stamm *Oregon R* als auch die weißäugige Mutante *w¹¹¹⁸* eingesetzt. Die Gefrierschnitte adulter Köpfe (\Rightarrow 2.11.2.1) wurden nach MÜLLER (1993) angefärbt.

Die Schnitte wurden für 1 h bei RT im Dunkeln mit Färbelösung (0,2 mM NBT, 1 mM β -NADPH, 0,2% (w/v) Triton X-100 in 1x PBS) inkubiert. Die Kontrollgehirne wurden gleich behandelt. Die Färbelösung enthielt jedoch kein β -NADPH.

Nach der Färbung wurden die Präparate dreimal mit PBS gewaschen und eingebettet. Der blaue Formazan-Niederschlag wurde lichtmikroskopisch ausgewertet und fotografiert.

2.13 Elektrophysiologische Messungen

Die elektrophysiologische Charakterisierung der *Drosophila* CNG-Kanäle wurde von Dr. S. Frings (IBI 1, Forschungszentrum Jülich) durchgeführt. Die Kanaluntereinheiten wurden in HEK293-Zellen oder HEK-TSA-Zellen heterolog exprimiert. Die Messungen erfolgten mit der „Patch clamp“-Technik (HAMILL et al., 1981) in der „inside out-patch“-Konfiguration. Ein Membranstück („patch“) wurde mit einer Messpipette so von der Zelle abgezogen, dass die zytoplasmatische Seite zur Badlösung (140 mM NaCl, 10 mM EDTA, 10 mM HEPES/NaOH pH 7,4) gerichtet war. Der Pipettenwiderstand betrug ca. 5 M Ω , nach Abziehen des Patches von der Zelle ≥ 2 G Ω („Seal“-Widerstand).

Die elektrophysiologischen Messungen wurden bei definierter Spannung (Spannungsklemme) durchgeführt (EPC7; List, Darmstadt). Der Membranstrom wurde durch einen Tiefpassfilter (1 kHz, 8-Pol Bessel Filter, Frequency Devices, Massachusetts/USA) gefiltert und die Messwerte gespeichert (A/D-Wandler und Software: pClamp 6.0.3, Axon Instruments, Burlingame/ USA). Die Membranstücke wurden aus parallel angeordneten Quarz-Kunststoff-Kapillaren mit den Testlösungen perfundiert. Für die Messung der cGMP- bzw. cAMP-induzierten Ströme wurde die Pipette mit der Badlösung gefüllt und die Membranstücke mit den angegebenen Konzentrationen von cGMP bzw. cAMP in Badlösung perfundiert.

3 Ergebnisse

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war, zelluläre Komponenten, die an cGMP-gesteuerten Signalwegen im Zentralnervensystem (ZNS) von *Drosophila melanogaster* beteiligt sind, zu identifizieren und zu charakterisieren.

Vor einiger Zeit wurde in unserem Arbeitskreis die Untereinheit eines zyklisch Nukleotid-gesteuerten Ionenkanals (*Dmcnga*) kloniert und elektrophysiologisch charakterisiert (BAUMANN et al., 1994). Die Sequenzierung des vollständigen *Drosophila* Genoms (ADAMS et al., 2000) ermöglichte eine gezielte Datenbankrecherche nach *Dmcnga*-homologen Genen. Es wurden drei weitere Gene gefunden, die für potenzielle CNG-Kanaluntereinheiten kodieren (*Dmcngb*, *Dmcng3*, *Dmcng4*).

Der Ergebnisteil gliedert sich in vier Abschnitte. Der erste Teil beschreibt die Analyse der identifizierten *Dmcng*-Kanalgene sowie die Klonierung des *Dmcngb*-Gens. Der zweite Teil beschreibt die heterologe Expression von DmCNGA, DmCNGB und DmCNG3. Im dritten und vierten Teil wird die gewebespezifische Lokalisation von DmCNGA und einer Stickoxid-Synthase beschrieben.

3.1 Die *Drosophila* CNG-Kanalgenfamilie

3.1.1 Datenbankrecherche zur Identifizierung potenzieller CNG-Kanalgene

Die Veröffentlichung des *Drosophila* Genoms (ADAMS et al., 2000) ermöglichte es, nach *Dmcnga*-homologen Genen zu suchen. Die Datenbank wurde mit der *Dmcnga*-Sequenz unter Verwendung des BLASTN-Programms (Basic Local Alignment Search Tool; ALTSCHUL et al., 1990) durchmustert. Insgesamt wurden drei weitere Sequenzen gefunden, die für potenzielle CNG-Kanaluntereinheiten kodieren (*Dmcngb*, *Dmcng3*, *Dmcng4*). Die Eigenschaften der Gene sind in Tabelle 3 zusammengestellt.

Tabelle 3: Eigenschaften der *Drosophila* CNG-Kanalgene. Die Angaben wurden der Datenbank (ADAMS et al., 2000) bzw. den Erstveröffentlichungen entnommen. Die Anzahl der Exone wurde durch einen Vergleich der cDNA und der genomischen DNA-Sequenzen ermittelt.

	<i>Dmcnga</i>	<i>Dmcngb</i>	<i>Dmcng3</i>	<i>Dmcng4</i>
Gen-/cDNA-Länge [bp]	3.847	15.149	5.673	12.917
Kodierender Bereich [bp]	1.998	3.114	4.395	2.049
Exone	7	5	15	9
Aminosäuren	665	1.037	1.463	682
Chromosomale Lokalisation	2R; 52F	2R; 57F	X; 13C	2R; 59A
Erstbeschreibung	BAUMANN et al., 1994	-	MIYAZU et al., 2000	-

Alle *Drosophila* CNG-Kanalgene bestehen aus mehreren Exonen. *Dmcng3* hat mit 15 Exonen die größte Anzahl kodierender Sequenzabschnitte, die sich über ca. 6 kb genomische DNA erstrecken. Im Gegensatz dazu erstreckt sich das *Dmcngb*-Gen über ca. 15 kb genomische DNA. Es besteht aber nur aus 5 Exonen. Auch das *Dmcng4*-Gen ist groß (ca. 13 kb). Die kodierende Sequenz besteht aus 9 Exonen (Tab. 3).

Das *Dmcnga*-, das *Dmcngb*- und das *Dmcng4*-Gen sind auf dem rechten Arm des 2. Chromosoms lokalisiert. Der Genort des *Dmcng3*-Gens befindet sich auf dem X-Chromosom. Die Sequenz des *Dmcng3*-Gens wurde unabhängig von einer japanischen Arbeitsgruppe publiziert (MIYAZU et al., 2000).

Die aus den DNA-Sequenzen abgeleiteten Proteinsequenzen sind 665 (DmCNGA), 1.037 (DmCNGB), 1.463 (DmCNG3) und 682 (DmCNG4) Aminosäuren lang (Tab. 3). Eine schematische Darstellung der abgeleiteten Aminosäuresequenzen ist in Abbildung 4 gezeigt. Die charakteristischen Merkmale der CNG-Kanaluntereinheiten: die transmembranalen Segmente S1-S6 (1-6), die Porenregion (P) und die Bindestelle für zyklische Nukleotide (cNMP) sind eingezeichnet. In der Abbildung sind die Aminosäuresequenzen auf diesen gemeinsamen Kernbereich „ausgerichtet“.

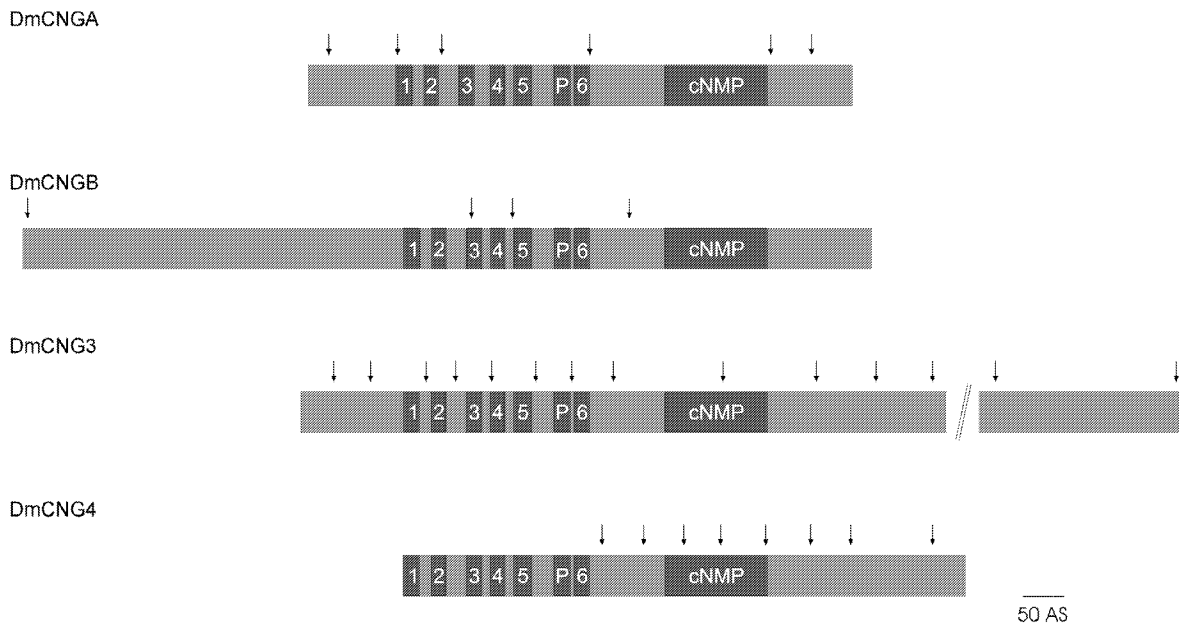


Abb. 4: Schematische Darstellung der abgeleiteten Aminosäuresequenzen aller *Drosophila* CNG-Kanaluntereinheiten und der Exon/Intron-Verteilung. Die wichtigsten strukturellen Merkmale der CNG-Kanäle sind eingezeichnet: Die transmembranalen Segmente (1-6), die Porenregion (P) und die Bindestelle für zyklische Nukleotide (cNMP). Ein Teilbereich des C-Terminus der DmCNG3-Untereinheit wurde aus Übersichtsgründen ausgespart (//). Die Pfeile markieren die Lage der Exon/Intron-Übergänge. Der Balken entspricht 50 Aminosäuren.

Im Vergleich zur DmCNGA-Kanaluntereinheit ist der N-Terminus der DmCNGB-Untereinheit bzw. der C-Terminus der DmCNG3-Untereinheit deutlich verlängert. Für *DmCng4* werden zwei Transkripte postuliert (ADAMS et al., 2000). Die abgeleitete Aminosäuresequenz des größeren Transkripts besteht aus 682 Aminosäuren und beginnt im S1-Segment (DmCNG4, Abb. 4). Das zweite Transkript kodiert für eine verkürzte Variante mit 418 Aminosäuren. Die verkürzte Sequenz beginnt nach dem ersten Exon/Intron-Übergang hinter dem S6-Segment und endet direkt hinter dem letzten Exon/Intron-Übergang mit den Aminosäuren S-I-I. Das Protein enthält also nur die cNMP-Bindestelle, aber keine Transmembransegmente. Für die Ausbildung eines funktionellen Ionenkanals ergibt das keinen Sinn.

Die Position der Exon/Intron-Übergänge aller *DmCng*-Gene ist auf die Aminosäuresequenzen übertragen und durch Pfeile gekennzeichnet (\Rightarrow Abb. 4). Die Übergänge wurden durch Sequenzvergleiche der cDNA's mit der genomischen DNA ermittelt. Die Spleißmuster der Gene unterscheiden sich deutlich voneinander. Die genauen Positionen der Exon/Intron-Übergänge sind im Anhang (\Rightarrow Tab. A1) aufgeführt. Im Anhang sind ebenfalls die Nukleinsäure- und abgeleiteten

Aminosäuresequenzen der in dieser Arbeit besprochenen *Drosophila* CNG-Kanaluntereinheiten aufgeführt (Anhang Abb. A1-A5).

3.1.2 Einordnung der *Drosophila* CNG-Kanalproteine in α - und β -Untereinheiten

Die CNG-Kanäle der Wirbeltiere sind aus α - und β -Untereinheiten aufgebaut (\Rightarrow 1.1). Bisher ist nur bekannt, dass das *Drosophila* *DmCnga*-Gen für eine α -Untereinheit kodiert (BAUMANN et al., 1994). Durch einen Vergleich der abgeleiteten Aminosäuresequenzen der *Drosophila* CNG-Kanaluntereinheiten mit menschlichen CNG-Kanaluntereinheiten sollte versucht werden, die *Drosophila* Proteine α - oder β -Untereinheiten-Typen zuzuordnen. Für den Sequenzvergleich wurden nur die zentralen Bereiche vom S1-Segment bis einschließlich der cNMP-Bindestelle verwendet, da sich die N- und C-Termini der Proteine stark voneinander unterscheiden. Die Anzahl identischer und konservativ ausgetauschter Aminosäuren zwischen den Untereinheiten ist in Tabelle 4 in Prozent angegeben.

Tabelle 4: Aminosäure-Sequenzvergleich zwischen *Drosophila* und menschlichen CNG-Kanaluntereinheiten. Die abgeleiteten Aminosäuresequenzen der vier *Drosophila* CNG-Kanaluntereinheiten (DmCNGA, DmCNGB, DmCNG3, DmCNG4) werden mit der α -Untereinheit des menschlichen CNG-Kanals aus Sehstäbchen (hCNGA1), aus Sehzapfen (hCNGA3) und aus dem olfaktorischen Epithel (hCNGA2, hCNGA4), der β -Untereinheit des menschlichen CNG-Kanals aus Sehstäbchen (hCNGB1) sowie aus Sehzapfen (hCNGB3) verglichen. In der Tabelle sind die identischen und konservativ ausgetauschten Aminosäuren zwischen den jeweiligen Untereinheiten in Prozent angegeben. Für den Vergleich wurde nur der Bereich von S1 bis einschließlich der cNMP-Bindestelle verwendet.

	DmCNGA	DmCNGB	DmCNG3	DmCNG4
DmCNGA	100%			
DmCNGB	60,2%	100%		
DmCNG3	65,8%	60,0%	100%	
DmCNG4	69,5%	55,3%	66,6%	100%
hCNGA1	76,9%	61,7%	68,8%	69,0%
hCNGA2	77,7%	61,5%	69,9%	69,7%
hCNGA3	77,6%	60,6%	68,6%	70,7%
hCNGA4	71,7%	57,9%	64,3%	64,5%
hCNGB1	57,8%	67,5%	58,6%	59,8%
hCNGB3	58,2%	66,2%	57,9%	57,2%

Der Sequenzvergleich wurde benutzt, um die Verwandtschaftsbeziehungen zwischen den Kanaluntereinheiten grafisch darzustellen. Das Dendrogramm ist in Abbildung 5 gezeigt.

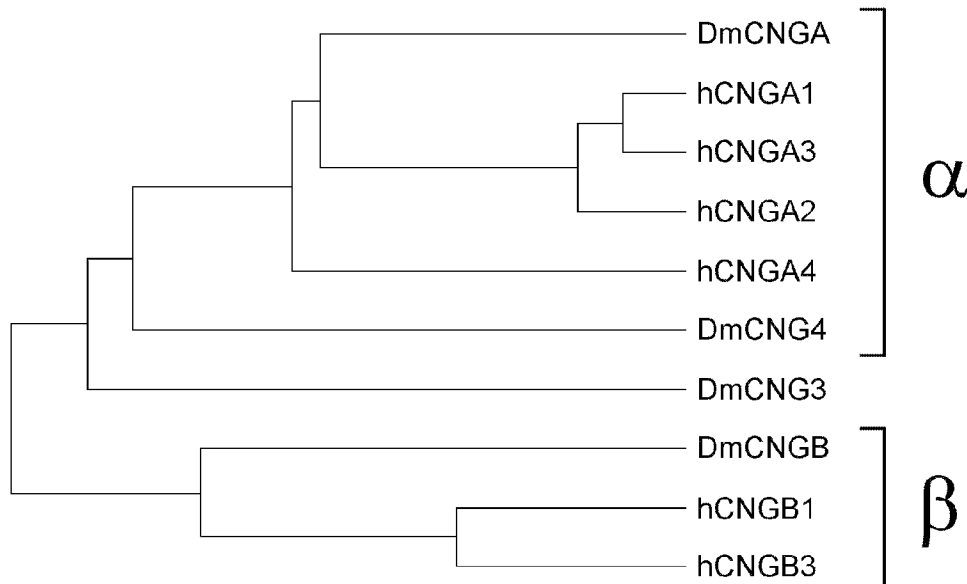


Abb. 5: Dendrogramm verschiedener CNG-Kanaluntereinheiten. Die abgeleiteten Aminosäuresequenzen aller vier *Drosophila* CNG-Kanaluntereinheiten (DmCNGA, DmCNGB, DmCNG3, DmCNG4) werden mit der α -Untereinheit des menschlichen CNG-Kanals aus Sehstäbchen (hCNGA1), aus Sehzapfen (hCNGA3) und aus dem olfaktorischen Epithel (hCNGA2, hCNGA4), der β -Untereinheit des menschlichen CNG-Kanals aus Sehstäbchen (hCNGB1) sowie aus Sehzapfen (hCNGB3) verglichen. Die Zuordnung zu den beiden Kanaltypen (α oder β) ist auf der rechten Seite angegeben.

Das Ergebnis dieser Sequenzvergleiche ist, dass neben dem DmCNGA- auch das DmCNG4-Protein den α -Untereinheiten der menschlichen CNG-Kanäle am ähnlichsten ist. Das DmCNGB-Protein gehört in die Gruppe der β -Untereinheiten. Das DmCNG3-Protein kann weder den α - noch den β -Untereinheiten eindeutig zugeordnet werden. Die Homologie innerhalb der Gruppe der *Drosophila* CNG-Kanaluntereinheiten liegt zwischen $\sim 55\%$ (DmCNGB zu DmCNG4) und $\sim 70\%$ (DmCNGA zu DmCNG4). Wie bereits angesprochen, sind die N- und C-Termini der vier *Drosophila* Proteine sehr verschieden. Sie besitzen nur $\sim 5\%$ (DmCNGA zu DmCNG3) bis $\sim 9\%$ (DmCNGA zu DmCNGB) homologe (= identische und konservativ ausgetauschte) Aminosäuren.

Die Gemeinsamkeiten und Unterschiede in der Kernregion (S1 - cNMP-Bindestelle) der *Drosophila* CNG-Kanaluntereinheiten sollen in einem weiteren Sequenzalignment verdeutlicht werden (Abb. 6).

		S1			
DmCNGA	M (99)	DPTLQSHYRWLAIIVSLAVLYNIIFVVGRAVFWWEINKSAPAF		141	
DmCNGB	M (457)	DPQGIYISWLCVVSLSFLYNAWVILPLRASFPFQTKENTNI		499	
DmCNG3	M (117)	NPDENFYFYWLMMLTVCVLYNLWTLIVRQSFPELQOSVPTF		159	
DmCNG4		MVVSMAFLYNFWVIIYRFAFQELNRRRTIAI		30	
		S2			
DmCNGA		WYTLDYLCDFIYLLDTLV-HMHEGFLDQGLIVRDAFRLRRHYFHTKGYL		190	
DmCNGB		WLACDFCADIIYLLDVVFFKHRVMYLFEGFWVKKNLTKRKNYMRKLQFKL		549	
DmCNG3		WLICDSMTDVVFILDIIV-QLRTGYLEQGLMVYDDRKLACHYVHSRDFIF		208	
DmCNG4		WFCLDYLSDFLYLIDILF-HFRTGYLEDGVLQTDALKLRTHYMNSTIFYI		79	
		S3	S4		
DmCNGA		DVLSMLPTDLAYIWWPPETCSSLYLPC-PVIIVRLNRLLRINRLWEWFDRT		239	
DmCNGB		DLLALLPLELLLYF-----KLGTAQAVWLRFPFFFKIQSFWEVFRLL		589	
DmCNG3		DMIALIPLDLLQL-----KMGTHPL-LRFRFFKVKYRSVRFYYIV		247	
DmCNG4		DCLCLLPLDFLYL-----SIGFNSI-LRSFRLVKIYRFWAFMDRT		118	
		S5			
DmCNGA		ETATCYPNAFRIKVVLAIVLVIHWNACMYFAISYEIGFSSDSWVYNLNG		289	
DmCNGB		DRVISSPHFVRVAKTLTYMLYMIHITAALYYAYS DYQGLGQNRWVFSGKG		639	
DmCNG3		ESRTVWPNLWRVVNLIHILLILAHWFQCFYELLSEAEGFQCD-WVYPYRP		296	
DmCNG4		ERHTNYPNLFIRSTALIHVLLVIHFWNGCLYHIHKNNGFGSRNWVY--HD		166	
		Pore	S6		
DmCNGA		TRNNTLQROYIYSFYWSTLTLTTIGETPTPENDVEYLFVVADFLAGVLI		339	
DmCNGB		-----HPYVRCFAFATKTATSICKNPKPERQGEYVFMVAVLWGVFV		682	
DmCNG3		GDYPTLTKYLGSLYWSTLTLTTIGDLPTPETNAEYIFTIVSYLIGVFIF		346	
DmCNG4		SESADVVKQYLQSYWCTLALTTIGDLPKPRSKGEYVFLQLLFLGLMLF		216	
DmCNGA		ATIVGNIGSMISNMNVARVEFQNRMDGVKQYMAFRRVGHLEEARVIRWFA		389	
DmCNGB		ALLIGQIRDIISTATRKNKHEYRQLEDETLEYMRRNLNSQEVQSRVKMWFQ		732	
DmCNG3		ATIVGQVGNVITNRNANRLEFERLLDGAKTMYRHHKVPGGMKRRVLRWYD		396	
DmCNG4		ATVLGHVANIVTSVSAARKEFQAKLDGVKTYMRMRVPHLQVKVIKWF		266	
DmCNGA		YTWSQ---SCALDEERVLAALPDKLKAETAIQVHMDTLKQVRI FHDTEPG		436	
DmCNGB		FTWEQQRT---LDESNILDALPINLKTDAISVHIQTLKSKVQLFADCEEA		779	
DmCNG3		YSWSRGRIOCGGDINTALGLLPDKLKTTELALHVNLSVLKQVTIFQECOPE		446	
DmCNG4		YLWLT---QKCSDEERAVSCLPDKLKAETAINVHMDTLKRVEIFONTEAG		313	
DmCNGA		LLEALVVLKLLQVFSPPGDIYCRKCDVGKEMYIVKRGKLSVVGDD-CITVL		485	
DmCNGB		LLRDVLVLI RAVTFILPGDFVCRKCEVGREMYIVKLGQVQVMGPPSSDVVL		829	
DmCNG3		FLHDLVLKMKAYIFTPGDSICRKGCVAREMFIADGILEVLSE-TGK-VL		494	
DmCNG4		FLCELVLRLRPVLFSPGDIYCRKCEVVGKEMYIVNRCRLQVVDN-GKTVM		362	
		cNMP-Bindestelle			
DmCNGA		ATLCAGSVFGEVSVLEIACNRTGNRRTANVRS LGYSDFCLAKRDLWETL		535	
DmCNGB		ATLTFEGSVFGEISLLGING---ADRRTADVRSKGYSNLFVLSKSDLNEVI		876	
DmCNG3		TTMKAGDFGEIGILNLDGL---NRRTADVRSVGYSELSLSREDVLAAM		541	
DmCNG4		ASLKAGSYFGEISILNM-GT-ACNRTASVRSVGYSDLFVLSKDKMDWDL		410	
DmCNGA		SDYPEARSTLTQRCQLLRKDGLLDE	(104)	665	
DmCNGB		AYYPTAQAILKKRARQLMRKNAARER	(135)	1037	
DmCNG3		KDYPAQEIILQTLGRKRLMEVRCVVK	(896)	1463	
DmCNG4		KEYPAARVRLSIAVKRLEKYKKAPL	(246)	682	

Abb. 6: Vergleich der abgeleiteten Aminosäuresequenzen der *Drosophila* CNG-Kanalgene. Das „Multiple Sequence Alignment“ wurde nach der Methode von FENG & DOOLITTLE (1987) mit dem Programm Clustal W (THOMPSON et al., 1994) durchgeführt. Der Sequenzvergleich ist auf die gemeinsame Kernregion der potenziellen Kanaluntereinheiten beschränkt. Die Anzahl der nicht abgebildeten Aminosäuren im N- und C-Terminus ist in Klammern angegeben. Die Lage der transmembranalen Segmente (S1-S6), der Pore und der cNMP-Bindestelle ist durch einen Balken über den Sequenzen angegeben. Die Grenzen dieser Bereiche orientieren sich an der DmCNGA-Sequenz (BAUMANN et al., 1994). Die Grenzen der cNMP-Bindestelle wurden aus KAUPP & SEIFERT (2002) übernommen. Die Aminosäureposition ist rechts neben der Sequenz angegeben. Bezogen auf die DmCNGA-Sequenz sind identische Aminosäuren schwarz und konservative Aminosäureaustausche grau unterlegt. Konservative Austausche nach DAYHOFF et al. (1978) sind (P, A, G, S, T), (M, I, L, V), (H, R, K), (D, E, N, Q), (F, W, Y). Zur Optimierung des Sequenzvergleichs wurden Lücken (-) eingefügt.

Die Sequenzen von Membranproteinen sind vor allem im Bereich der Transmembransegmente hoch konserviert. Dies trifft auch für die vier CNG-Kanaluntereinheiten zu. In den Transmembransegmenten S1, S2, S5 und S6 sind die meisten Positionen von identischen bzw. konservativ ausgetauschten Aminosäuren besetzt. Auch die Pore ist zwischen den vier *Drosophila* Proteinen konserviert. Für die Funktion der CNG-Kanäle ist die cNMP-Bindestelle besonders wichtig. Hier binden die zyklischen Nukleotide und bewirken die Öffnung des Kanals. Auch in der cNMP-Bindestelle sind die vier *Drosophila* Proteine zueinander sehr ähnlich. Viele Aminosäurepositionen, die für die Bindung der Liganden bzw. die Ausbildung der Sekundärstruktur benötigt werden, sind konserviert.

Neben den beschriebenen Gemeinsamkeiten gibt es jedoch auch deutliche Unterschiede zwischen den Aminosäuresequenzen. Die DmCNGB-Sequenz hat als einzige Untereinheit im Porenbereich zwei Lysin-Reste (K651/658; Abb. 6) an Positionen, die in den drei anderen Proteinsequenzen entweder von der Aminosäure Leucin oder von einer negativ geladenen Aminosäure (D322/D192 in DmCNG3/DmCNG4 bzw. E315 in DmCNGA; Abb. 6) besetzt sind. Die Leucin-Position ist auch in der Wirbeltier β -Untereinheit (bCNGB1) von einem Lysin besetzt. In den α -Untereinheiten der Wirbeltier CNG-Kanäle bilden die Carboxylgruppen der Glutamat-Reste (bspw. E363 in bCNGA1) eine hochaffine Ca^{2+} -Bindestelle aus (ROOT & MACKINNON, 1993; EISMANN et al., 1994), die die Ca^{2+} -Permeabilität der CNG-Kanäle kontrolliert. Diese Position ist in der Wirbeltier bCNGB1-Untereinheit von einer ungeladenen Aminosäure (G962) und in der DmCNGB-Sequenz von einer positiv geladenen Aminosäure (K658) besetzt.

Die Ergebnisse der bisher durchgeführten Sequenzvergleiche können so interpretiert werden, dass DmCNGB die β -Untereinheit eines funktionellen *Drosophila* CNG-Kanals ist. Deshalb sollte dieses Gen kloniert werden.

3.1.3 Klonierung des *Dmcingb*-Gens

Vollständige cDNA-Klone sind bisher nur vom *Dmcinga*- (BAUMANN et al., 1994) und vom *Dmcing3*-Gen (MIYAZU et al., 2000) kloniert worden. Ein Sequenzvergleich der *Dmcing3*-cDNA (MIYAZU et al., 2000) mit der *Drosophila* Datenbank (ADAMS et al., 2000) zeigt allerdings, dass in der Datenbank ein *Dmcing3*-Gen angegeben ist, das einen anderen C-Terminus besitzt. Bis zur Aminosäureposition 1.453 sind DmCNG3 und „DmCNG3-Datenbank“ identisch. Im DmCNG3-Protein schließen sich noch 10 Aminosäuren bis zum Sequenzende an. Im Vergleich dazu besitzt die „DmCNG3-Datenbank“-Sequenz 404 Aminosäuren bis zum Sequenzende. Wie bereits oben besprochen, kodiert das *Dmcing4*-Gen für ein Protein, das im S1-Segment beginnt (\Rightarrow 3.1.1, Abb.4).

Die kodierenden Gensequenzen, die in der *Drosophila* Datenbank abgelegt sind, wurden ausschließlich mit Computerprogrammen ermittelt und nicht durch die Sequenzierung der entsprechenden cDNA-Klone experimentell überprüft. Deshalb könnte das *Dmcingb*-Gen ebenfalls falsch annotiert sein. Diese Möglichkeit wurde bei der Klonierungsstrategie berücksichtigt.

Die Nukleinsäuresequenz der *Dmcingb*-cDNA (ADAMS et al., 2000; CG17922) ist 3.114 bp lang und kodiert für ein 1.037 Aminosäuren langes Protein. Die cDNA sollte mit PCR auf cDNA-Präparationen adulter *Drosophila* Köpfe amplifiziert und parallel aus einer Kopf-cDNA-Bibliothek kloniert werden. Als Sonde zum Durchmustern der Bibliothek wurde ein PCR-Fragment eingesetzt, das dem C-Terminus des DmCNGB-Proteins entspricht.

Zur Herstellung der Sonde wurde eine PCR mit den Oligonukleotiden #2705 und #2699 auf einer *Drosophila* Kopf-cDNA-Präparation durchgeführt. Das 5'-gelegene Oligonukleotid #2705 liegt über einer PvuI-Schnittstelle und das Gegenoligonukleotid #2699 führt am 3'-Ende des Fragments eine EcoRI-Schnittstelle ein. Das

amplifizierte C-terminale Fragment des *Dmcn gb*-Gens wurde in EcoRV-geschnittenen pBluescript SK⁻ (pB)-Vektor ligiert (*Dmcn gb*-3'-pB).

Das Konstrukt wurde mit den Restriktionsenzymen EcoRI und HindIII geschnitten, das *Dmcn gb*-Fragment isoliert und radioaktiv markiert (\Rightarrow 2.5.5). Mit dieser Sonde wurde eine *Drosophila* Kopf-cDNA-Bibliothek durchmustert. Die DNA der vereinzelt, positiven λ -Phagen wurde präpariert (\Rightarrow 2.5.7) und mit dem Restriktionsenzym EcoRI geschnitten. Die Fragmente wurden in den EcoRI-geschnittenen pB-Vektor ligiert und sequenziert. Die klonierte cDNA enthält 1.163 bp im 3'-Bereich des *Dmcn gb*-Gens.

Die fehlenden 5'-terminalen Bereiche des Gens wurden mit mehreren PCR-Reaktionen auf cDNA-Präparationen adulter *Drosophila* Köpfe amplifiziert. Es wurden verschachtelte PCR-Experimente durchgeführt (Abb. 7). Als Matrize für die PCR wurde sowohl „random geprimte“ als auch „oligo-dT geprimte“ cDNA benutzt (\Rightarrow 2.4.3). Interne Schnittstellen des Gens wurden verwendet, um die Teilfragmente später zusammenfügen zu können. Am 5'-Ende wurde eine Mutagenese-PCR durchgeführt, um die Restriktionsschnittstelle HindIII und eine Kozak-Konsensussequenz (ideale ribosomale Bindestelle: CCACC; KOZAK, 1984) einzufügen. Alle PCR-Produkte wurden zunächst in pB-Vektoren kloniert und sequenziert.

Zunächst wurde eine PCR mit den Oligonukleotiden #2694 und #2752 durchgeführt (Abb. 7). Sie lieferte das PCR-Produkt Fragment I. Das zweite *Dmcn gb*-Genfragment (Fragment II) wurde in zwei aufeinander folgenden PCR-Ansätzen amplifiziert. Die Produkte der ersten PCR mit den Oligonukleotiden #2751 und #2754 dienen als Matrize für eine weitere PCR mit den Oligonukleotiden #2751 und #2695 (Abb. 7). Das dritte Fragment (III) wurde durch eine PCR mit den Oligonukleotiden #2696 und #2754 amplifiziert. Das PCR-Produkt wurde mit den Restriktionsenzymen BamHI und PstI geschnitten und in den identisch geschnittenen pB-Vektor ligiert. Der noch fehlende Sequenzbereich zwischen Fragment III und dem aus der cDNA-Bibliothek isolierten cDNA-Fragment wurde durch eine PCR mit den Oligonukleotiden #2753 und #2697 amplifiziert.

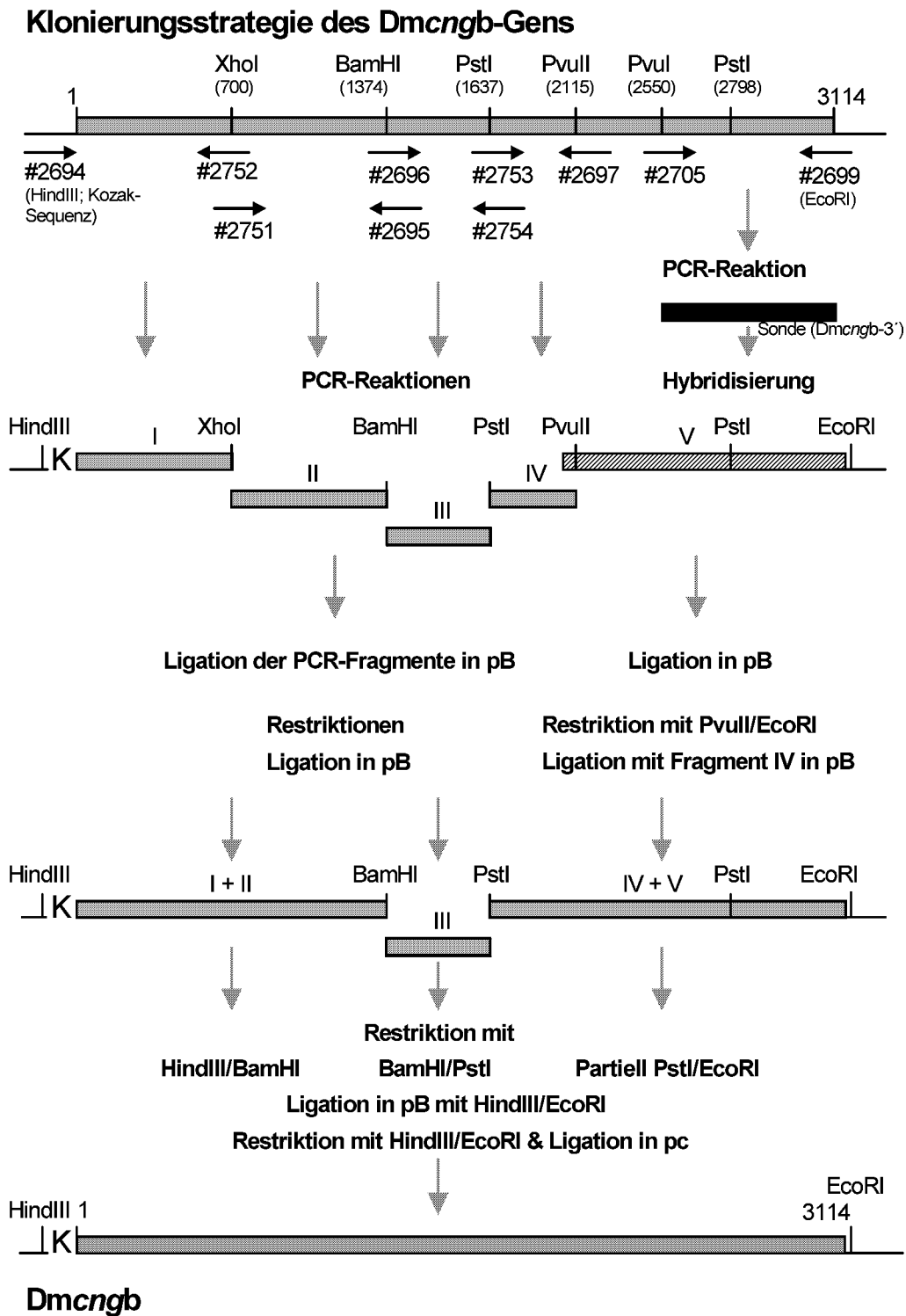


Abb. 7: Schematische Darstellung der Klonierung des *Dmcngb*-Gens. Erklärung im Text. Die Positionen wichtiger, zur Klonierung benutzter Schnittstellen sind angegeben. Der Beginn der Sequenz ist mit 1, das Ende mit Position 3114 bezeichnet. Die PCR-Fragmente sind als graue Balken, das zur Hybridisierung eingesetzte PCR-Fragment (Sonde) als schwarzer Balken dargestellt. Das aus der Bibliothek erhaltene 3'-cDNA-Fragment ist schraffiert dargestellt. Die Bezeichnung der Oligonukleotide (Sequenzen siehe Anhang) und ihre Lage im *Dmcngb*-Gen sind angegeben. Mutagenese-PCR-Reaktionen sind unter den Oligonukleotiden angegeben. Verwendete Abkürzungen: K („Kozak-Sequenz“: CCACC; KOZAK, 1984); pB (pBluescript SK); pc (pcDNA1.1/Amp).

Die vier PCR-Klone (PCR-Fragment I - IV) wurden mit dem 3'-cDNA-Fragment in mehreren Ligationsschritten zum kompletten *Dmcn gb*-Gen zusammengefügt. Fragment I wurde mit den Restriktionsenzymen HindIII und XhoI und Fragment II mit XhoI und BamHI aus den pB-Vektoren ausgeschnitten. Die Fragmente wurden in den HindIII- und BamHI-geschnittenen pB-Vektor kloniert. Fragment IV wurde mit den Restriktionsenzymen PstI und PvuII, der cDNA-Klon (Fragment V) mit PvuII und EcoRI geschnitten. Die Fragmente wurden in einen EcoRI- und PstI-geschnittenen pB-Vektor ligiert.

Der Subklon mit den Fragmenten I und II wurde mit den Restriktionsenzymen HindIII und BamHI geschnitten. Fragment III wurde mit den Enzymen BamHI und PstI ausgeschnitten. Der Klon mit den Fragmenten IV und V wurde mit EcoRI linearisiert, partiell mit PstI verdaut und das benötigte 3'-Fragment gelelektrophoretisch abgetrennt und isoliert (\Rightarrow 2.3.8). Die drei Restriktionsfragmente (HindIII/BamHI), (BamHI/PstI) und (PstI/EcoRI) wurden in einen HindIII/EcoRI-geschnittenen pB-Vektor ligiert.

Das vollständige *Dmcn gb*-Gen wurde anschließend mit den Restriktionsenzymen HindIII und EcoRI aus pB ausgeschnitten, gelgereinigt und in den HindIII/EcoRI-geschnittenen Expressionsvektor pcDNA1.1/Amp (pc) ligiert. Das Konstrukt wurde als *Dmcn gb* bezeichnet.

Die Sequenzierung aller Teilkclone ergab, dass 40 Nukleotide von der veröffentlichten Datenbanksequenz abweichen. Diese Abweichungen führen in 9 Fällen zu Austausch auf Aminosäureebene. Davon sind sechs Austausche konservativ (T71S, P274S, E331Q, E388D, A898T, A979S). Ein nicht konservativer Austausch (R857Q) befindet sich innerhalb des cNMP-Bindestellenbereichs. Der Austausch betrifft aber keine für die Ausbildung der Struktur oder für die Bindung des Liganden essentielle Aminosäureposition. Je ein weiterer, nicht konservativer Austausch liegt im N-Terminus (R419G) und im C-Terminus (S1006F). Die Abweichungen in den Nukleinsäuresequenzen resultieren vermutlich daher, dass ich den Fliegenstamm *Oregon R* verwendet habe, die Klonierung und Sequenzierung des *Drosophila* Genoms (ADAMS et al., 2000) aber mit dem Wildtyp-Fliegenstamm *Canton S* erfolgte.

3.1.4 Modifizierung der *Dmcng*-Klone für die heterologe Expression in HEK293-Zellen

Nach der Klonierung des *Dmcnga*-Gens sind die elektrischen Eigenschaften des homooligomeren Kanals in unterschiedlichen Expressionssystemen untersucht worden (BAUMANN et al., 1994). Antikörper gegen das Kanalprotein standen nicht zur Verfügung, so dass weder die Größe einer DmCNGA-Kanaluntereinheit noch das Verteilungsmuster im Gewebe bestimmt werden konnte.

Eine gute Methode, die Fremdgen-Expression in Ammenzellen (HEK293-Zellen) zu kontrollieren, ist die Verwendung eines spezifischen Antigen-Epitops, das an den Leserahmen des gewünschten Gens angefügt wird und mit kommerziellen Antikörpern nachgewiesen werden kann. Gut charakterisierte und hochaffine Antikörper stehen bspw. gegen ein 9 Aminosäuren langes Peptid des Hämagglutinin A Proteins (HA-Tag; Aminosäuresequenz: YPYDVPDYA) und gegen ein (Histidin)₆-Epitop (His-Tag) zur Verfügung.

Damit die Expression des DmCNGA-Proteins in HEK293-Zellen bestimmt werden konnte, sollte hinter die kodierende Sequenz von *Dmcnga* ein HA-Tag kloniert werden.

Nach der Klonierung des *Dmcngb*-Gens (\Rightarrow 3.1.3) sollte überprüft werden, ob diese Kanaluntereinheit *in vitro* funktionelle CNG-Kanäle bildet. Da auch gegen das DmCNGB-Protein keine spezifischen Antikörper zur Verfügung stehen, sollte hinter die kodierende Sequenz von *Dmcngb* ebenfalls ein HA-Tag kloniert werden.

Die Expression des *Dmcng3*-Gens wurde mit Northern Blots, RT-PCR's, *in situ* Hybridisierungen und immunhistochemischen Methoden untersucht (MIYAZU et al., 2000). Das Gen wird während der gesamten *Drosophila* Entwicklung transkribiert. In adulten Tieren wurde die mRNA und das Protein im Gehirn, den optischen Loben, den Glomeruli der antennalen Loben und in den Pilzkörpern nachgewiesen. In Photorezeptoren und olfaktorischen Neuronen wurde das Protein nicht detektiert (MIYAZU et al., 2000). Die elektrischen Eigenschaften der DmCNG3-Untereinheit sind nicht bekannt, weil die Expression in HEK293-Zellen fehlschlug (MIYAZU et al., 2000). Für die gemeinsame Expression mit anderen Untereinheiten der *Drosophila* CNG-Kanäle (DmCNGA, DmCNGB) wurde mir der cDNA Klon, der für DmCNG3 kodiert,

von Herrn Prof. Sokabe (Nagoya Universität, Japan) zur Verfügung gestellt. Um die Expression des DmCNG3-Proteins in HEK293-Zellen bestimmen zu können, sollte hinter die kodierende Sequenz von *Dmcng3* ein His-Tag kloniert werden.

3.1.4.1 Anfügen des Hämagglutinin A Epitops (HA-Tag) an die *Dmcnga*-Sequenz

Die Sequenz des HA-Tag Epitops sollte an den C-Terminus des DmCNGA-Proteins angefügt werden. Dazu wurde eine Mutagenese-PCR mit den Oligonukleotiden #594 und #2503 auf dem *Dmcnga*-Expressionsklon (*Dmcnga*-pcDNA1.1/Amp) durchgeführt (Abb. 8). Am 3'-Ende wird das Stopp-Kodon entfernt und gleichzeitig eine *DraI*-Schnittstelle eingefügt. Das PCR-Fragment wurde mit den Restriktionsenzymen *EcoRI* und *DraI* geschnitten, gelgereinigt und in *EcoRI*- und *EcoRV*-geschnittenen pBK-Et-Stop-Vektor (von Dr. Renate Gauss zur Verfügung gestellt; GAUSS, 1998) ligiert. Dieser Vektor enthält ab der *EcoRV*-Schnittstelle die kodierende Sequenz für das HA-Tag Epitop. Das Konstrukt wurde als *Dmcnga*-3'-pBK-Et-Stop bezeichnet.

Das 3'-Fragment des *Dmcnga*-Gens mit angefügter HA-Tag Sequenz wurde sequenziert. Es wurde mit den Restriktionsenzymen *BspI* und *XbaI* aus dem *Dmcnga*-3'-pBK-Et-Stop-Konstrukt ausgeschnitten. Das 3'-Ende des *Dmcnga*-pcDNA1.1/Amp-Klons wurde mit den Restriktionsenzymen *BspEI* und *XbaI* ausgeschnitten und gelelektrophoretisch abgetrennt. Der Vektor mit dem 5'-Abschnitt des *Dmcnga*-Gens wurde aus dem Gel eluiert (\Rightarrow 2.3.8) und mit dem *BspEI/XbaI*-geschnittenen PCR-Fragment ligiert. Das Konstrukt wurde als *Dmcnga*-HA bezeichnet.

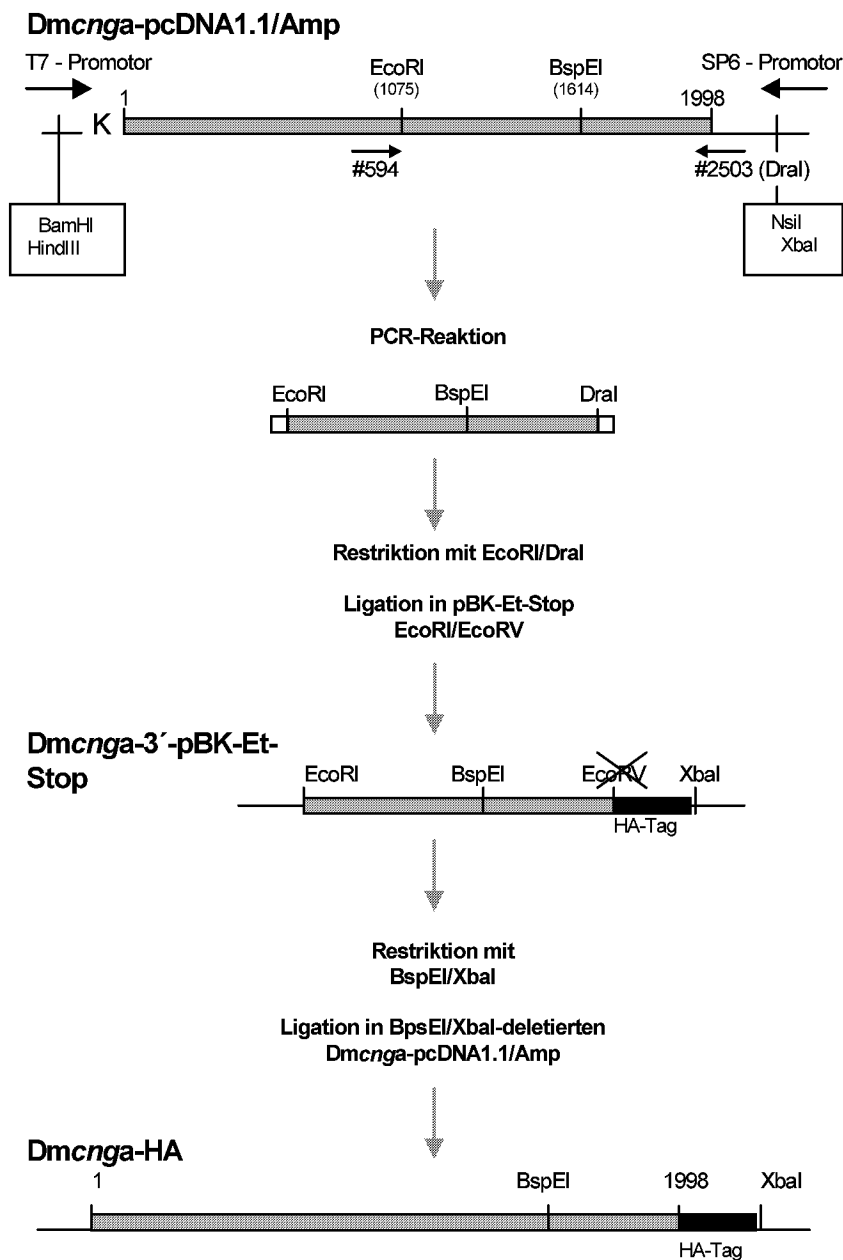


Abb. 8: Anfügen des Hämagglutinin A Epitops (HA-Tag) an die Dmcnga-Sequenz (schematisch). Erklärung im Text. Die Lage des *Dmcnga*-Gens im Vektor ist durch die Orientierung der Promotoren und flankierenden Restriktionsschnittstellen dargestellt. Die „Kozak-Sequenz“ (CCACC; KOZAK, 1984) ist mit K bezeichnet. Die Positionen wichtiger, zur Klonierung benutzter Schnittstellen sind angegeben. Der Beginn der Sequenz ist mit 1, das Ende mit Position 1998 bezeichnet. Die PCR-Fragmente sind als graue Balken, Sequenzüberhänge aus PCR-Reaktionen als weiße und das HA-Tag als schwarzer Balken dargestellt. Die Bezeichnung der Oligonukleotide (Sequenzen siehe Anhang) und ihre Lage im *Dmcnga*-Gen ist angegeben. Eine Mutagenese-PCR-Reaktion ist hinter dem Oligonukleotid angegeben. Die bei der Klonierung verlorengegangene Restriktionsschnittstelle ist durchgestrichen.

3.1.4.2 Anfügen des Hämagglutinin A Epitops (HA-Tag) an die *Dmcngb*-Sequenz

Die Sequenz des HA-Tag Epitops sollte auch an den C-Terminus des DmCNGB-Proteins angefügt werden. Dazu wurde eine Mutagenese-PCR mit den Oligonukleotiden #2705 und #2968 auf dem *Dmcngb*-Expressionsklon (*Dmcngb*-pcDNA1.1/Amp) durchgeführt (Abb. 9). Am 3'-Ende wird das Stopp-Kodon entfernt. Die Enden des PCR-Fragmentes wurden geglättet und phosphoryliert. Das Fragment wurde in EcoRV-geschnittenen pBK-Et-Stop-Vektor (\Rightarrow 3.1.4.1) ligiert. Das Konstrukt wurde als *Dmcngb*-3'-pBK-Et-Stop bezeichnet.

Das 3'-Fragment des *Dmcngb*-Gens mit angefügter HA-Tag-Sequenz wurde sequenziert. Es wurde mit den Restriktionsenzymen HindIII und XbaI aus dem *Dmcngb*-3'-pBK-Et-Stop-Konstrukt ausgeschnitten. Der Klon *Dmcngb*-pcDNA1.1/Amp wurde mit dem Restriktionsenzym XbaI geschnitten und anschließend mit HindIII partiell verdaut. Das Fragment wurde gelelektrophoretisch abgetrennt. Der Vektor mit dem 5'-Fragment wurde aus dem Gel eluiert und mit dem HindIII/XbaI-geschnittenen 3'-Fragment ligiert. Das Konstrukt wurde als *Dmcngb*-HA bezeichnet.

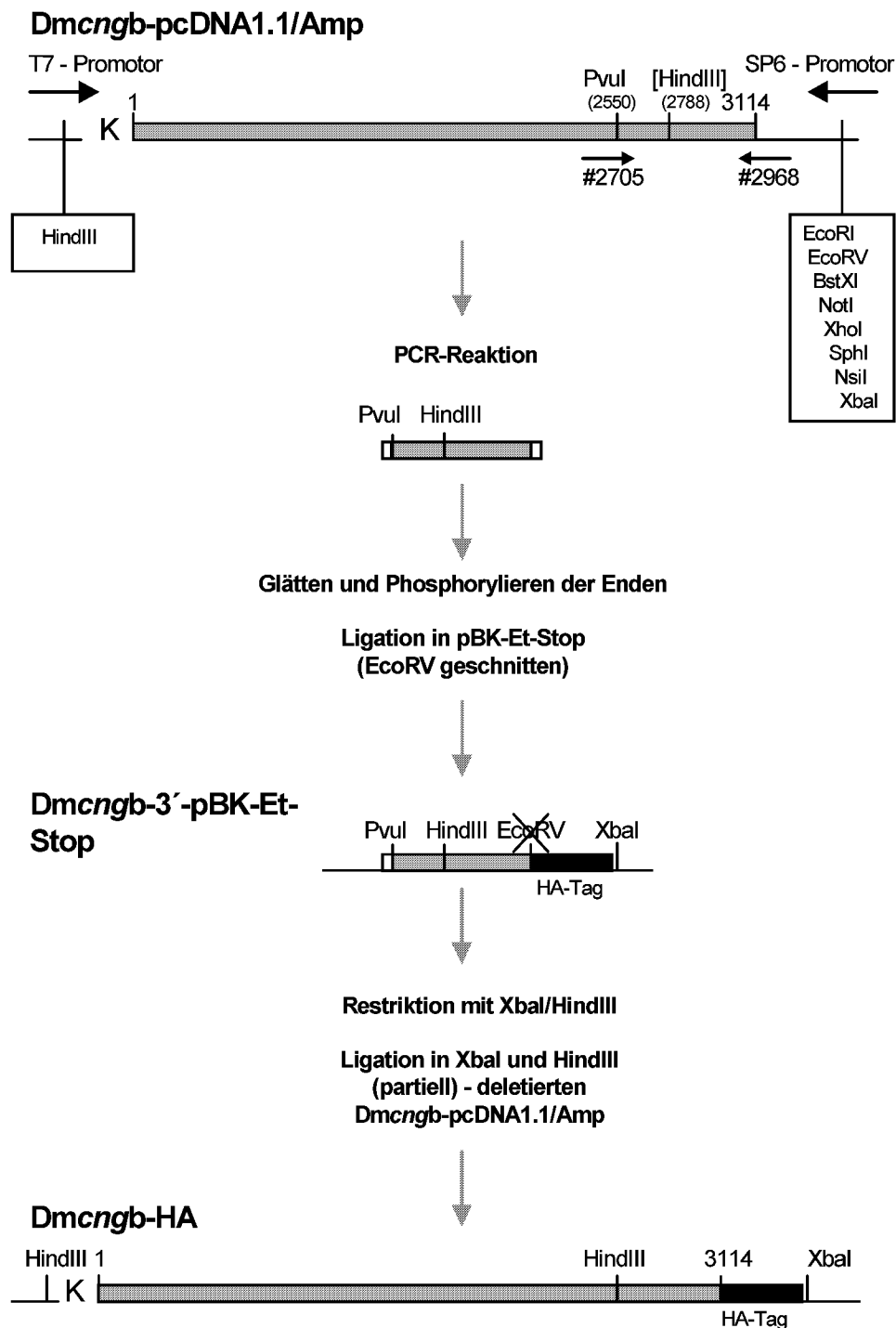


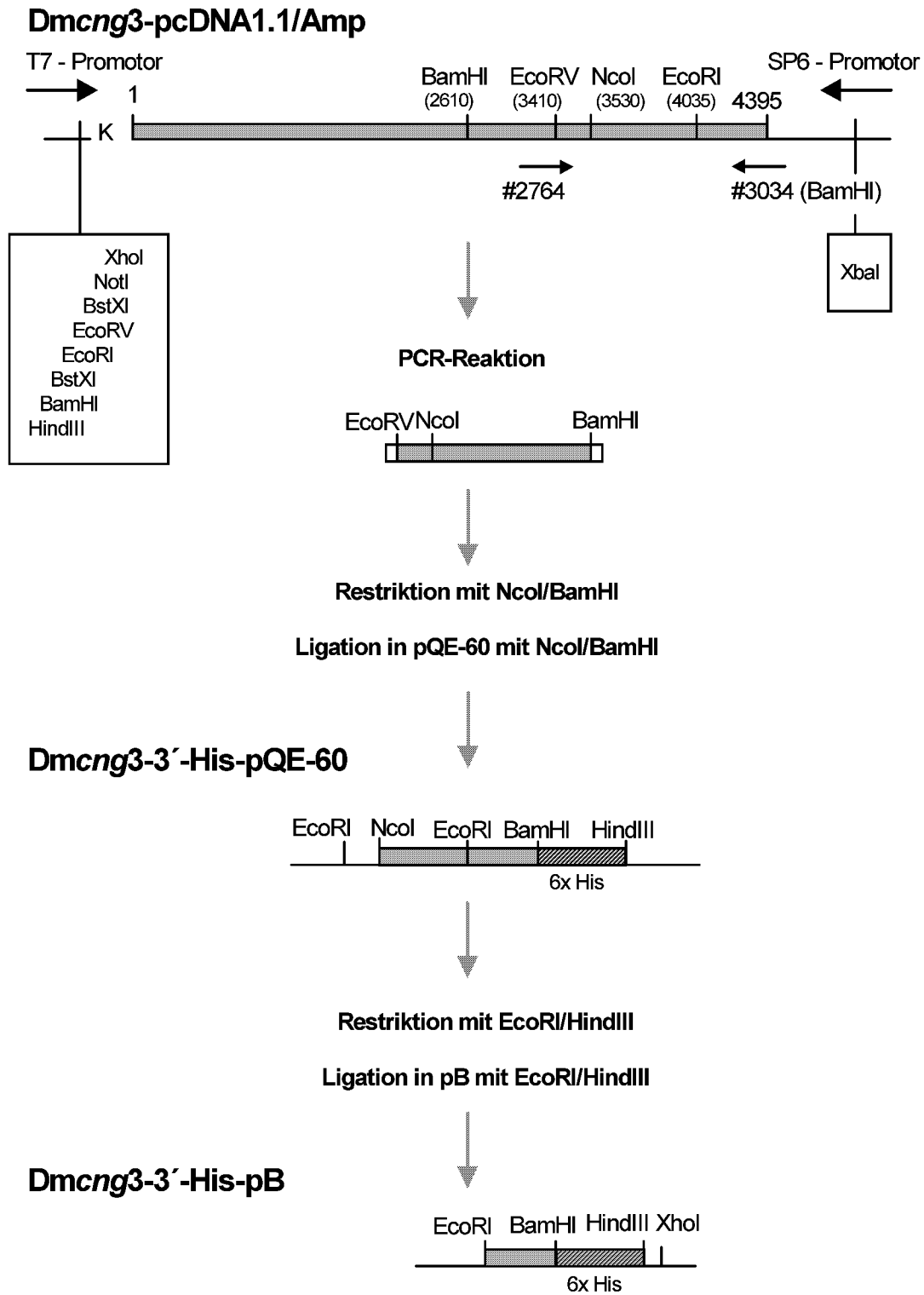
Abb. 9: Anfügen des Hämagglutinin A Epitops (HA-Tag) an die Dmcngb-Sequenz (schematisch). Erklärung im Text. Die Lage des Dmcngb-Gens im Vektor ist durch die Orientierung der Promotoren und flankierenden Restriktionsschnittstellen dargestellt. Die „Kozak-Sequenz“ (CCACC; KOZAK, 1984) ist mit K bezeichnet. Die Positionen wichtiger, zur Klonierung benutzter Schnittstellen sind angegeben. Der Beginn der Sequenz ist mit 1, das Ende mit Position 3114 bezeichnet. Die PCR-Fragmente sind als graue Balken, Sequenzüberhänge aus PCR-Reaktionen als weiße und das HA-Tag als schwarzer Balken dargestellt. Die Bezeichnung der Oligonukleotide (Sequenzen siehe Anhang) und ihre Lage im Dmcngb-Gen ist angegeben. Die bei der Klonierung verlorengegangene Restriktionsschnittstelle ist durchgestrichen.

3.1.4.3 Anfügen des (Histidin)₆-Epitops (His-Tag) an die *Dmcng3*-Sequenz

An den C-Terminus der *Dmcng3*-Sequenz sollte ein (Histidin)₆-Epitop (His-Tag) angefügt werden. Dazu wurde eine Mutagenese-PCR mit den Oligonukleotiden #2764 und #3034 auf dem Ausgangsklon *Dmcng3*-pcDNA1.1/Amp durchgeführt (Abb. 10). Das Oligonukleotid #3034 führt am 3'-Ende eine BamHI-Restriktionsschnittstelle ein. Das PCR-Fragment wurde mit den Restriktionsenzymen NcoI und BamHI geschnitten und in den NcoI- und BamHI-geschnittenen Vektor pQE-60 (Qiagen, Hilden) ligiert. Dieser Vektor besitzt hinter der Klonierungsstelle die kodierende Sequenz für sechs Histidine (His-Tag). Darauf folgt ein Stopp-Kodon. Das Konstrukt wurde als *Dmcng3*-3'-His-pQE-60 bezeichnet.

Das 3'-Fragment des *Dmcng3*-Gens mit angefügter His-Tag-Sequenz wurde aus dem Konstrukt mit den Restriktionsenzymen EcoRI und HindIII ausgeschnitten und in pBluescript SK⁻ (pB)-Vektor ligiert. Der Klon wurde als *Dmcng3*-3'-His-pB bezeichnet. Mit den Restriktionsenzymen XhoI und EcoRI wurde das Fragment aus dem *Dmcng3*-3'-His-pB-Konstrukt ausgeschnitten, gelgereinigt und in XhoI- und EcoRI-geschnittenen pcDNA1.1/Amp (pc)-Vektor ligiert. Das Konstrukt wurde als *Dmcng3*-3'-His-pc bezeichnet.

Das 5'-Fragment des *Dmcng3*-Gens wurde mit EcoRI aus dem Ausgangsklon (*Dmcng3*-pcDNA1.1/Amp) ausgeschnitten. Anschließend wurde der Vektor mit dem 3'-Fragment des *Dmcng3*-Gens und angefügtem His-Tag (*Dmcng3*-3'-His-pc) mit EcoRI linearisiert und mit dem 5'-Fragment ligiert. Das Konstrukt wurde als *Dmcng3*-His bezeichnet.



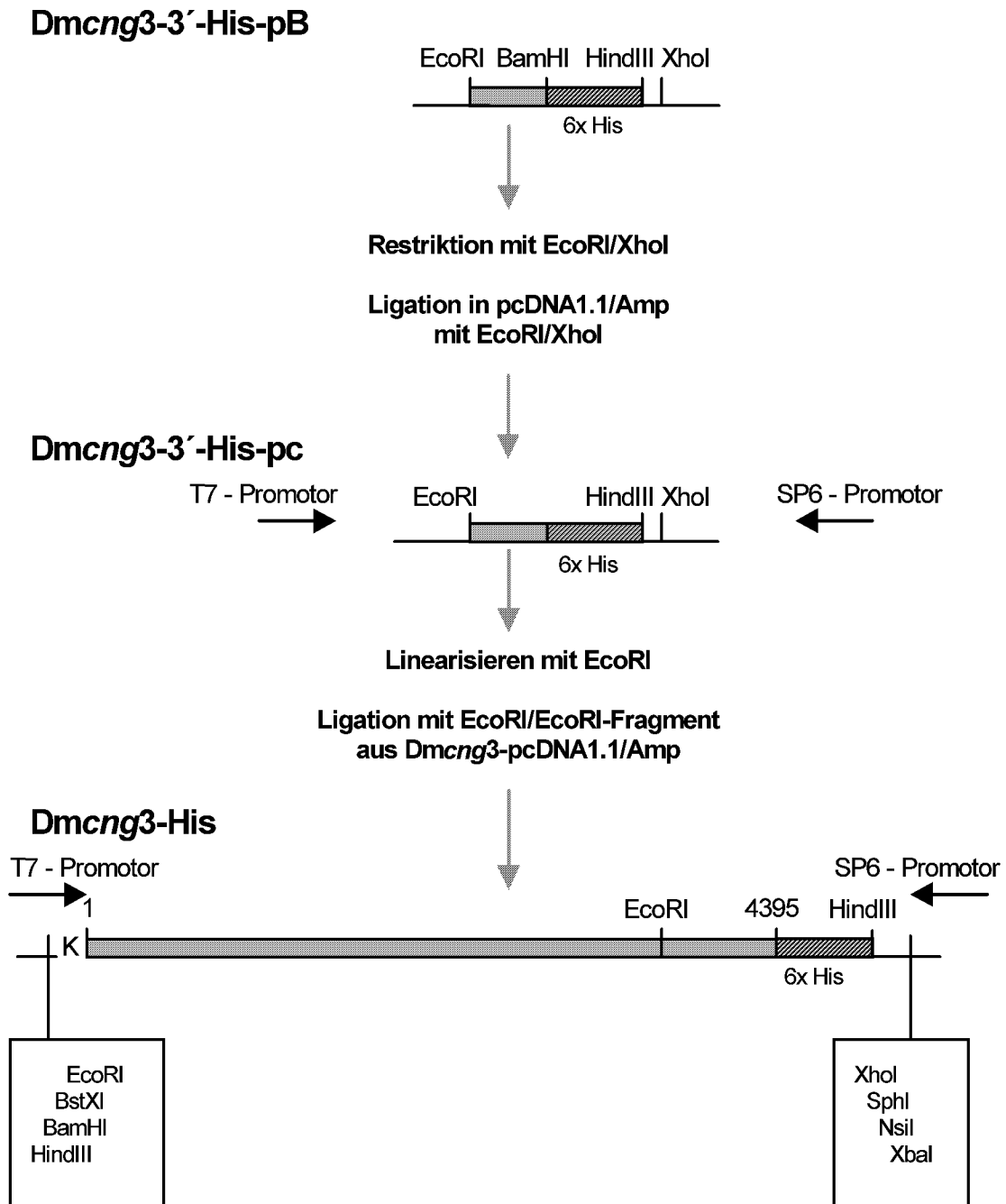


Abb. 10: Anfügen des (Histidin)₆-Epitops (His-Tag) an die Dm $cng3$ -Sequenz (schematisch). Erklärung im Text. Die Lage des Dm $cng3$ -Gens im Vektor ist durch die Orientierung der Promotoren und flankierenden Restriktionsschnittstellen dargestellt. Die „Kozak-Sequenz“ (CCACC; KOZAK, 1984) ist mit K bezeichnet. Die Positionen wichtiger, zur Klonierung benutzter Schnittstellen sind angegeben. Der Beginn der Sequenz ist mit 1, das Ende mit Position 4395 bezeichnet. Die PCR-Fragmente sind als graue Balken, Sequenzüberhänge aus PCR-Reaktionen als weiße und das His-Tag als gestreifter Balken dargestellt. Die Bezeichnung der Oligonukleotide (Sequenzen siehe Anhang) und ihre Lage im Dm $cng3$ -Gen ist angegeben.

In diesem Abschnitt wurde die Suche nach Dm $cnga$ -homologen Genen in der Datenbank des vollständig sequenzierten *Drosophila* Genoms (ADAMS et al., 2000)

vorgestellt. Drei weitere Gensequenzen wurden identifiziert, die für potenzielle CNG-Kanaluntereinheiten kodieren. Die abgeleiteten Aminosäuresequenzen sind im Bereich der Transmembranregionen (S1-S6) und der cNMP-Bindestelle sehr ähnlich. Ein Gen dieser Familie (*Dmcng3*) wurde in der Zwischenzeit veröffentlicht (MIYAZU et al., 2000). Ich habe ein weiteres der oben genannten Gene (*Dmcngb*) vollständig aus *Drosophila* Kopf-cDNA-Präparationen kloniert. Um die Expression dieses Gens in einem heterologen Zellsystem überprüfen zu können, wurde die Sequenz mit einem Expressions-Tag versehen. Die bereits bekannten Gene (*Dmcnga* und *Dmcng3*) wurden ebenfalls für die heterologe Expression mit speziellen Epitop-Tags versehen.

3.2 Heterologe Expression

3.2.1 Immunzytochemie an transfizierten HEK293-Zellen

3.2.1.1 Immunzytochemie an *Dmcnga*-HA transfizierten HEK293-Zellen

Das mit dem HA-Tag Epitop versehene *Dmcnga*-Gen (*Dmcnga*-HA) wurde transient in HEK293-Zellen exprimiert. Die Proteinexpression wurde immunzytochemisch mit monoklonalen Ratten α -HA-Antikörpern geprüft (\Rightarrow 2.11.1). Der α -HA-Antikörper wurde mit dem Fluoreszenzfarbstoff-gekoppelten Zweitantikörper α -rt-Alexa-488 detektiert (Abb. 11B). Zellen, die keine Fremd-DNA aufgenommen haben, bleiben ungefärbt. In Abhängigkeit von der zur Transfektion eingesetzten Plasmid-Menge werden bis zu 60% der Zellen gefärbt (Abb. 11B). Die besten Transfektionen wurden mit 6-8 μ g DNA erreicht.

3.2.1.2 Immunzytochemie an *Dmcngb*-HA transfizierten HEK293-Zellen

Ebenso wie *Dmcnga*-HA, wurde das *Dmcngb*-HA-Konstrukt transient in HEK293-Zellen exprimiert. Die Proteinexpression wurde immunzytochemisch mit monoklonalen Ratten α -HA-Antikörpern und einer Färbung mit dem Fluoreszenzfarbstoff-gekoppelten Zweitantikörper α -rt-Alexa-568 überprüft (Abb. 11D). Das DmCNGB-Protein wird exprimiert. In Abhängigkeit von der zur Transfektion eingesetzten Plasmid-Menge werden bis zu 50% der Zellen gefärbt. Die besten Transfektionen wurden mit 4-6 μ g DNA erreicht.

3.2.1.3 Immunzytochemie an *Dmcng3*-His transfizierten HEK293-Zellen

Das mit dem His-Tag-Epitop versehene *Dmcng3*-Gen (*Dmcng3*-His) wurde transient in HEK293-Zellen exprimiert. Auch die Expression dieses Proteins wurde immunzytochemisch geprüft (Abb. 11F).

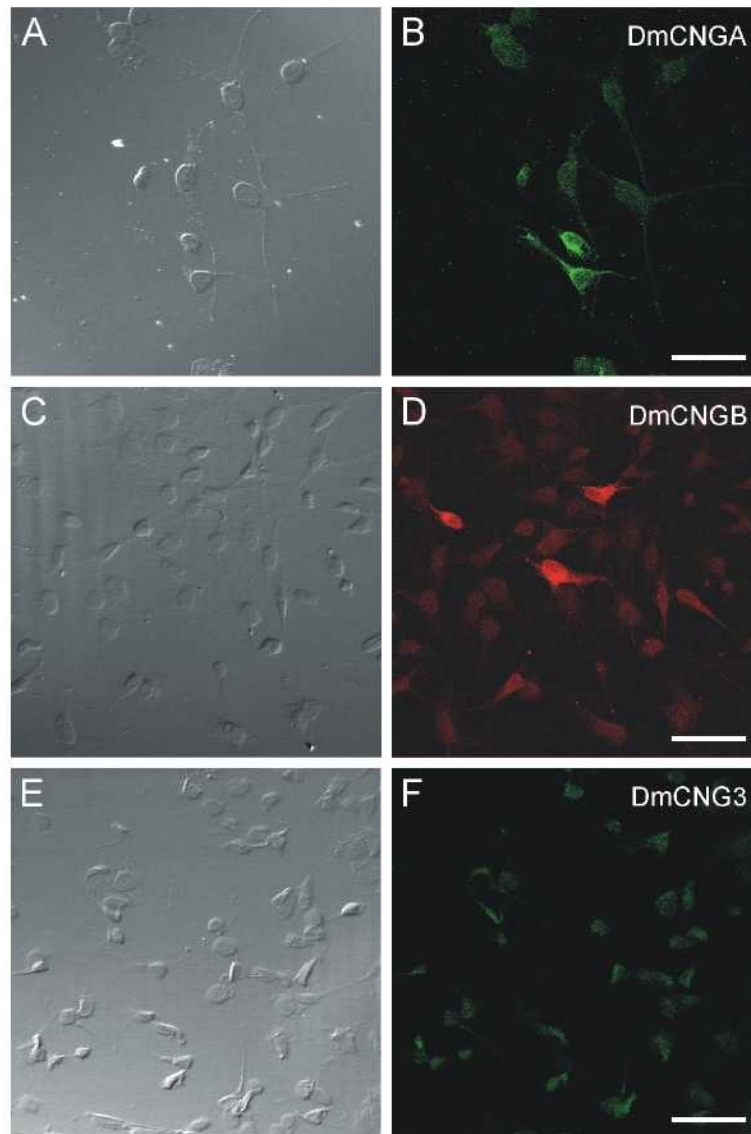


Abb. 11: Immunzytochemischer Nachweis der transient in HEK293-Zellen exprimierten *Dmcnga*-HA-, *Dmcngb*-HA- und *Dmcng3*-His-Gene. HEK293-Zellen wurden transient mit *Dmcnga*-HA, *Dmcngb*-HA und *Dmcng3*-His transfiziert. Der Nachweis erfolgte mit Antikörpern, die die Epitop-Tag's spezifisch erkennen. **A)** *Dmcnga*-HA transfizierte Zellen. Durchlichtaufnahme (DIC). **B)** *Dmcnga*-HA transfizierte Zellen. Der α -HA-Antikörper wurde in einer Verdünnung von 1 : 100 eingesetzt. Der Nachweis erfolgte mit dem Fluoreszenzfarbstoff-gekoppelten Zweitantikörper α -rt-Alexa-488. **C)** *Dmcngb*-HA transfizierte Zellen. Durchlichtaufnahme (DIC). **D)** *Dmcngb*-HA transfizierte Zellen. Der α -HA-Antikörper wurde in einer Verdünnung von 1 : 80 eingesetzt. Der Nachweis erfolgte mit dem Fluoreszenzfarbstoff-gekoppelten Zweitantikörper α -rt-Alexa-568. **E)** *Dmcng3*-His transfizierte Zellen. Durchlichtaufnahme (DIC). **F)** *Dmcng3*-His transfizierte Zellen. Der Penta•His Alexa Fluor 488-Antikörper wurde in einer Verdünnung von 1 : 1.000 eingesetzt. Der Balken in A-D entspricht 50 μ m, in E und F 100 μ m.

Der α -His-Antikörper ist mit dem Fluoreszenzfarbstoff Alexa-488 gekoppelt, so dass die Antikörperbindung an das exprimierte Protein direkt nachweisbar ist. Die HEK293-Zellen wurden mit verschiedenen DNA-Mengen (6, 9, 12, 15 μ g) transfiziert. In keinem Experiment wurden Zellen spezifisch markiert. Das DmCNG3-Protein wird offenbar nicht exprimiert.

Die nativen CNG-Kanäle der Wirbeltiere sind heterooligomere Proteine. Von einigen Kanaluntereinheiten ist bekannt, dass sie nur zusammen mit anderen Untereinheiten heterolog exprimiert werden (vgl. KAUPP & SEIFERT, 2002). Da die Expression des DmCNG3-Proteins nicht nachgewiesen werden konnte, wurde geprüft, ob das DmCNG3-Protein mit anderen *Drosophila* CNG-Kanaluntereinheiten koexprimiert werden kann. Es wurden Transfektionen von HEK293-Zellen mit DNA-Mischungen von *Dmenga/Dmcng3*-His (4/9 μ g, 4/12 μ g), *Dmcngb*-HA/*Dmcng3*-His (4/9 μ g, 4/15 μ g) und *Dmenga/Dmcngb*-HA/*Dmcng3*-His (4/4/9 μ g, 2/2/6 μ g) durchgeführt. In keinem Versuch wurde eine spezifische Färbung für DmCNG3 gefunden. Im Gegensatz dazu wurden stets spezifische Färbungen für die Proteine DmCNGA und DmCNGB beobachtet (ohne Abb.).

Warum kann das DmCNG3-His-Protein nicht nachgewiesen werden? Ein Grund könnte sein, dass das His-Tag-Epitop in den Zellen nicht für den Antikörper zugänglich ist. Möglicherweise ist das DmCNG3-Protein auch unvollständig, denn in der Datenbank ist ein längerer C-Terminus angegeben (\Rightarrow 3.1.3). Das Protein könnte zwar synthetisiert werden, aber bspw. funktioniert der Einbau in die Membran nicht, weil möglicherweise eine Assemblierungsdomäne fehlt. Das „unvollständige“ Protein würde wahrscheinlich schnell wieder abgebaut (z.B. Ubiquitin-Komplex).

Es sollte daher versucht werden, den im *Drosophila* Genom (ADAMS et al., 2000) angegebenen, alternativen 3'-Bereich des *Dmcng3*-Gens (\Rightarrow 3.1.3; Anhang Abb. A4) zu amplifizieren. Dazu wurden PCR's mit cDNA-Präparationen aus adulten Köpfen und Embryonen durchgeführt.

Der zu amplifizierende Bereich von etwa 1.250 bp wurde an einer EcoRV-Schnittstelle in zwei Fragmente von 600 bp und 650 bp Länge aufgeteilt. Es wurde eine PCR mit den Oligonukleotiden #3036 und #3056 durchgeführt. Am 5'-Ende sollte die interne RsrII-Schnittstelle benutzt werden, um das PCR-Fragment mit der *Dm $cng3$* -Sequenz fusionieren zu können. Eine weitere PCR wurde mit den Oligonukleotiden #3055 und #3037 durchgeführt. Das erste Oligonukleotid liegt über einer EcoRV-Schnittstelle, mit dem Oligonukleotid #3037 wird am 3'-Ende eine XbaI-Schnittstelle eingeführt. In drei PCR-Reaktion wurden keine Fragmente amplifiziert. Entweder liegt die Sequenz des alternativen C-Terminus (\Rightarrow Anhang Abb. A4) in den zur cDNA-Synthese verwendeten Geweben und Stadien nicht vor oder aber die Datenbanksequenz ist falsch zugewiesen.

3.2.2 Immunologischer Nachweis der heterolog exprimierten *Drosophila* CNG-Kanaluntereinheiten

3.2.2.1 Nachweis des DmCNGA-Proteins

Um das relative Molekulargewicht des DmCNGA-HA-Proteins bestimmen zu können, wurden Membranproteine aus transient transfizierten HEK293-Zellen präpariert (\Rightarrow 2.8.1). Jeweils 20 μ g Membranproteine wurden für einen Western-Blot (\Rightarrow 2.10) eingesetzt. Der Nachweis erfolgte mit einem monoklonalen α -HA-Antikörper in Verbindung mit dem ECL-System (\Rightarrow 2.10.4).

Durch Vergleich mit den Laufstrecken der LMW-Markerproteine (\Rightarrow 2.10.1) wurde das Molekulargewicht des DmCNGA-HA-Proteins bestimmt. Es ist etwa 82 kDa groß (Abb. 12). Das aus der cDNA-Sequenz abgeleitete Molekulargewicht der DmCNGA-Untereinheit beträgt 75.9 kDa. Der experimentell bestimmte Wert weicht also \sim 6,1 kDa vom rechnerisch ermittelten Molekulargewicht ab.

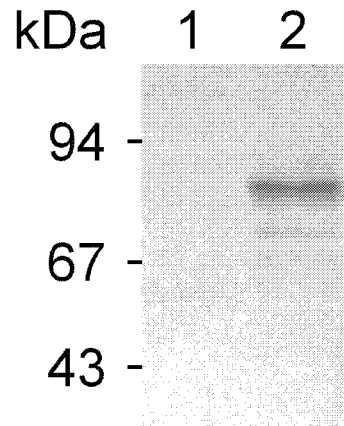


Abb. 12: Western-Blot mit Membranproteinen *Dmcnga*-HA transfizierter und nicht transfizierter HEK293-Zellen. Es wurden 20 μ g Membranproteine in einem 10%igen PAA/SDS-Gel aufgetrennt und auf eine PVDF-Membran übertragen. Der Nachweis der Membranproteine erfolgte mit einem α -HA-Antikörper (Verdünnung 1:2.000). Die Molekulargewichte des Größenstandards sind auf der linken Seite in kDa angegeben. **1)** Membranproteine aus nicht transfizierten HEK293-Zellen. **2)** Membranproteine aus *Dmcnga*-HA transfizierten HEK293-Zellen. Der Nachweis erfolgte mit dem ECL-System. Die Belichtung des Films betrug 4 min.

Diese Differenz ist durch eine posttranslationale Modifizierung des Proteins zu erklären. Ob diese Annahme richtig ist, wurde experimentell überprüft, indem Membranproteine aus transient *Dmcnga*-HA transfizierten HEK293-Zellen deglykosyliert wurden (\Rightarrow 2.8.4.1). Nach der PNGase F-Inkubation (Abb. 13) verringert sich das Molekulargewicht der DmCNGA-HA-Untereinheit um etwa 5 kDa und stimmt somit fast mit dem errechneten Molekulargewicht überein. Die Abweichungen sind auf die Ungenauigkeit bei der Auswertung des Western-Blots zurückzuführen.

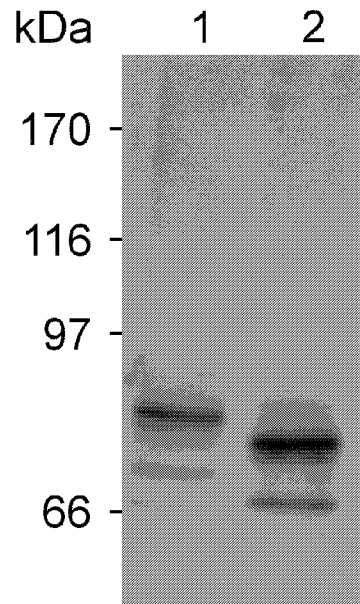


Abb. 13: Western-Blot mit Membranproteinen *Dmcnga*-HA transfizierter HEK293-Zellen. Die Membranproteine (5 µg) wurden für 3 h mit PNGase F verdaut, in einem 7,5%igen PAA/SDS-Gel aufgetrennt und auf eine PVDF-Membran übertragen. Der Nachweis erfolgte mit einem α -HA-Antikörper (Verdünnung 1:3.000). Die Molekulargewichte des Größenstandards sind auf der linken Seite in kDa angegeben. **1)** Membranproteine aus *Dmcnga*-HA transfizierten Zellen. Ohne PNGase F-Behandlung. **2)** Membranproteine aus *Dmcnga*-HA transfizierten Zellen. Mit PNGase F-Behandlung. Der Nachweis erfolgte mit dem ECL-System. Die Belichtung des Films betrug 2 min.

3.2.2.2 Nachweis des DmCNGB-Proteins

Die immunzytochemischen Färbungen haben gezeigt, dass ca. 50% der *Dmcngb*-HA transfizierten HEK293-Zellen ein HA-„getaggt“ Protein exprimieren (\Rightarrow 3.2.1.2). Mit einem Western-Blot sollte untersucht werden, ob das Molekulargewicht des exprimierten „Proteins“ dem aus der abgeleiteten Aminosäuresequenz berechneten Wert von 118 kDa entspricht.

Die Membranproteine aus *Dmcngb* transfizierten HEK293-Zellen wurden präpariert (\Rightarrow 2.8.1), in einem PAA/SDS-Gel aufgetrennt und auf eine PVDF-Membran übertragen. Der Nachweis erfolgte mit einem α -HA-Antikörper. In Abbildung 14 sind jeweils 5 µg Membranproteine aus *Dmcnga*-HA (Spur 1) und *Dmcngb*-HA transfizierten HEK293-Zellen (Spur 2) aufgetragen. Das Molekulargewicht des exprimierten Proteins von 128 kDa (Spur 2) entspricht, unter Berücksichtigung der Genauigkeit eines Western-Blots - insbesondere im höhermolekularen Bereich - dem erwarteten Molekulargewicht des DmCNGB-Proteins (118 kDa). Das Protein wird

posttranslational nicht glykosyliert. Auch die abgeleitete Aminosäuresequenz (\Rightarrow Abb. 6) zeigt keine Konsensussequenz für Glykosylierungen ($\text{NX}^{\text{S/T}}$) im Bereich der extrazellulären Schleifen.

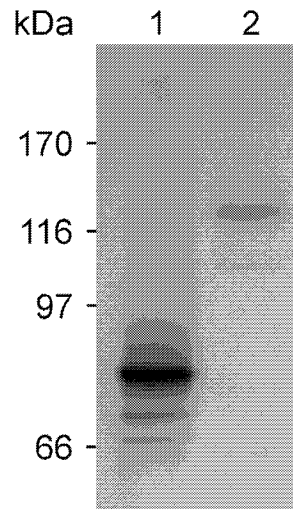


Abb. 14: Western-Blot mit Membranproteinen *Dmcnga*-HA und *Dmcngb*-HA transfizierter HEK293-Zellen. Die Membranproteine (5 μg) wurden in einem 7,5%igen PAA/SDS-Gel aufgetrennt und auf eine PVDF-Membran übertragen. Der Nachweis erfolgte mit einem α -HA-Antikörper (Verdünnung 1 : 3.000). Die Molekulargewichte des Größenstandards sind auf der linken Seite in kDa angegeben. **1)** Membranproteine aus *Dmcnga*-HA transfizierten HEK293-Zellen. **2)** Membranproteine aus *Dmcngb*-HA transfizierten HEK293-Zellen. Der Nachweis erfolgte mit dem ECL-System. Die Belichtung des Films betrug 30 s.

3.2.2.3 Nachweis des DmCNG3-Proteins

Obwohl mit immunzytochemischen Färbungen keine DmCNG3-His-Expression nachweisbar war (\Rightarrow 3.2.1.3), sollte dennoch mit einem Western-Blot die DmCNG3-His-Expression geprüft werden. Ein Zugänglichkeitsproblem für den Antikörper in der Immunzytochemie sollte unter denaturierenden Bedingungen eines PAA/SDS-Gels ausgeschlossen werden. Es wurde ein speziell für Western-Blots geeigneter α -His-Antikörper eingesetzt.

Membranproteine aus *Dmcng3*-His transfizierten HEK293-Zellen und aus nicht transfizierten Zellen wurden präpariert, in einem PAA/SDS-Gel aufgetrennt und auf eine PVDF-Membran übertragen (Abb. 15). Als Kontrolle wurde ein His-Tag-Fusionsprotein (DmCNGA-His) eingesetzt. Das Fusionsprotein wird von dem Antikörper erkannt (Abb. 15, Pfeilspitze). In den Spuren, in denen Membranproteine

aus *Dmcng3*-His transfizierten und aus nicht transfizierten HEK293-Zellen aufgetragen wurden, sind keine Proteine spezifisch gefärbt. Auch in Transfektionen mit verschiedenen *Dmcng3*-His DNA-Mengen (z.B. 1, 3, 6, 9, 12, 15 µg) wurde kein Protein der erwarteten Größe (159,9 kDa) nachgewiesen.

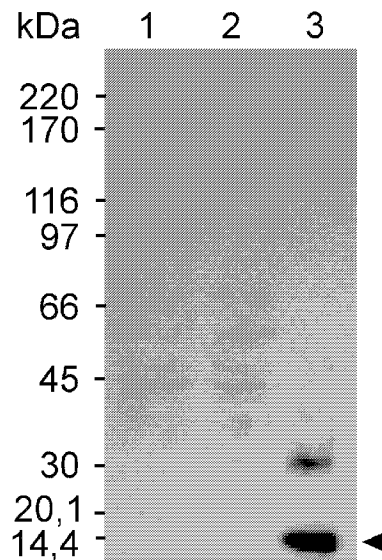


Abb. 15: Western-Blot mit Membranproteinen *Dmcng3*-His transfizierter HEK293-Zellen. Die Membranproteine (20 µg) wurden in einem linearen Gradientengel (5-15%) aufgetrennt und auf eine PVDF-Membran übertragen. Der Nachweis erfolgte mit einem α -His-Antikörper (Verdünnung 1 : 1.000). Die Molekulargewichte des Größenstandards sind auf der linken Seite in kDa angegeben. **1)** Membranproteine aus *Dmcng3*-His transfizierten Zellen. **2)** Membranproteine aus nicht transfizierten Zellen. **3)** DmCNGA-His (1 µg). Die Pfeilspitze markiert das erwartete Molekulargewicht. Der Nachweis erfolgte mit dem ECL-System. Die Belichtung des Films betrug 1 min.

3.2.3 Koexpression der *Drosophila* CNG-Kanalgene *Dmcnga* und *Dmcngb*

Native Wirbeltier CNG-Kanäle sind heterooligomere Komplexe aus α - und β -Untereinheiten (vgl. KAUPP & SEIFERT, 2002). Es sollte untersucht werden, ob sich *Drosophila* CNG-Kanaluntereinheiten (DmCNGA, DmCNGB) ebenfalls zu heterooligomeren Komplexen zusammenlagern. Für die DmCNGA-Untereinheit stand ein monoklonaler α -HA-Antikörper (\Rightarrow 3.1.4) sowie inzwischen auch zwei α -DmCNGA spezifische, polyklonale Antikörper (\Rightarrow 3.3.1.1) zur Verfügung. Der Nachweis der DmCNGB-Untereinheit musste mit einem monoklonalen α -HA-Antikörper erfolgen. Die Untersuchungen wurden mit Western-Blots, immunzytochemischen Färbungen und Koimmunpräzipitationen durchgeführt.

3.2.3.1 Western-Blot Dmcnga/Dmcngb-HA kotransfizierter HEK293-Zellen

Ein erster Hinweis für die mögliche Koexpression der *Drosophila* CNG-Kanaluntereinheiten (DmCNGA und DmCNGB) wurde durch Western-Blots erhalten. Dazu wurden HEK293-Zellen entweder mit Dmcnga-HA oder mit Dmcngb-HA transfiziert. Außerdem wurden HEK293-Zellen mit einer Mischung beider Expressionskonstrukte kotransfiziert. Die Membranproteine der HEK293-Zellen wurden präpariert, in einem PAA/SDS-Gel aufgetrennt und auf eine PVDF-Membran übertragen. Der Nachweis erfolgte mit einem α -HA-Antikörper (Abb. 16).

In der Kotransfektion (Spur 3) werden zwei Proteine unterschiedlicher Größe detektiert. Der Vergleich mit den einzeln exprimierten Proteinen DmCNGA-HA (Spur 1) und DmCNGB-HA (Spur 2) zeigt, dass die Molekulargewichte der exprimierten Proteine identisch sind.

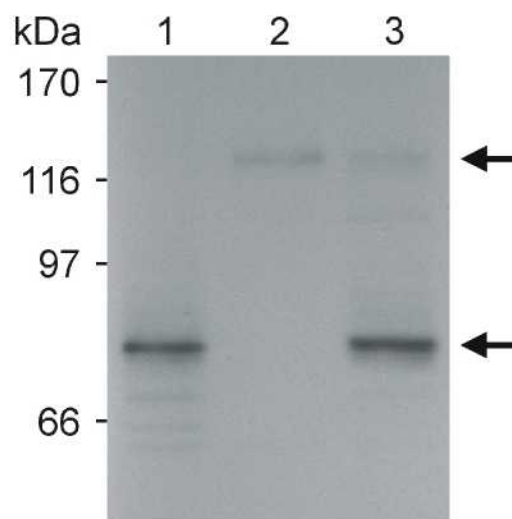


Abb. 16: Western-Blot mit Membranproteinen Dmcnga-HA und Dmcngb-HA transfizierter HEK293-Zellen. Es wurden 2,5 μ g Membranproteine Dmcnga-HA, 5 μ g Dmcngb-HA und 10 μ g Dmcnga-HA/Dmcngb-HA transfizierter HEK293-Zellen in einem 7,5%igen PAA/SDS-Gel aufgetrennt und auf eine PVDF-Membran übertragen. Der Nachweis erfolgte mit einem α -HA-Antikörper (Verdünnung 1 : 3.000). Die Molekulargewichte des Größenstandards sind auf der linken Seite in kDa angegeben. 1) Membranproteine aus Dmcnga-HA transfizierten Zellen. 2) Membranproteine aus Dmcngb-HA transfizierten Zellen. 3) Membranproteine aus Dmcnga-HA/Dmcngb-HA kotransfizierten Zellen. Der Nachweis erfolgte mit dem ECL-System. Die Belichtung des Films betrug 45 s.

Beide Proteine (DmCNGA-HA und DmCNGB-HA) werden von Zellen exprimiert, die sich in derselben Kulturschale befanden. Ob die Proteine in unterschiedlichen Zellen oder in denselben Zellen exprimiert werden, wurde immunzytochemisch getestet.

3.2.3.2 Immunzytochemie an kotransfizierten HEK293-Zellen

Sowohl HEK293-Zellen als auch HEK-TSA-Zellen wurden mit *Dmcnga* und *Dmcngb*-HA kotransfiziert, fixiert und mit den Antikörpern DmCNGA-His-5 (gegen DmCNGA gerichtet; \Rightarrow 3.3.1.1) und α -HA (gegen DmCNGB-HA gerichtet) doppelgefärbt (Abb. 17). Die Anregung der Fluoreszenzfarbstoff-gekoppelten Zweitantikörper erfolgte seriell.

Neben Zellen, die nur DmCNGA (grün) bzw. DmCNGB-HA (rot) exprimieren, sind auch Zellen zu erkennen, die beide Proteine synthetisieren. Diese Zellen sind durch Überlagerung der grünen und roten Fluoreszenzfärbungen gelb angefärbt. Etwa 5% aller transfizierten Zellen exprimieren sowohl die DmCNGA- als auch die DmCNGB-Kanaluntereinheit.

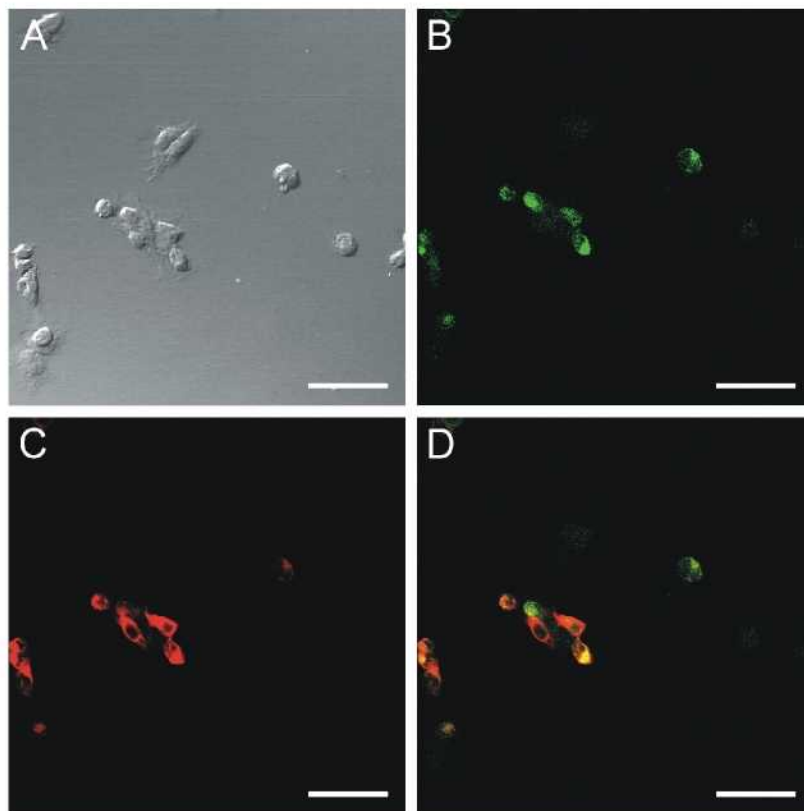


Abb. 17: Immunzytochemischer Nachweis der Koexpression von DmCNGA und DmCNGB-HA in kotransfizierten HEK-TSA-Zellen. HEK-TSA-Zellen wurden transient mit *Dmcnga* und *Dmcngb*-HA kotransfiziert. **A)** Durchlichtaufnahme (DIC) der Zellen. **B)** Fluoreszenzfärbung der Zellen. Der Nachweis der DmCNGA-Untereinheit erfolgte mit dem spezifischen DmCNGA-His-5 Antikörper (Verdünnung 1 : 50) und dem Fluoreszenzfarbstoff-gekoppelten Zweitantikörper α -rb-CY5 (grün). **C)** Fluoreszenzfärbung der Zellen. Der Nachweis von DmCNGB-HA erfolgte mit einem α -HA-Antikörper (Verdünnung 1 : 100) und dem Fluoreszenzfarbstoff-gekoppelten Zweitantikörper α -rt-Alexa-568 (rot). **D)** Überlagerung von Bild (B) und (C). Zellen, die beide Proteine (DmCNGA und DmCNGB-HA) exprimieren, sind gelb gefärbt. Der Balken entspricht 50 μ m.

3.2.4 Elektrophysiologische Eigenschaften heterolog exprimierter DmCNGB und koexprimierter DmCNGA/DmCNGB CNG-Kanäle

Die elektrischen Eigenschaften homooligomerer DmCNGA-Kanäle wurden nach heterologer Expression des *Dmcnnga*-Gens in *Xenopus* Oozyten und HEK293-Zellen bestimmt (BAUMANN et al., 1994). Nachdem ich überprüft hatte, dass das DmCNGB-Protein in HEK293-Zellen exprimiert wird (\Rightarrow 3.2.1.2; 3.2.2.2), sollten die elektrischen Eigenschaften dieser Kanäle untersucht werden. Zusätzlich wurden Kotransfektionen mit den *Dmcnnga*- und *Dmcnngb*-Genen durchgeführt, um zu testen, ob sich die Untereinheiten zu funktionellen heterooligomeren Kanälen zusammenlagern. Die elektrophysiologischen Messungen der heterolog exprimierten Kanäle hat Dr. S. Frings (IBI 1, Forschungszentrum Jülich) durchgeführt (\Rightarrow 2.13). Es wurde die „Patch clamp“-Technik in der „inside out“-Konfiguration benutzt. Dazu wird mit der Messpipette ein Membranstück („patch“) so aus der Zelle entnommen, dass die zytosolische Seite nach außen zeigt und mit Test-Lösungen umspült werden kann. Während der Messung wird die Membranspannung (V_m) vorgegeben (Spannungsklemme bzw. „clamp“) und der Strom (I) gemessen. Es wurden Spannungsrampen von -80 mV bis +80 mV angelegt.

3.2.4.1 Leitfähigkeit

Sowohl mit der „Patch clamp“-Technik als auch mit Ca^{2+} -Imaging-Experimenten wurden keine zyklisch Nukleotid-aktivierten, homooligomeren DmCNGB-Kanäle gefunden (ohne Abb.). Obwohl das Protein immunzytochemisch eindeutig nachweisbar ist (\Rightarrow 3.2.1.2), muss aus dem elektrophysiologischen Experiment geschlossen werden, dass die DmCNGB-Kanaluntereinheit alleine nicht ausreicht, um einen funktionellen Kanal zu bilden.

Mit immunzytochemischen Färbungen hatte ich gezeigt, dass DmCNGA- und DmCNGB-Kanaluntereinheiten in HEK293-Zellen bzw. HEK-TSA-Zellen koexprimiert werden (\Rightarrow 3.2.3.2). Es wurde deshalb untersucht, welche elektrischen Eigenschaften diese Kanäle haben. Dazu wurden die makroskopischen Ströme bei verschiedenen cGMP-Konzentrationen (0 μ M - 1.000 μ M) in *Dmcnnga* und *Dmcnnga/Dmcnngb* transfizierten Zellen gemessen. Die Strom-Spannungskurven sind

in Abbildung 18 gezeigt. Die makroskopischen Ströme (I) nehmen mit steigender cGMP-Konzentration zu. Sie sättigen bei $\sim 300 \mu\text{M}$ cGMP. Sowohl für *Dmcnga* als auch für *Dmcnga/Dmcngb* transfizierte Zellen sind die makroskopischen Strom-Spannungskurven annähernd linear.

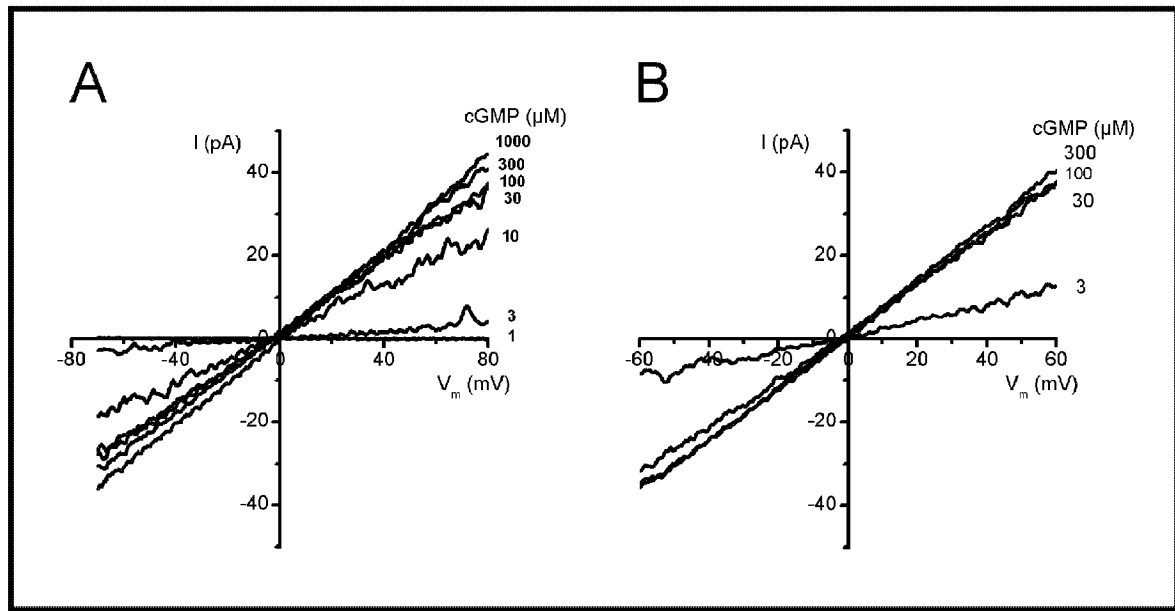


Abb. 18: Strom-Spannungsbeziehungen heterolog exprimierter *Drosophila* CNG-Kanäle bei verschiedenen Ligandenkonzentrationen. Es wurden Spannungsrampen von -80 mV bis $+80$ mV bzw. von -60 mV bis $+60$ mV angelegt und der cGMP-abhängige Strom (I) in Anwesenheit steigender cGMP-Konzentrationen aufgezeichnet. **A)** *Dmcnga* transfizierte Zellen ($n = 3$). **B)** *Dmcnga/Dmcngb* kotransfizierte Zellen ($n = 4$).

Die gemessenen Ströme *Dmcnga* transfizierter bzw. *Dmcnga/Dmcngb* kotransfizierter Zellen unterscheiden sich nicht in ihren makroskopischen Eigenschaften. Es wurde deshalb versucht, die Eigenschaften einzelner Kanäle zu charakterisieren. In Abbildung 19 ist eine Einzelkanalmessung *Dmcnga/Dmcngb* kotransfizierter Zellen bei verschiedenen cGMP-Konzentrationen gezeigt. Mit steigender cGMP-Konzentration in der Badlösung wird zunächst ein Kanal geöffnet. Der Einzelkanalstrom beträgt $2,3$ pA. Mit steigender cGMP-Konzentration wird zusätzlich noch ein zweiter Kanal geöffnet.

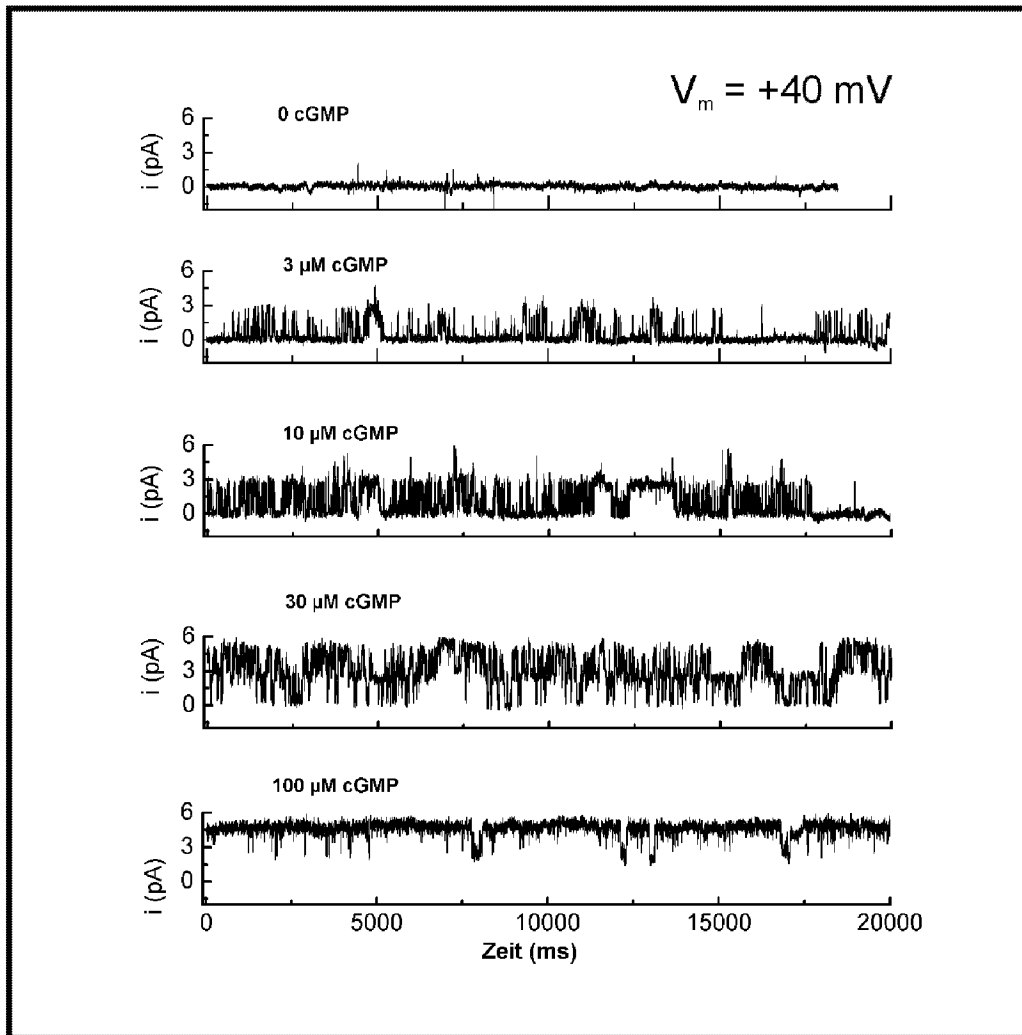


Abb. 19: Einzelkanalmessungen an *Dmcnga/Dmcngb* kotransfizierten Zellen. Bei einer Spannung von +40 mV wurde das Öffnungsverhalten der Kanäle über die Zeit in Anwesenheit einer steigenden cGMP-Konzentration aufgezeichnet. Der Einzelkanalstrom (i) beider Kanäle beträgt 2,3 pA.

Diese Einzelkanalmessungen wurden auch an *Dmcnga* transfizierten Zellen durchgeführt und dazu benutzt, die Einzelkanalleitwerte (i/V_m) zu bestimmen. In Abbildung 20 ist diese Auswertung gezeigt. Auch auf Einzelkanalniveau sind keine Unterschiede zwischen *Dmcnga* und *Dmcnga/Dmcngb* transfizierten Zellen zu erkennen. In Anwesenheit von 10 μ M cGMP beträgt die Leitfähigkeit in beiden Messungen 53 pS.

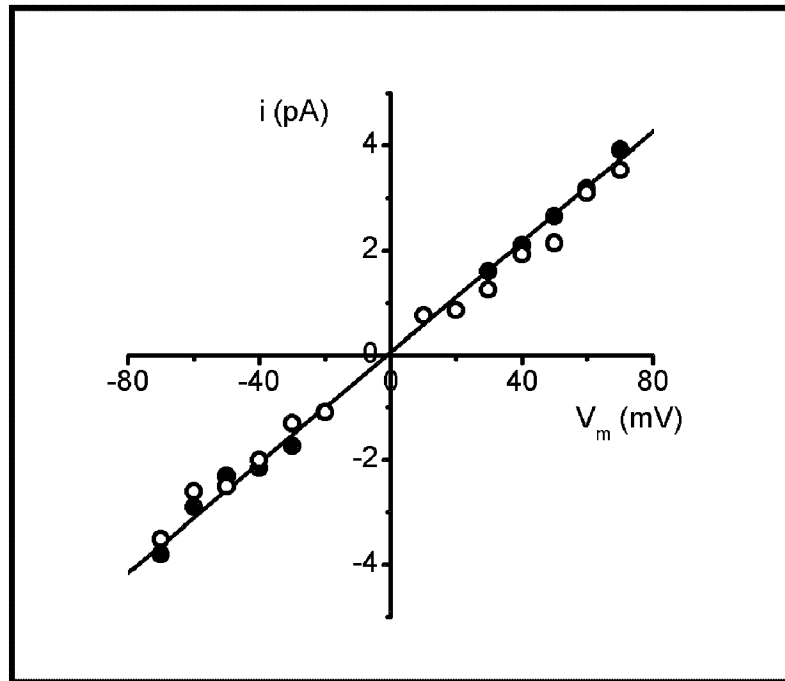


Abb. 20: Vergleich der Leitfähigkeit heterolog exprimierter *Drosophila* CNG-Kanäle. Es wurden Spannungsrampen von -80 mV bis +80 mV angelegt und der Einzelkanalstrom (i) in Anwesenheit von 10 μ M cGMP aufgezeichnet. Messungen *Dmcnga* transfizierter (offene Kreise) und *Dmcnga/Dmcngb* kotransfizierter Zellen (geschlossene Kreise). Die Steigung der Ausgleichsgerade (i/V_m) ist die Einzelkanalleitfähigkeit (angegeben in Picosiemens).

3.2.4.2 Ligandensensitivität der exprimierten Kanäle

Die Dosis-Wirkungsabhängigkeit für die Öffnung der *Drosophila* CNG-Kanäle kann, wie für ligandengesteuerte Kanäle üblich, durch die Hill-Gleichung beschrieben werden:

$$\frac{I}{I_{\max}} = \frac{c^n}{c^n + K_{1/2}^n}$$

Der Hill-Koeffizient (n) ist ein Maß für die Kooperativität der Ligandenbindung. Dabei bezeichnet $K_{1/2}$ die Ligandenkonzentration (c), die den Kanal halbmaximal aktiviert. Die Parameter wurden bei +40 mV bestimmt und in eine Dosis-Wirkungskurve umgesetzt (Abb. 21).

Der $K_{1/2}$ -Wert der *Dmcnga* transfizierten und *Dmcnga/Dmcngb* kotransfizierten Zellen beträgt für cGMP jeweils 8 μ M. Der Hill-Koeffizient (n) ist 2,5. Der $K_{1/2}$ -Wert

Dmcnga/Dmcngb kotransfizierter Zellen für cAMP beträgt $\approx 700 \mu\text{M}$; der Hill-Koeffizient ist ebenfalls 2,5.

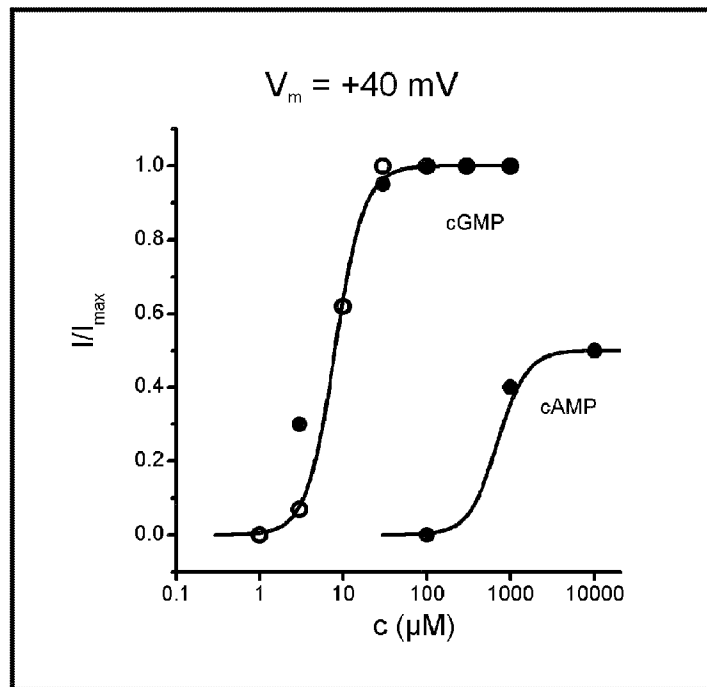


Abb. 21: Dosis-Wirkungsabhängigkeit von *Drosophila* CNG-Kanälen für cGMP und cAMP. Die Messungen wurden bei einer Membranspannung von +40 mV mit unterschiedlichen cGMP- bzw. cAMP-Konzentrationen (c) durchgeführt. Messungen *Dmcnga* transfizierter (offene Kreise) und *Dmcnga/Dmcngb* kotransfizierter Zellen (geschlossene Kreise). Der Wendepunkt der Kurve bestimmt den $K_{1/2}$ -Wert.

Die elektrophysiologischen Messungen ergaben, dass die DmCNGB-Kanaluntereinheit nicht ausreicht, funktionelle Kanäle zu bilden. Die elektrischen Eigenschaften *Dmcnga* und *Dmcngb* kotransfizierter Zellen entsprechen denen homooligomerer DmCNGA-Kanäle (\Rightarrow 4.1).

3.2.5 Immunpräzipitation

Die immunzytochemischen Färbungen zeigten, dass einige transfizierte Zellen das DmCNGA- und DmCNGB-Protein gemeinsam exprimieren (\Rightarrow 3.2.3.2). Die elektrischen Eigenschaften der Ionenkanäle, die in kotransfizierten Zellen gemessen wurden, waren aber nicht von denen homooligomerer DmCNGA-Kanäle zu unterscheiden (\Rightarrow 3.2.4). Um zu prüfen, ob beide Proteine (DmCNGA/DmCNGB) in einem Komplex vorliegen, wurde versucht, die Proteine koimmunpräzipitieren.

Membranproteine aus *Dmcnnga* bzw. *Dmcngeb*-HA transfizierten HEK293-Zellen sowie aus *Dmcnnga*/*Dmcngeb*-HA kotransfizierten HEK293-Zellen wurden solubilisiert, mit Sepharose vorinkubiert und anschließend mit einer HA-Säulenmatrix inkubiert (\Rightarrow 2.9.1). Nicht gebundene Proteine wurden abgetrennt. An die Säule gebundene Proteine wurden mit Glycin eluiert (\Rightarrow 2.9.1). Die Elutionsfraktionen wurden gelelektrophoretisch aufgetrennt. Der Nachweis der Proteine erfolgte im Western-Blot (\Rightarrow 2.10).

Das DmCNGA-Protein kann nicht an die HA-Säulenmatrix binden, weil es kein HA-Epitop trägt. Wird DmCNGB-HA alleine exprimiert, kann das Protein an die HA-Säule binden und im Western-Blot nachgewiesen werden (Abb. 22).

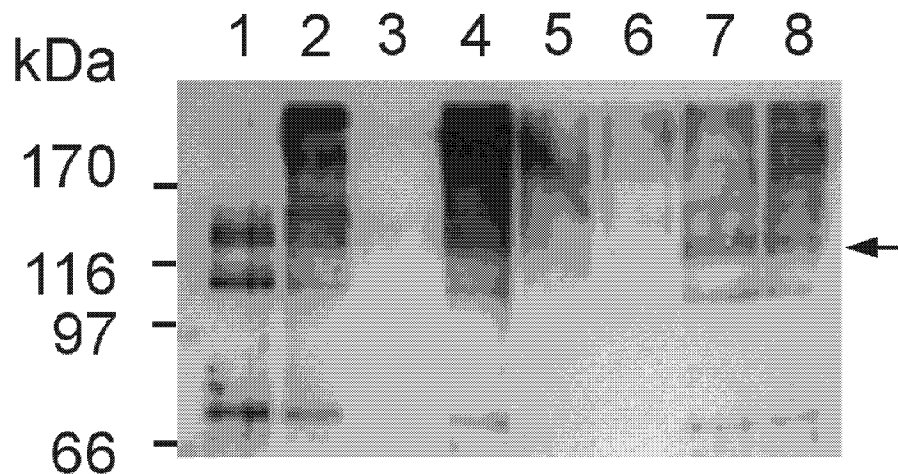


Abb. 22: Western-Blot mit an einer HA-Säulenmatrix immunpräzipitierten Membranproteinen *Dmcngeb*-HA transfizierter HEK293-Zellen. Es wurden vergleichbare Mengen Elutionsfraktionen in einem 7,5%igen PAA/SDS-Gel aufgetrennt und auf eine PVDF-Membran übertragen. Der Nachweis erfolgte mit einem α -HA-Antikörper (Verdünnung 1 : 3.000). Die Molekulargewichte des Größenstandards sind auf der linken Seite in kDa angegeben. Der Pfeil markiert das erwartete Molekulargewicht. Die Belichtung des Films betrug 4 min. **1)** Säulenauftrag. **2)** Durchfluss. **3)** Waschfraktion nach dem Durchfluss. **4)** Elution I. **5)** Elution II. **6)** Waschfraktion nach der Elution. **7)** SDS-haltige Säulendenaturierung I. **8)** SDS-haltige Säulendenaturierung II.

Der größte Teil des DmCNGB-HA-Proteins befindet sich im Eluat (Spuren 4 und 5) bzw. in SDS-haltigen Elutionsfraktionen (Spuren 7 und 8). Das erwartete Molekulargewicht ist durch einen Pfeil markiert. Im Durchlauf (Spur 2) ist DmCNGB-HA nur gering, in den Waschfraktionen (Spuren 3 und 6) überhaupt nicht vorhanden.

Werden DmCNGA und DmCNGB-HA in HEK293-Zellen koexprimiert, können sowohl Proteinkomplexe, die nur aus DmCNGB-HA bestehen als auch Proteinkomplexe aus DmCNGB-HA/DmCNGA, an die HA-Säulenmatrix binden. Die einzelnen Fraktionen der Immunpräzipitationen wurden in einem PAA/SDS-Gel aufgetrennt und die Proteine auf eine PVDF-Membran übertragen (\Rightarrow 2.10.3). Die Inkubation des Western-Blots mit dem α -HA-Antikörper (ohne Abb.) zeigt, dass DmCNGB-HA an die Säule gebunden hat. Der Nachweis des DmCNGB-HA-Proteins ist jedoch sehr schwach. Bei Verwendung des DmCNGA-His-5 Antikörpers wird weder im Säulenauftrag noch in den Elutionsfraktionen im Western-Blot eine Proteinbande detektiert, obwohl 50 μ g Membranprotein als Ausgangsmaterial eingesetzt wurde. Dieses negative Ergebnis könnte an der niedrigen Affinität des DmCNGA-His-5 Antikörpers liegen (\Rightarrow 3.3.1.1).

In diesem Abschnitt habe ich die heterologe Expression der drei CNG-Kanaluntereinheiten DmCNGA, DmCNGB und DmCNG3 immunzytochemisch untersucht. Während DmCNGA und DmCNGB in HEK293-Zellen exprimiert werden, gelang der Nachweis des DmCNG3-Proteins nicht.

3.3 Immunhistochemischer Nachweis des DmCNGA-Proteins in *Drosophila* Geweben

3.3.1 Herstellung und Charakterisierung von Antikörpern gegen DmCNGA

Bisher sind 3 Gene, die für Untereinheiten zyklisch Nukleotid-gesteuerter Ionenkanäle kodieren, aus *Drosophila* Kopf-cDNA-Bibliotheken kloniert worden. In unserem Arbeitskreis wurde bereits vor einiger Zeit das *DmCnga*-Gen isoliert und charakterisiert (BAUMANN et al., 1994), während das *DmCng3*-Gen kürzlich von einer japanischen Arbeitsgruppe beschrieben wurde (MIYAZU et al., 2000). Ich habe das *DmCngb*-Gen kloniert und charakterisiert (\Rightarrow 3.1.3). Um die mögliche Funktion der CNG-Kanäle bei *Drosophila* zu verstehen, sollte zunächst der Expressionsort des DmCNGA-Proteins immunhistochemisch aufgeklärt werden. Ein Vergleich der abgeleiteten Aminosäuresequenzen von DmCNGA mit den anderen *Drosophila* CNG-Kanaluntereinheiten zeigte, dass vor allem die N- und C-terminalen Abschnitte

geringer konserviert sind als bspw. die transmembranalen Segmente oder die cNMP-Bindestelle. Die N- bzw. C-terminalen Abschnitte sollten sich daher eignen, spezifische Antikörper gegen DmCNGA zu erzeugen. Der N-Terminus des CNG-Kanals aus Rindersehstäbchen wird posttranslational verkürzt (MOLDAY et al., 1991). Für die Herstellung der Antikörper gegen die *Drosophila* DmCNGA-Kanaluntereinheit wurde deshalb der C-terminale Bereich des Proteins ausgewählt.

Es wurden zwei unabhängige Immunisierungen in Kaninchen durchgeführt, um polyklonale Antikörper zu erhalten. Zusätzlich wurden, in Zusammenarbeit mit Frau Dr. E. Kremmer (GSF, München), zwei monoklonale Antikörper in Ratten hergestellt. Die polyklonalen Antikörper wurden affinitätschromatographisch gereinigt. Die Spezifität und Affinität der gereinigten Antikörper wurde mit Western-Blots und durch immunzytochemische Färbungen von HEK293-Zellen, die die DmCNGA-Untereinheit transient exprimierten, getestet.

3.3.1.1 Reinigung und Charakterisierung DmCNGA-spezifischer, polyklonaler Antikörper

Ein polyklonales Serum wurde in Kaninchen gegen die C-terminalen Aminosäuren (Positionen: A565-L665) des DmCNGA-Proteins hergestellt. Das Polypeptid war zusätzlich am C-Terminus mit einem (Histidin)₆-Epitop (His-Tag) versehen (DmCNGA-His). Antikörper, die gegen den DmCNGA-Teil gerichtet sind, wurden affinitätschromatographisch gereinigt. Zur Herstellung der Affinitätsmatrix wurde ein GST-Fusionsprotein (DmCNGA-GST) eingesetzt (⇒ 2.6.2.1). Gebundene Antikörper wurden mit Glycin-Puffer eluiert (⇒ 2.7.2). Ob und in welchen Fraktionen spezifische Antikörper enthalten waren, wurde in einem „Tüpfeltest“ (⇒ 2.10.3) geprüft. Dazu wurden gereinigte DmCNGA-Fusionsproteine in verschiedenen Konzentrationen aufgetragen (Abb. 23).

In den Eluatfraktionen 4 bis 9 sind Antikörper enthalten, die DmCNGA-Fusionsproteine erkennen. Die Affinität der Antikörper gegenüber DmCNGA-His ist größer als gegenüber DmCNGA-GST. Das DmCNGA-His wird noch bis zu einer Verdünnung von 0,2 ng erkannt.

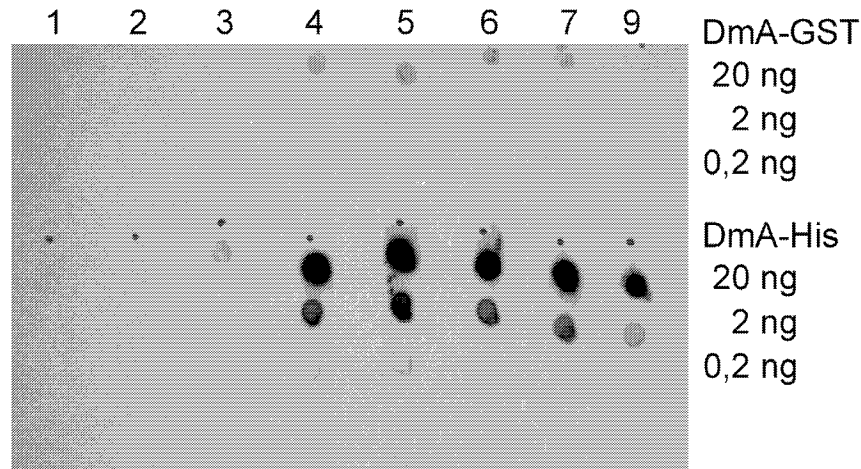


Abb. 23: Charakterisierung affinitätschromatographisch gereinigter Antikörperfraktionen gegen DmCNGA mit einem „Tüpfeltest“. Drei Verdünnungen (20, 2, 0,2 ng) von DmCNGA-GST und DmCNGA-His wurden auf eine Nitrocellulose-Membran aufgetragen. Der Nachweis erfolgte mit den Eluaten (Fraktion 1-9) (Verdünnung 1 : 50) und dem ECL-System. Die Belichtung des Films betrug 5 min.

Die im Tüpfeltest positiven Eluate (DmCNGA-His-4 - DmCNGA-His-9) wurden anschließend in einem Western-Blot untersucht. In Abbildung 24 ist das Ergebnis eines Western-Blots mit den zwei Fusionsproteinen und mit Membranproteinen DmCNGA transfizierter HEK293-Zellen gezeigt, der mit Antikörpern aus der 5. Eluatfraktion (DmCNGA-His-5) inkubiert wurde.

Der Antikörper erkennt sowohl das 37 kDa DmCNGA-GST-Fusionsprotein als auch das 12 kDa große DmCNGA-His-Fusionsprotein. In der Spur, in der Membranproteine nicht transfizierter HEK293-Zellen aufgetragen wurden (Spur 1), ist keine Färbung zu erkennen. In einem Kontrollexperiment wurden Membranproteine aus DmCNGA-HA transfizierten HEK293-Zellen aufgetragen (Spur 5) und mit einem α -HA-Antikörper nachgewiesen. In Membranpräparationen DmCNGA transfizierter HEK293-Zellen (Spur 4) erkennt DmCNGA-His-5 ein Protein derselben Größe. Demzufolge detektiert der gereinigte Antikörper (DmCNGA-His-5) das DmCNGA-Protein aus transfizierten HEK293-Zellen spezifisch.

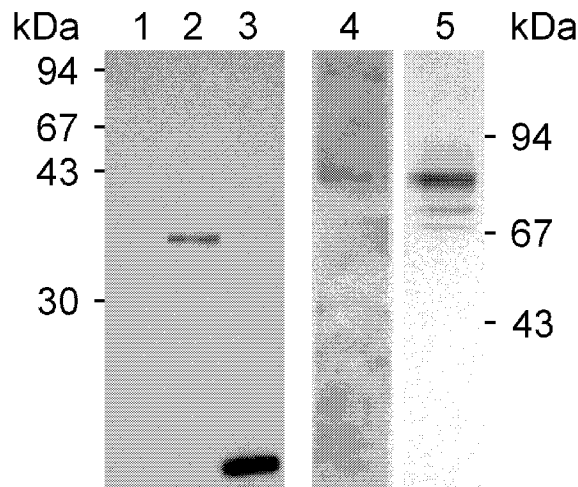


Abb. 24: Western-Blot mit DmCNGA-Fusionsproteinen und Membranproteinen transfizierter und nicht transfizierter HEK293-Zellen. Die gereinigten Fusionsproteine wurden in einem 12,5%igen, die Membranproteine in einem 10%igen PAA/SDS-Gel aufgetrennt und auf eine PVDF-Membran übertragen. Es wurden 19 ng DmCNGA-GST- und 2 ng DmCNGA-His-Fusionsprotein sowie 36 μ g Membranprotein eingesetzt. Der Nachweis erfolgte mit DmCNGA-His-5 (Verdünnung 1 : 50). Als Kontrolle wurden Membranproteine aus Wildtyp- HEK293-Zellen verwendet. Als Positivkontrolle wurden Membranproteine aus *DmCNGA*-HA transfizierten HEK293-Zellen aufgetrennt und mit einem α -HA-Antikörper (Verdünnung 1 : 3.000) gefärbt. Die Molekulargewichte des Größenstandards sind auf der linken und rechten Seite in kDa angegeben. **1)** Membranproteine aus nicht transfizierten HEK293-Zellen. **2)** DmCNGA-GST. **3)** DmCNGA-His. **4)** Membranproteine aus *DmCNGA* transfizierten HEK293-Zellen. **5)** Membranproteine aus *DmCNGA*-HA transfizierten HEK293-Zellen. Alle Proben wurden mit dem ECL-System nachgewiesen. Die Belichtung des Films betrug 5 min für Spur 1-4, 2 min für Spur 5.

Mit Hilfe des gereinigten Antikörpers (DmCNGA-His-5) sollte die Expression des DmCNGA-Proteins in *Drosophila* Geweben untersucht werden. Um festzustellen, ob das Eluat für diesen Verwendungszweck geeignet ist, wurden die Antikörper zunächst in immunzytochemischen Färbungen getestet. Dazu wurden HEK293-Zellen mit den *DmCNGA*-Konstrukten transfiziert (\Rightarrow 2.6.1). Die fixierten Zellen wurden mit DmCNGA-His-5 inkubiert und der gebundene Antikörper mit HRP-gekoppelten Zweitantikörpern nachgewiesen (\Rightarrow 2.11.1). Abbildung 25 zeigt das Ergebnis einer solchen Färbung. Etwa 60% der transfizierten Zellen sind gefärbt und exprimieren das DmCNGA-Protein (Abb. 25A). Als Kontrolle wurden HEK293-Zellen mit *DmCNGA*-HA transfiziert und mit einem α -HA-Antikörper nachgewiesen (Abb. 25B). Es sind ebenfalls etwa 50% der Zellen gefärbt.

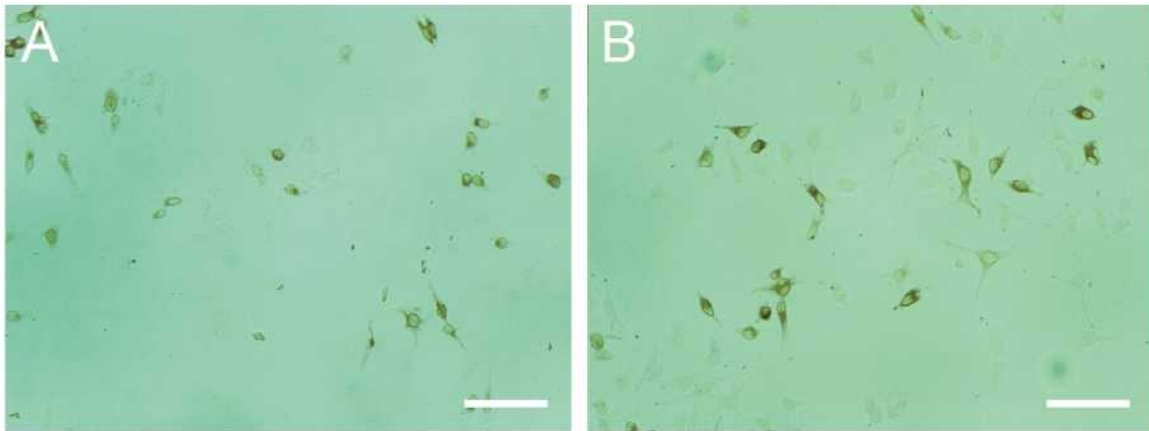


Abb. 25: Immunzytochemische Färbungen transfizierter HEK293-Zellen mit DmCNGA-His-5 und einem α -HA-Antikörper. Die Zellen wurden mit 4% Paraformaldehyd 15 min bei RT fixiert. **A)** *DmCnga* transfizierte HEK293-Zellen. DmCNGA-His-5 wurde in einer Verdünnung von 1 : 50 eingesetzt. DAB-Reaktion für 10 min. **B)** *DmCnga*-HA transfizierte HEK293-Zellen. Der Nachweis erfolgte mit einem α -HA-Antikörper (Verdünnung 1 : 100) und einer DAB-Färbung für 2 min. Der Balken entspricht 100 μ m.

Die Ergebnisse der Zellfärbungen zeigten, dass DmCNGA-His-5 für die Immunzytochemie geeignet ist, so dass dieser Antikörper für die Färbung von Gewebeschnitten verwendet werden kann (\Rightarrow 3.3.2).

Parallel zur Herstellung des DmCNGA-His-Antikörpers wurden Kaninchen mit einem weiteren DmCNGA-Fusionsprotein (DmCNGA-MBP) immunisiert. Dazu wurde der C-Terminus (A565-L665) des DmCNGA-Proteins hinter die Sequenz des Maltose-Bindeproteins (MBP) kloniert. DmCNGA-MBP wurde in *E. coli* Zellen (BL21) überexprimiert und gereinigt (\Rightarrow 2.6.2.2). Antikörper gegen den DmCNGA-Anteil wurden affinitätschromatographisch aus dem Serum der Tiere gereinigt. An das Säulenmaterial war DmCNGA-His-Fusionsprotein gekoppelt (\Rightarrow 2.7.2). Nach einer sauren Glycin-Elution wurden die Säulenfraktionen im „Tüpfeltest“ und im Western-Blot getestet. Das Eluat DmCNGA-MBP-2 erkennt die Proteine im „Tüpfeltest“ deutlich, während die Affinität im Western-Blot geringer ist als die des gereinigten DmCNGA-His-5 Antikörpers. Der DmCNGA-MBP-2 Antikörper wurde - wie zuvor DmCNGA-His-5 - für immunzytochemische Färbungen transfizierter HEK293-Zellen eingesetzt. Die Färbungen sind vergleichbar gut wie mit DmCNGA-His-5.

3.3.1.2 Herstellung und Test monoklonaler Antikörper

Während der Immunisierung der Kaninchen wurde das DmCNGA-His-Antigen benutzt, um monoklonale Antikörper herzustellen. Diese Arbeiten erfolgten in Zusammenarbeit mit Frau Dr. E. Kremmer vom Institut für Molekulare Immunologie (GSF, München). Die Kulturüberstände der primären Hybridome (Primärkulturüberstände) wurden im „Tüpfeltest“ und Western-Blot (\Rightarrow 2.10) auf ihre Spezifität getestet. Weder im „Tüpfeltest“ noch im Western-Blot mit DmCNGA-Fusionsproteinen färbten die Primärkulturüberstände CNGD-2B5 und CNGD-6D8 spezifisch. Sie wurden deshalb für die nachfolgenden Untersuchungen nicht mehr eingesetzt.

3.3.2 Nachweis der DmCNGA-Expression in *Drosophila* Geweben

Zunächst wurden Membranproteine aus verschiedenen *Drosophila* Entwicklungsstadien isoliert, um im Western-Blot ein geeignetes Stadium zu identifizieren, in dem die gewebespezifische Lokalisation des DmCNGA-Proteins mit immunhistochemischen Färbungen durchgeführt werden konnte.

Membranproteine von Embryonen (8-16 h), Larven (3. Entwicklungsstadium), späten Puppen und adulten Fliegen wurden in einem PAA/SDS-Gel aufgetrennt und auf eine PVDF-Membran übertragen (Abb. 26). Der Western-Blot wurde mit DmCNGA-His-5 inkubiert. Der Proteinnachweis aus Geweben erforderte lange Belichtungszeiten. Nur in der Spur, in der Proteine aus Köpfen adulter Tiere aufgetragen waren, sind spezifische Färbungen zu erkennen (Abb. 26, Spur 3). Neben einer Bande bei ~ 80 kDa, die dem erwarteten Molekulargewicht der DmCNGA-Untereinheit entspricht, ist noch zusätzlich eine Bande bei ~ 103 kDa zu erkennen. Mit Ausnahme der Bande bei ~ 103 kDa, sind vergleichbare Färbungen auch in den Spuren zu sehen, in denen Membranproteine aus transfizierten HEK293-Zellen aufgetragen wurden (Spur 1 und 2). Obwohl annähernd die doppelte Menge Membranprotein aus Körpern (Thorax und Abdomen) aufgetragen wurde, ist keine DmCNGA-spezifische Färbung in der Körperfraktion zu erkennen. In den Spuren, in denen Proteine aus Embryonen, Larven und Puppen aufgetragen wurden, waren ebenfalls keine spezifischen Banden zu erkennen (ohne Abb.). Zur Kontrolle enthielt der Western-

Blot auch Membranproteine DmCNGA-HA transfizierter Zellen. Die von DmCNGA-His-5 und vom α -HA-Antikörper gefärbten Proteine aus HEK293-Membranfraktionen (Spur 1 und 2) haben dieselbe Größe wie das Protein, das in den Membranfraktionen aus *Drosophila* Köpfen erkannt wird (Spur 3).

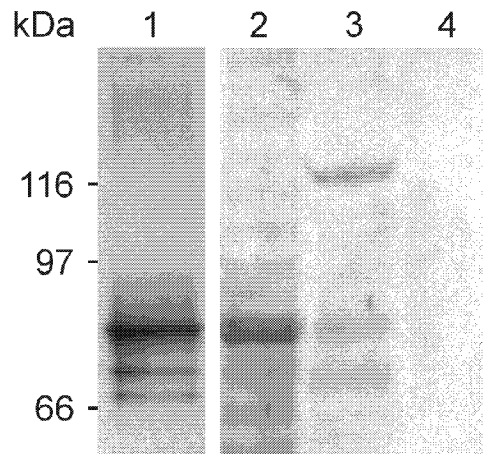


Abb. 26: Nachweis des DmCNGA-Proteins in *Drosophila* Geweben. Die Membranproteine aus Gewebepräparationen wurden in einem 7,5%igen PAA/SDS-Gel aufgetrennt und auf eine PVDF-Membran übertragen. Die Molekulargewichte des Größenstandards sind auf der linken Seite in kDa angegeben. **1)** Membranproteine aus *DmCnga*-HA transfizierten HEK293-Zellen. Der Nachweis erfolgte mit einem α -HA-Antikörper (Verdünnung 1 : 3.000) und dem ECL-System. Die Belichtung des Films betrug 45 s. **2)** Membranproteine (45 μ g) aus *DmCnga* transfizierten HEK293-Zellen. Der Nachweis erfolgte mit DmCNGA-His-5 (Verdünnung 1 : 75). **3)** Proteine aus Kopfpräparationen (48 μ g). **4)** Proteine aus Körperpräparationen (75 μ g). Die Belichtung des Films betrug 15 min.

Das DmCNGA-Protein wird im Kopf adulter Fliegen exprimiert. Deshalb wurden die nachfolgenden immunhistochemischen Untersuchungen auf dieses Gewebe beschränkt.

3.3.3 Immunhistochemischer Nachweis des DmCNGA-Proteins in adulten Fliegenköpfen

Die gewebespezifische Verteilung und zelluläre Lokalisation der DmCNGA-Untereinheit sollte mit immunhistochemischen Färbungen geklärt werden. Es wurden die unabhängig voneinander hergestellten, polyklonalen Antikörper DmCNGA-His-5 und DmCNGA-MBP-2 auf 12 μ m dicken Gefrierschnitten adulter Fliegenköpfe eingesetzt.

Zum Verständnis der gefärbten Strukturen zeigt Abbildung 27A zunächst schematisch die Morphologie eines horizontal geschnittenen Fliegenkopfes. Die einzelnen Abschnitte des visuellen Systems sind markiert. Auf die Retina (Komplexauge) folgen die Lamina, die Medulla und die Lobula. Die Lobula ist bei Dipteren (Zweiflüglern) in zwei völlig voneinander getrennte Teile, die Lobula und die Lobula Platte unterteilt (DETTNER & PETERS, 1999). Die Axone der Photorezeptorzellen 1-6 enden in der Lamina, die der Photorezeptorzellen 7 und 8 ziehen bis in die äußeren Schichten der Medulla (Übersicht: FISCHBACH & DITTRICH, 1989; KUNES & STELLER, 1993).

Der zelluläre Aufbau des *Drosophila* Komplexauges ist in Abbildung 27B schematisch gezeigt. Ein Komplexauge besteht aus etwa 800 einzelnen Ommatidien. Jedes Ommatidium besitzt eine Cornea (C), 8 kreisförmig angeordnete Photorezeptorzellen (Rz) und mehrere Pigmentzellen (Pz). Die Mikrovilli der Photorezeptorzellen bilden gemeinsam das Rhabdomer (Rh) des Ommatidiums. Hier befinden sich die molekularen Komponenten der Phototransduktion.

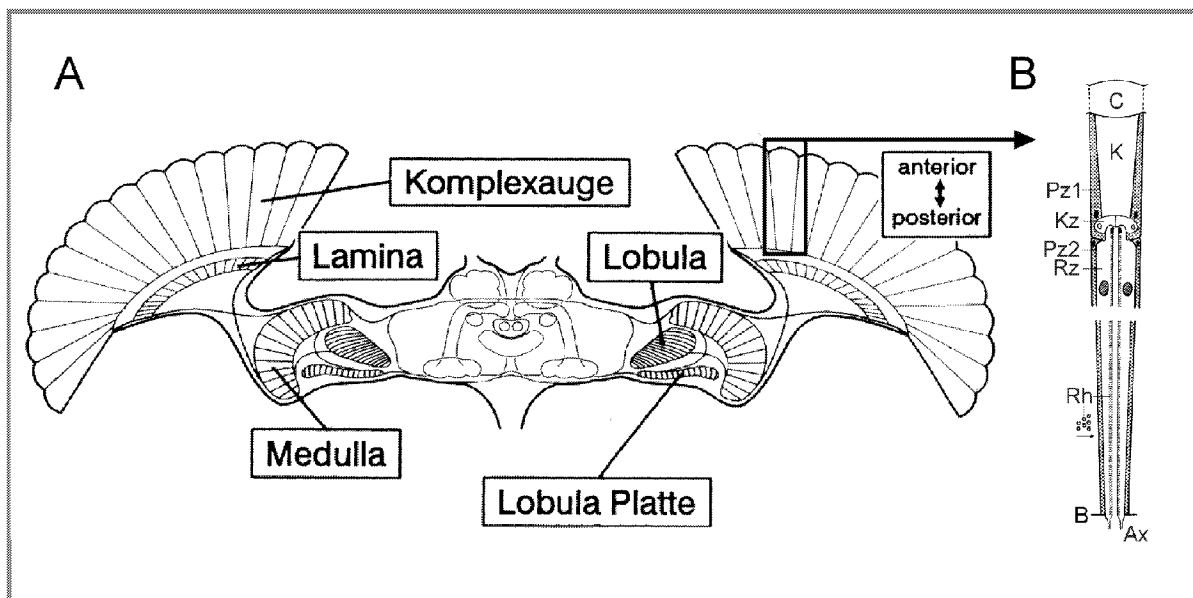


Abb. 27: Schematische Darstellung eines Fliegenkopfes und eines Einzelauges. **A)** Horizontalschnitt durch ein Gehirn der Fliege *Calliphora erythrocephala*. Die morphologisch getrennten Bereiche des visuellen Systems sind bezeichnet. Die Abbildung ist modifiziert nach DETTNER & PETERS (1999). **B)** Schema eines Einzelauges (Ommatidium). Verwendete Abkürzungen: Ax: Sehzellaxon; B: Basalmembran; C: Cornea; K: Kristallkegel; Kz: Kristallkegelzelle; Pz: Pigmentzelle; Rh: Rhabdomer; Rz: Photorezeptorzelle. Die Abbildung ist modifiziert nach SIEWING (1980).

Das Ergebnis der Färbung eines *Drosophila* Kopf-Gefrierschnittes mit dem DmCNGA-His-5 Antikörper ist in Abbildung 28 gezeigt. Die Retina (R) der Wildtyp-Fliege (*Oregon R*) ist stark gefärbt (Abb. 28B). Weder in Strukturen, die zum visuellen System gehören (Lamina, Medulla, Lobula), noch im Zentralen Nervensystem (ZNS) ist ein Farbniederschlag zu erkennen.

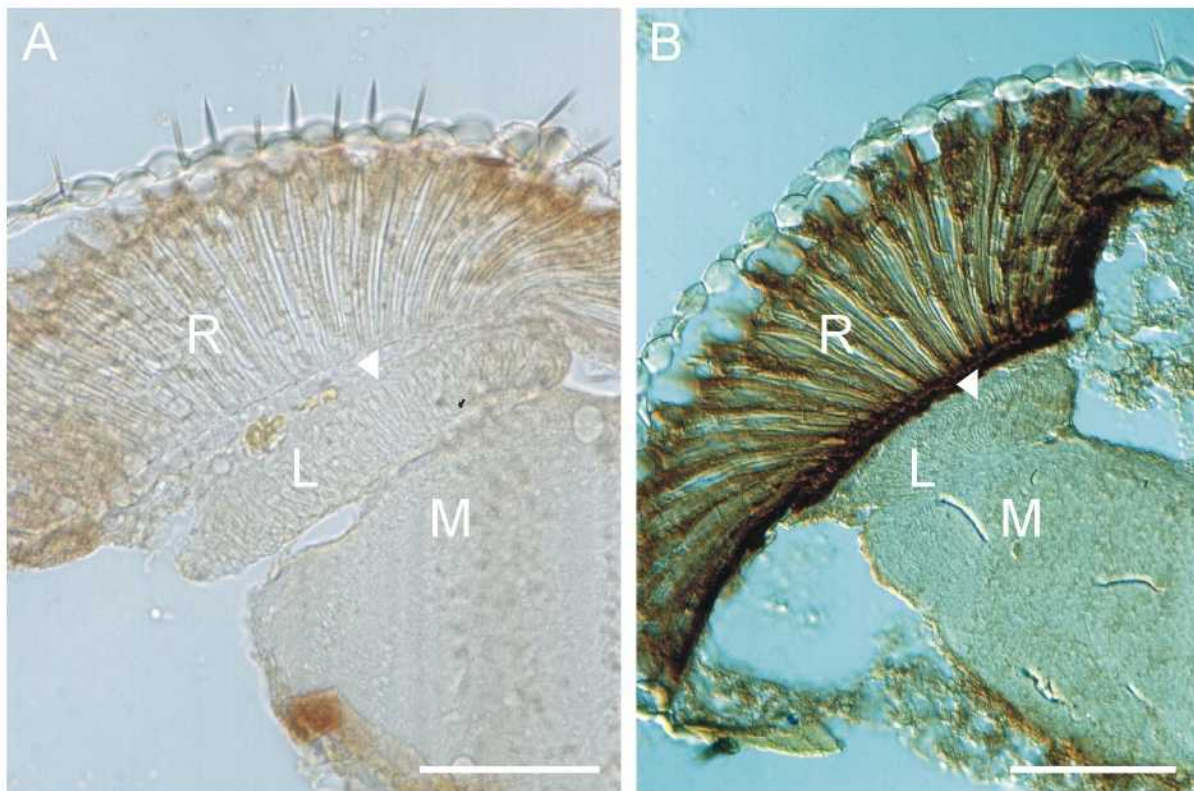


Abb. 28: Immunhistochemischer Nachweis der CNG-Kanaluntereinheit DmCNGA in Gewebeschnitten adulter *Drosophila* Köpfe. Wildtyp-Fliegen wurden mit Glutaraldehyd fixiert, 12 µm dicke Gewebeschnitte angefertigt und mit DmCNGA-His-5 inkubiert. Der Nachweis der gebundenen Antikörper erfolgte mit dem ABC-System (\Rightarrow 2.11.2.2) in Verbindung mit einer DAB-Färbung (30 min). **A)** Färbung eines Präparates mit dem Präimmunsereum (Verdünnung 1 : 1.000). Die Retina (R), Lamina (L) und Medulla (M) sind bezeichnet. Die Pfeilspitze markiert den Bereich der Basalmembran. **B)** Färbung eines Präparates mit DmCNGA-His-5 (Verdünnung 1 : 50). Der Balken entspricht 100 µm.

Eine intensive Färbung wurde mit dem DmCNGA-His-5 Antikörper im Bereich der Basalmembran (Pfeilspitze) gefunden und ist wahrscheinlich auf eine Überlagerung des DAB-Niederschlages mit Pigmentgrana zurückzuführen.

Um eine höhere räumliche Auflösung zu erreichen, wurde bei weiteren Färbungen der gebundene Erstantikörper mit Fluoreszenzfarbstoff-gekoppelten Zweitantikörpern nachgewiesen. Die Auswertung erfolgte mit einem konfokalen Lasermikroskop. Das von den inkubierten Gewebeschnitten emittierte Fluoreszenzlicht wurde aus 4 bis maximal 16 Bildebenen aufgenommen.

In Abbildung 29 ist die Färbung eines Gewebeschnittes eines adulten *Drosophila* Kopfes gezeigt. Das Präparat wurde mit dem Antikörper DmCNGA-MBP-2 inkubiert. Der gebundene Erstantikörper wurde mit dem Fluoreszenzfarbstoff-gekoppelten Zweitantikörper α -rb-CY5 nachgewiesen. Der Antikörper DmCNGA-MBP-2 färbt, wie auch DmCNGA-His-5, spezifisch die Retina (R) (Abb. 29C). Insbesondere der Bereich der Basalmembran (Pfeilspitze) und die apikalen Bereiche der Ommatidien sind stark gefärbt. Alle anderen Teile des visuellen Systems und des Gehirns sind ungefärbt. Die Inkubation mit dem Präimmunserum (Kontrolle) zeigt keine Färbung (Abb. 29B).

Ein α -Opsin-Antikörper färbt ebenfalls nur die Retina (Abb. 29D). Opsin wird ausschließlich in den Photorezeptorzellen der Ommatidien exprimiert. Eine Kollokalisierung von DmCNGA mit Opsin ist nicht möglich, weil beide Antikörper in Kaninchen hergestellt wurden. Der Vergleich der beiden Färbungen (Abb. 29C und 29D) verdeutlicht aber die lokal begrenzte Expression von DmCNGA in der Retina von *Drosophila*.

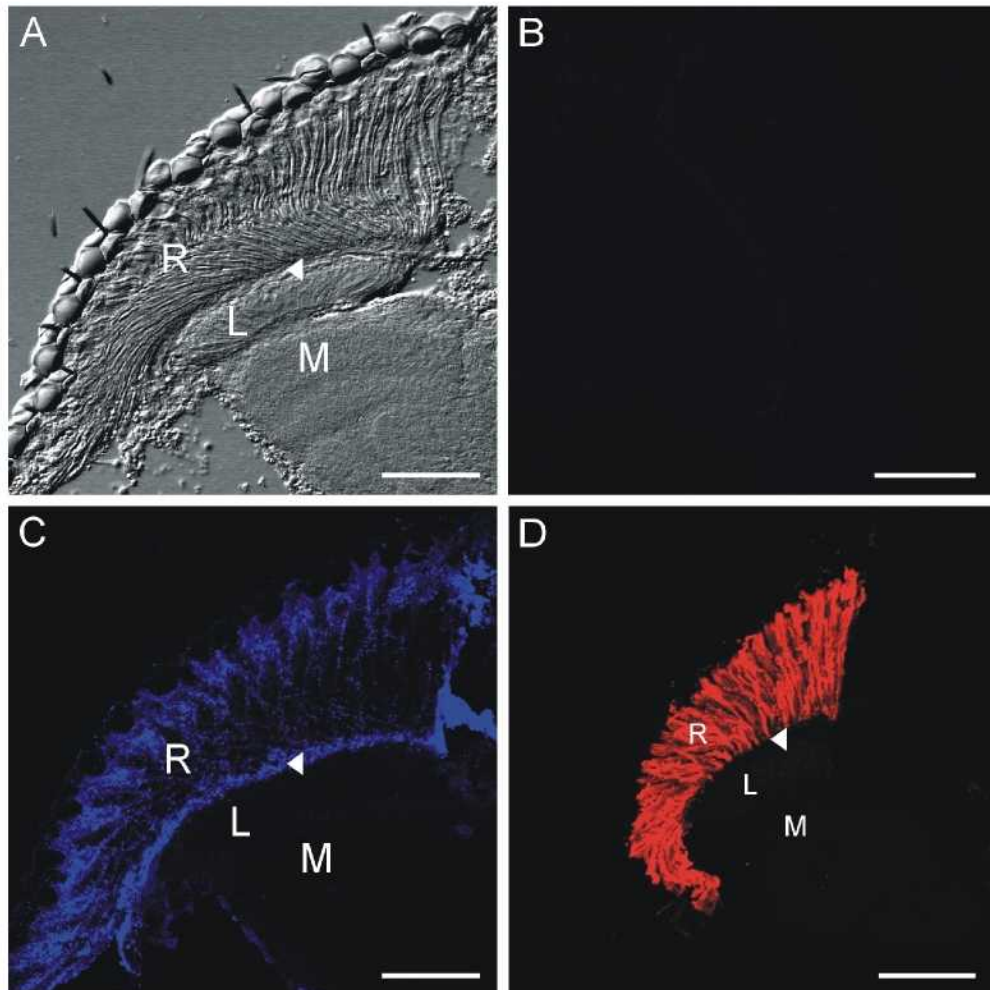


Abb. 29: Immunhistochemischer Nachweis der CNG-Kanaluntereinheit DmCNGA in Gewebeschnitten adulter *Drosophila* Köpfe. Wildtyp-Fliegen wurden mit 4% Paraformaldehyd fixiert, 12 μm dicke Gewebeschnitte angefertigt und mit DmCNGA-MBP-2 (Verdünnung 1 : 50) inkubiert. Weißäugige Fliegen (*w1118*) wurden mit α -Opsin (Verdünnung 1 : 20) inkubiert. Die gebundenen Antikörper gegen DmCNGA wurden mit einem α -rb-CY5, gegen Opsin mit einem α -rb-CY3 Fluoreszenzfarbstoff-gekoppelten Zweitantikörper nachgewiesen. **A)** Durchlichtaufnahme (DIC) des Präparates. Dieses Präparat wurde für die Färbung in (C) benutzt. Die Retina (R), Lamina (L) und Medulla (M) sind bezeichnet. **B)** Färbung eines Präparates mit dem Präimmunserum (Verdünnung 1 : 1.000). **C)** Färbung eines Präparates mit DmCNGA-MBP-2. Die Pfeilspitze markiert den Bereich der Basalmembran. **D)** Färbung einer weißäugigen Mutante (*w1118*) mit α -rb-Opsin. Der Balken entspricht 50 μm in A-C und 100 μm in D.

Über die physiologische Bedeutung der *Drosophila* CNG-Kanaluntereinheiten ist bisher nichts bekannt. Ich habe spezifische Antikörper gegen eine Untereinheit (DmCNGA) hergestellt und charakterisiert. Mit ihrer Hilfe ist es mir erstmals gelungen, das DmCNGA-Protein immunhistochemisch zu lokalisieren. DmCNGA wird spezifisch in der Retina adulter Fliegen exprimiert.

3.4 Lokalisation der Stickoxid-Synthase in *Drosophila* Geweben

Die Aktivierung der CNG-Kanäle erfolgt durch die direkte Bindung zyklischer Nukleotide (cAMP, cGMP). Der heterolog exprimierte, homooligomere DmCNGA-Kanal wird etwa 50 Mal besser durch cGMP als durch cAMP geöffnet (BAUMANN et al., 1994). Mit immunhistochemischen Methoden habe ich das DmCNGA-Protein in der Retina adulter Fliegen nachgewiesen (\Rightarrow 3.3.3). Es stellte sich die Frage, ob in der Retina auch Enzyme exprimiert werden, die cGMP synthetisieren.

Der intrazelluläre Botenstoff cGMP wird von Guanylatzyklasen aus GTP gebildet (Übersicht: FOSTER et al., 1999). Neben membrangebundenen oder partikulären Guanylatzyklasen (mGC), die beispielsweise in Photorezeptoren von Wirbeltieren vorkommen (Übersicht: PUGH et al., 1997), sind auch lösliche, zytoplasmatische Guanylatzyklasen (sGC) bekannt (Übersicht: KOESLING, 1999). Die mGC werden u.a. durch Peptide oder durch Ca^{2+} aktiviert. Die sGC bestehen aus zwei Untereinheiten (α , β). Jede dieser Untereinheiten trägt prothetisch eine Häm-Gruppe (STONE & MARETTA, 1995). An die Häm-Gruppen bindet Stickoxid (NO) und aktiviert dadurch die Zykase (KATSUKI et al., 1977; BREDT & SNYDER, 1994). Das NO wird von Stickoxid-Synthasen (NOS) aus L-Arginin synthetisiert (Übersicht: GRIFFITH & STUEHR, 1995).

In *Drosophila* sind inzwischen die Gene von vier mGC (GIGLIOTTI et al., 1993; MCNEIL et al., 1995; LIU et al., 1995), je einer α - und einer β -Untereinheit der sGC (YOSHIKAWA et al., 1993; LIU et al., 1995; SHAH & HYDE, 1995) sowie ein NOS-Gen (REGULSKI & TULLY, 1995) kloniert und charakterisiert worden.

Zwei membrangebundene Guanylatzyklasen werden während der frühen Entwicklung der Fliege exprimiert (GIGLIOTTI et al., 1993; MCNEIL et al., 1995). *In situ* Hybridisierungen an Gewebeschnitten adulter Tiere zeigten, dass eine mGC (*drgc*) im Thorax und im Kopf exprimiert wird (LIU et al., 1995).

Ein Gen, das für eine α -Untereinheit einer löslichen Guanylatzyklase von *Drosophila* kodiert, wurde mehrfach kloniert (YOSHIKAWA et al., 1993; LIU et al., 1995; SHAH & HYDE, 1995). Es existieren nur geringe Sequenzunterschiede sowohl in den Nukleinsäure- als auch in den abgeleiteten Aminosäuresequenzen. Die Unterschiede resultieren vermutlich aus der Verwendung verschiedener Wildtyp-Fliegenstämme. Mit Northern Blots und immunhistochemischen Färbungen wurde die α -Untereinheit im Gehirn, den optischen Loben und in der Retina nachgewiesen (YOSHIKAWA et al., 1993; SHAH & HYDE, 1995). Die Expression in der Retina wird von LIU et al. (1995) nicht beobachtet. Transgene Fliegen, die eine Mutation in dem sGC-Gen (*dgc α 1*) tragen, haben ein verändertes Elektretinogramm (ERG). Das phototaktische Verhalten der Tiere ist gestört (GIBBS et al., 2001). Aus *Drosophila* wurde auch ein Gen kloniert (*Dgc β 1*), das für eine β -Untereinheit einer löslichen Guanylatzyklase kodiert (SHAH & HYDE, 1995). Mit *in situ* Hybridisierungen wurde die mRNA im Gehirn, den optischen Loben sowie in der Retina nachgewiesen.

Das Stickoxid-Synthase (NOS)-Gen aus *Drosophila* (*dNOS*) wurde aus einer Kopf-cDNA-Bibliothek kloniert (REGULSKI & TULLY, 1995). Das Expressionsmuster der *dNOS* wurde mit Northern Blots bestimmt. In adulten Tieren wurden Transkripte nur in Kopfpräparationen nachgewiesen (REGULSKI & TULLY, 1995). Während der Entwicklung wird das *dNOS*-Gen auch in Imaginalscheiben des 3. Larvenstadiums exprimiert (STASIV et al., 2001). Die Verteilung des NOS-Proteins wurde vor allem mit Diaphorase-Färbungen (\Rightarrow 2.12) untersucht. Eine starke Färbung wurde in den antennalen Loben adulter Tiere gefunden; das visuelle System war schwächer gefärbt (MÜLLER, 1993).

Welche Aufgabe könnte der intrazelluläre Botenstoff cGMP in der Retina von *Drosophila* haben? Ebenso wie DmCNGA (\Rightarrow 3.3.3) werden auch die Untereinheiten der löslichen Guanylatzyklase in der Retina exprimiert (SHAH & HYDE, 1995). Das Enzym, das den zur Öffnung des DmCNGA-Kanals benötigten Liganden (hier cGMP) synthetisiert, wäre somit vorhanden.

Lösliche Guanylatzyklasen werden durch das Gas NO aktiviert, das von der NOS gebildet wird. Das NO ist ein kurzlebiger sowohl inter- als auch intrazellulär wirkender Botenstoff (SNYDER, 1992; Übersicht: GARTHWAITE & BOULTON, 1995). Ich habe experimentell geprüft, wo die Stickoxid-Synthase in verschiedenen *Drosophila* Entwicklungsstadien und Geweben exprimiert wird. Eine positive Färbung in der Retina würde zum ersten Mal drei Komponenten eines cGMP-vermittelten Signalweges im Auge der Fliege nachweisen.

Die Gewebelokalisation der NO-Synthase (NOS) wurde mit zwei Methoden untersucht. Neben einer Diaphorase-Färbung wurden immunhistochemische Färbungen mit einem NOS-spezifischen Antikörper durchgeführt.

3.4.1 Diaphorase-Färbung im Gewebe

Die Diaphorase-Färbung ist ein indirekter Hinweis auf das Vorkommen der NOS in einem Gewebe. Diaphorasen sind Dehydrogenasen und katalysieren - wie NOS - Redoxreaktionen. Diese Eigenschaft wird experimentell genutzt, um β -NADPH in Anwesenheit des Farbstoffs Nitrotetrazoliumchloridblau (NBT) zu oxidieren. Dabei wird das NBT reduziert. Es entsteht ein dunkelblauer Formazan-Niederschlag. Es ist inzwischen sowohl für Wirbeltiere (DAWSON et al., 1991; HOPE et al., 1991) als auch für Insekten (MÜLLER, 1994) beschrieben, dass Zellen, die NOS exprimieren, stets auch Diaphorase-NADPH positiv gefärbt sind.

3.4.1.1 Diaphorase-Färbung larvaler Gehirne

Das NO ist ein wichtiger Botenstoff während der Entwicklung von *Drosophila* (ENIKOLOPOV et al., 1999). In mehreren Arbeiten wird das Diaphorase-Färbemuster larvaler Gehirne beschrieben (z.B. ATKINSON & PANNI, 1999; WILDEMANN & BICKER, 1999). Ich habe die Methode zunächst an Gehirnen des 3. Larvenstadiums etabliert, um sie danach auf das adulte Entwicklungsstadium zu übertragen. Zur Übersicht zeigt Abbildung 30 die Lage und Morphologie des larvalen Gehirns von *Drosophila*.

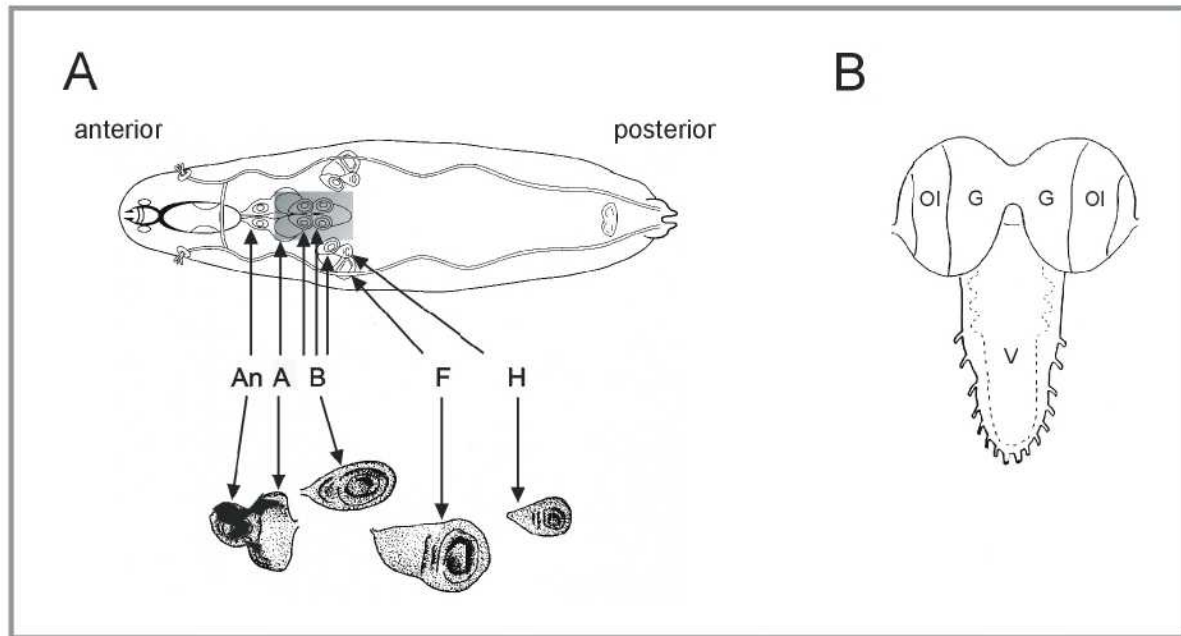


Abb. 30: Schematische Darstellung der Lage und Morphologie eines larvalen Gehirns von *Drosophila* (3. Larvenstadium). **A)** Lage des larvalen Gehirns (grau unterlegt). Die Imaginalscheiben für Antennen (An), Augen (A), Beine (B), Flügel (F) und Halteren (H) sind vergrößert dargestellt. **B)** Schemazeichnung eines larvalen Gehirns. Die Gehirnhemisphären (G), der Bereich der optischen Loben (Ol) und der ventrale Nervenstrang (V) sind bezeichnet. Die Abbildung ist modifiziert nach BATE & ARIAS (1993).

Für die Diaphorase-Färbung wurden larvale Gehirne präpariert und für 5 h Stunden im Dunkeln gefärbt (\Rightarrow 2.12.1). In Abbildung 31 ist das Ergebnis einer Färbung gezeigt. Das Kontrollgehirn (Abb. 31A) ist ungefärbt. In Abbildung 31B ist eine blauviolette Färbung sowohl in den Gehirnhemisphären (G) als auch im ventralen Nervenstrang zu erkennen. Der Bereich der optischen Loben (Ol) ist schwach gefärbt. In der Ausschnittsvergrößerung (Abb. 31C) ist zu erkennen, dass Interneurone (Pfeile), die aus dem Gehirn in den ventralen Nervenstrang projizieren, gefärbt sind. Ebenso sind Zellen entlang der Mittellinie (offener Pfeil) deutlich gefärbt. Apikal sind intensiv gefärbte Motoneurone (Pfeilspitzen) zu sehen. Zwei Imaginalscheiben (Sterne), die später die Augen und Antennen ausbilden, liegen den Gehirnhemisphären auf und sind ebenfalls stark gefärbt (Abb. 31D). Auch die Ringdrüse (Rd) ist gefärbt. Diese Färbemuster stimmen mit den Literaturangaben (KUZIN et al., 1996; ATKINSON & PANNI, 1999; WILDEMANN & BICKER, 1999) überein.

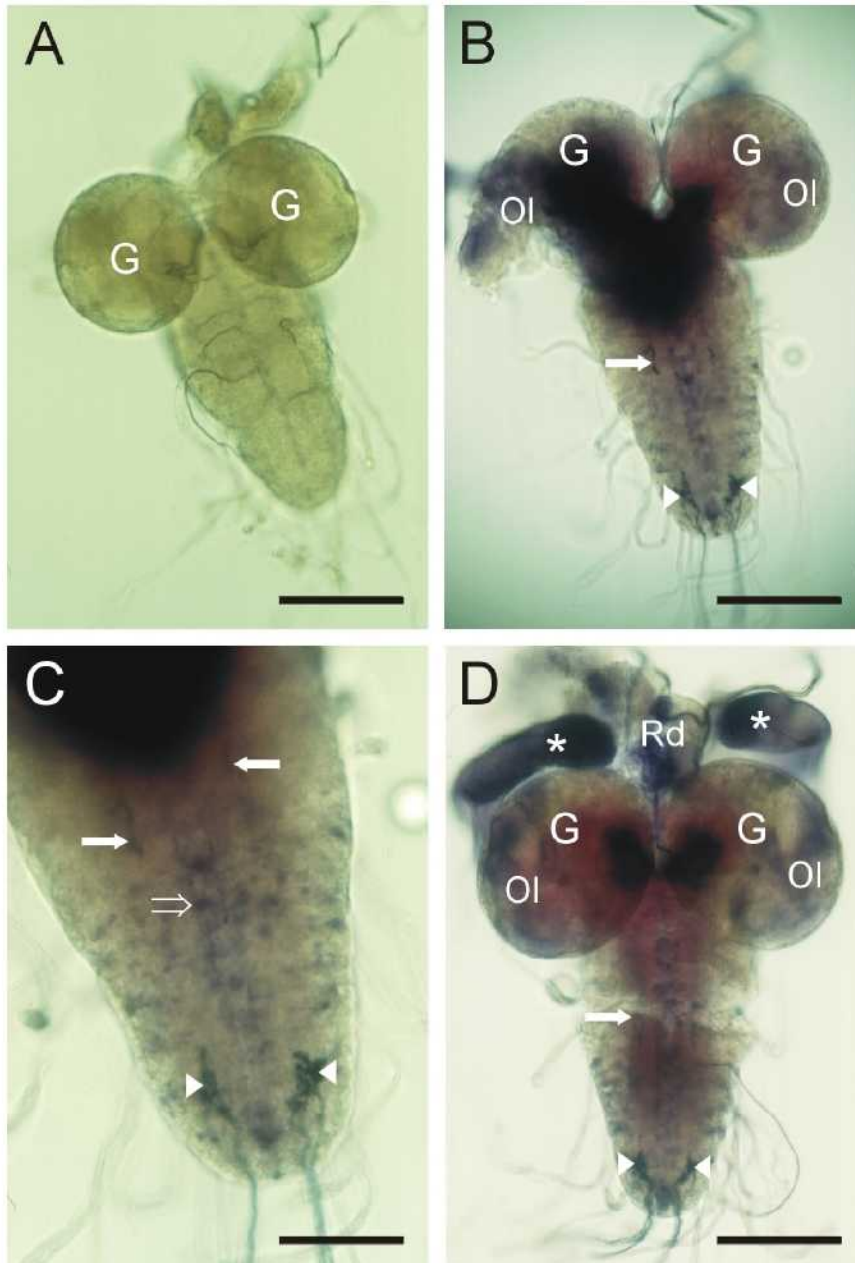


Abb. 31: Diaphorase-Färbung larvaler Gehirne von *Drosophila* (3. Larvenstadium). Die Farbreaktionen wurden für 5 h bei RT im Dunkeln durchgeführt. **A)** Durchlichtaufnahme eines Gehirns, das ohne Zugabe von β -NADPH (Kontrolle) gefärbt wurde. **B)** Durchlichtaufnahme eines gefärbten Gehirns. Die Gehirnhemisphären (G) und die optischen Loben (Ol) sind bezeichnet. Die Interneurone sind durch einen Pfeil markiert. Die Motoneurone des posterioren abdominalen Neuromers sind durch Pfeilspitzen markiert. **C)** Durchlichtaufnahme einer Ausschnittsvergrößerung (aus B) des ventralen Nervenstrangs. Ein offener Pfeil markiert Zellen entlang der Mittellinie des larvalen Gehirns. **D)** Durchlichtaufnahme eines gefärbten Gehirns. Sterne markieren die Imaginalscheiben für Augen und Antennen oberhalb der Gehirnhemisphären (G). Die Ringdrüse (Rd) ist markiert. Bezeichnung nach WILDEMANN & BICKER (1999). Der Balken entspricht 200 μ m in A, B, D und 100 μ m in C.

Aus den Arbeiten zur Entwicklung des Zentralen Nervensystems (ZNS) der Fruchtfliege (s.o.) ist bekannt, dass in den Imaginalscheiben eine starke Diaphoraseaktivität vorhanden ist (KUZIN et al., 1996). Die in Abbildung 32 gezeigten Färbungen bestätigen diese Ergebnisse. Neben der Ringdrüse (Abb. 32B, Rd) sind die Antennen-, Augen- und Bein-Imaginalscheiben stark gefärbt (Abb. 32B-D).

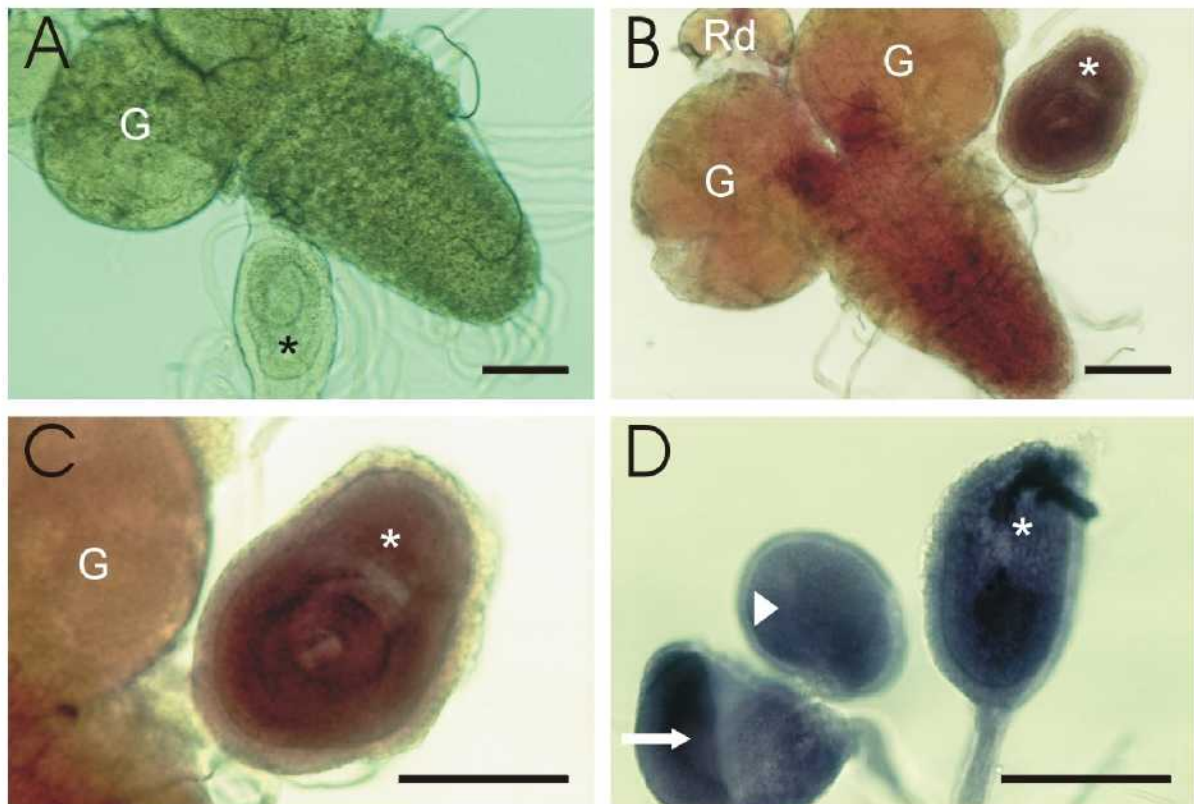


Abb. 32: Diaphorase-Färbung larvaler Imaginalscheiben von *Drosophila* (3. Larvenstadium). Die Farbreaktionen wurden für 5 h bei RT im Dunkeln durchgeführt. **A)** Durchlichtaufnahme eines Gehirns, das ohne Zugabe von β -NADPH (Kontrolle) gefärbt wurde. Eine Gehirnhemisphäre (G) ist bezeichnet. Der Stern markiert eine Bein-Imaginalscheibe. **B)** Durchlichtaufnahme eines gefärbten Gehirns. Die Ringdrüse (Rd) ist bezeichnet. Der Stern markiert eine Bein-Imaginalscheibe. **C)** Durchlichtaufnahme einer Ausschnittsvergrößerung (aus B). Die Bein-Imaginalscheibe ist durch einen Stern markiert. **D)** Durchlichtaufnahme einer Ausschnittsvergrößerung verschiedener Imaginalscheiben. Der Pfeil markiert die Augen-Imaginalscheibe, die Pfeilspitze die Antennen-Imaginalscheibe und der Stern eine Bein-Imaginalscheibe. Bezeichnung nach WILDEMANN & BICKER (1999). Der Balken entspricht 100 μ m.

3.4.1.2 Diaphorase-Färbung in Gewebeschnitten adulter Fliegenköpfe

Nachdem die Diaphorase-Färbung an larvalen Gehirnen etabliert war, sollte sie auf Gewebeschnitte adulter *Drosophila* Köpfe übertragen werden. Für die Färbungen wurden sowohl Tiere des *Drosophila* Wildtyp-Fliegenstamms *Oregon R* als auch der

weißäugigen Mutante *w1118* benutzt. Die Köpfe wurden in Paraformaldehyd fixiert und anschließend 12 µm dicke Horizontalschnitte angefertigt (⇒ 2.11.2.1). Die Färbungen erfolgten für 1 h bei RT im Dunkeln (⇒ 2.12.2).

In Abbildung 33 ist die Diaphorase-Färbung an Wildtyp-Präparaten gezeigt. Im Vergleich zur Kontrolle (Abb. 33A), die ohne Zugabe von β -NADPH inkubiert wurde, ist in Abbildung 33B eine deutliche Färbung der Retina (R) und der angrenzenden Lamina (L) zu erkennen. Die lateralen Bereiche des Protocerebrums (Stern) und die antennalen Loben (Pfeilspitze) sind besonders stark gefärbt (Abb. 33B).

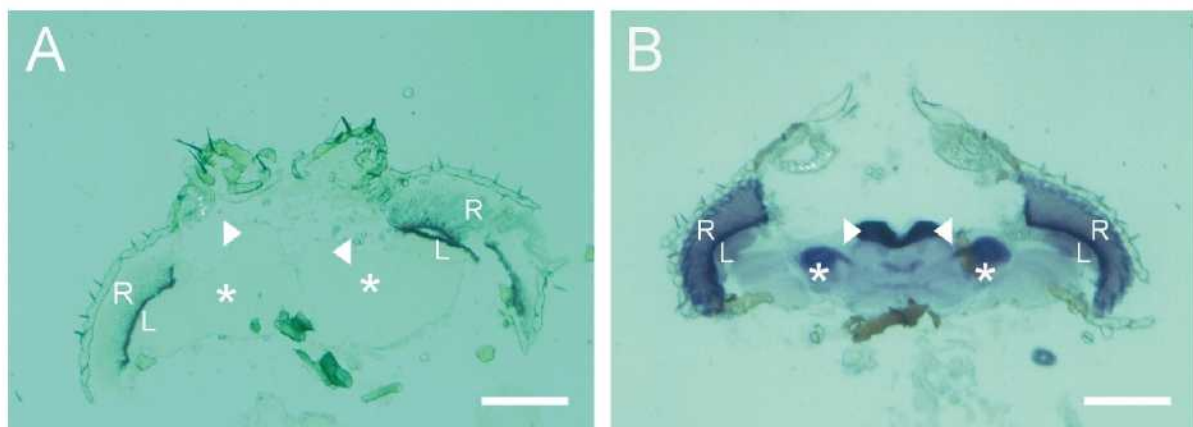


Abb. 33: Diaphorase-Färbung an Gewebeschnitten adulter *Drosophila* Köpfe. Die Farbreaktionen wurden für 1 h bei RT im Dunkeln an 12 µm dicken Gewebeschnitten durchgeführt. **A)** Durchlichtaufnahme eines Präparates, das ohne Zugabe von β -NADPH (Kontrolle) gefärbt wurde. Die Retina (R) und die Lamina (L) sind beschriftet. Die Pfeilspitzen markieren die antennalen Loben. Das laterale Protocerebrum ist jeweils durch einen Stern gekennzeichnet. **B)** Durchlichtaufnahme eines gefärbten Gewebeschnittes. Der Balken entspricht 200 µm.

In Gewebeschnitten der weißäugigen Mutante *w1118* (Abb. 34) werden dieselben Strukturen gefärbt wie in *Oregon R* (Wildtyp) Fliegen. Einzelne Zellen mit hoher Diaphoraseaktivität sind innerhalb der Lamina (L) und Medulla (M) zu erkennen (Abb. 34A). Dabei handelt es sich um Somata von Neuronen, die in Schichten angeordnet sind.

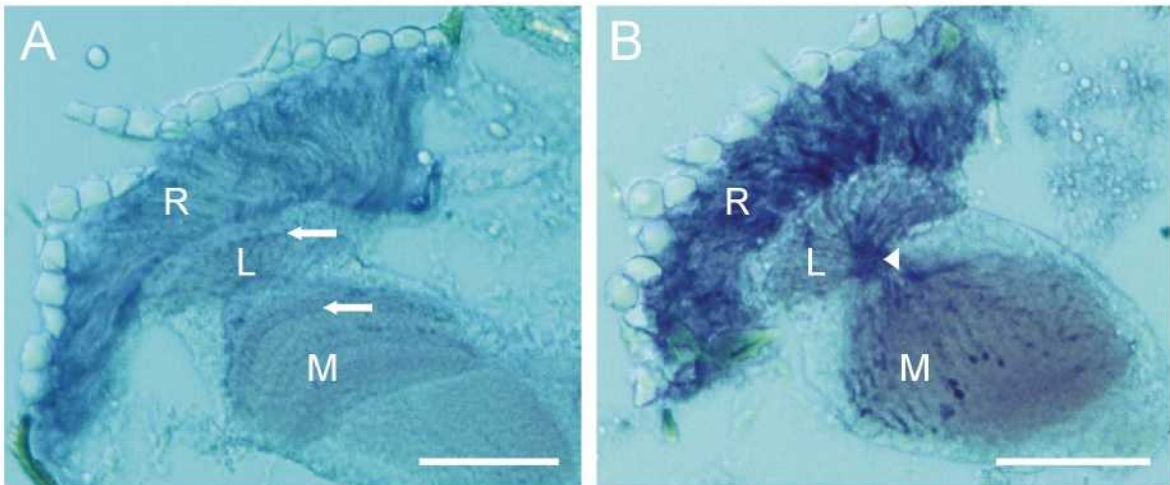


Abb. 34: Diaphorase-Färbung an Gewebeschnitten adulter *Drosophila* Köpfe. Die Farbreaktionen wurden für 1 h bei RT im Dunkeln an 12 µm dicken Gewebeschnitten weißäugiger Fliegen (*w1118*) durchgeführt. **A)** Durchlichtaufnahme eines gefärbten Gewebeschnittes. Die Retina (R), die Lamina (L) und die Medulla (M) sind bezeichnet. Die Pfeile markieren die gefärbten „Zellreihen“ in der Lamina und Medulla. **B)** Durchlichtaufnahme eines gefärbten Gewebeschnittes. Der Bereich des ersten optischen Chiasmas ist durch eine Pfeilspitze gekennzeichnet. Der Balken entspricht 100 µm.

3.4.2 Immunhistochemischer Nachweis der NO-Synthase

Die Diaphorase-Färbung (⇒ 3.4.1) gab einen Hinweis für die Expression der Stickoxid-Synthase (NOS) im larvalen Gehirn und in adulten Köpfen von *Drosophila*. Da diese Methode die Anwesenheit der NOS nicht beweist, wurde mit einem NOS-Antikörper (Sigma, Deisenhofen) überprüft, ob und welche Gewebe die NOS exprimieren. Der Antikörper erkennt NOS verschiedener Spezies (GIBBS & TRUMAN, 1998).

3.4.2.1 Immunhistochemischer Nachweis der NO-Synthase in larvalen Gehirnen

Larvale Gehirne (3. Larvenstadium) wurden präpariert, in Paraformaldehyd fixiert und mit dem NOS-Antikörper inkubiert (⇒ 2.11.2.3). Der Zweitantikörper war mit dem Fluoreszenzfarbstoff Alexa-488 markiert. Die Auswertung der Färbung erfolgte mit einem konfokalen Lasermikroskop.

In Abbildung 35 ist die Färbung eines larvalen Gehirns gezeigt. Die Durchlichtaufnahme (Abb. 35A) zeigt die Orientierung des Präparates. Die Gehirnhemisphären (G) und der ventrale Nervenstrang (V) sind deutlich zu erkennen. In Abbildung 35B ist die Fluoreszenzfärbung dieses Präparates gezeigt.

Wie mit der Diaphorase-Färbung, sind Zellen, die parallel zur Mittellinie des ventralen Nervenstrangs liegen (Pfeil), deutlich gefärbt. Ebenfalls sind die Motoneurone (Pfeilspitze), die Ringdrüse (Rd), fadenförmige Tracheolen (offener Pfeil) und die Imaginalscheiben (ohne Abb.) gefärbt. Im Gegensatz dazu sind die Interneurone nicht (\Rightarrow Abb. 31B-D) und die Gehirnhemisphären nur schwach und diffus fluoreszenzmarkiert (\Rightarrow Abb. 31B+D).

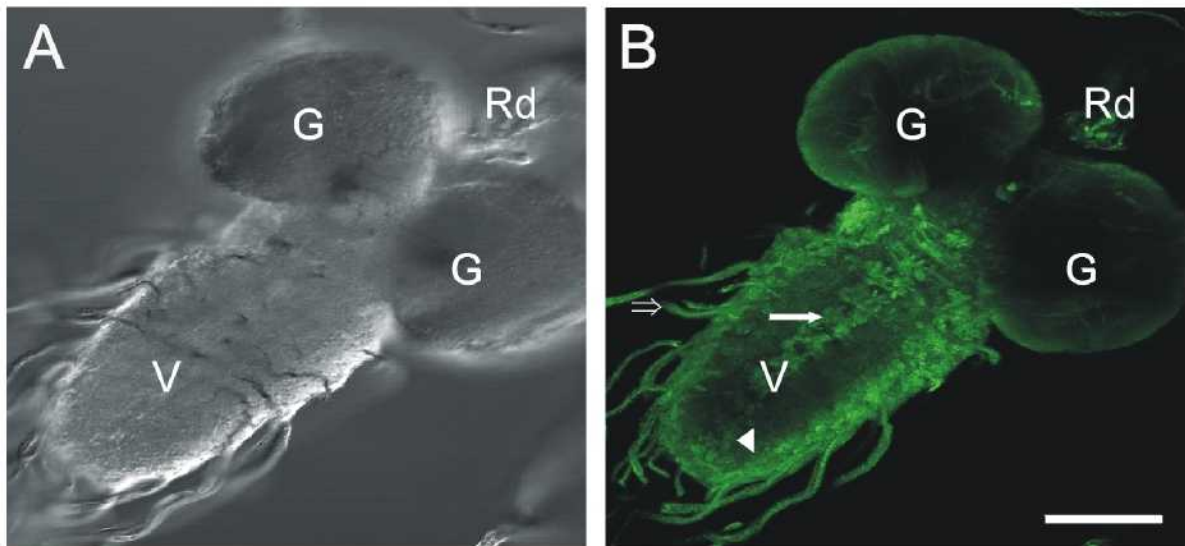


Abb. 35: Immunhistochemischer Nachweis der NO-Synthase in larvalen Gehirnen von *Drosophila* (3. Larvenstadium). Larvale Gehirne wurden fixiert und mit dem NOS-Antikörper (Verdünnung 1 : 50) inkubiert. Der Nachweis der gebundenen Erstantikörper erfolgte mit dem Fluoreszenzfarbstoff-gekoppelten Zweitantikörper α -rb-Alexa-488. **A)** Durchlichtaufnahme (DIC). **B)** Fluoreszenzaufnahme des larvalen Gehirns. Die Gehirnhemisphären (G), der ventrale Nervenstrang (V) und die Ringdrüse (Rd) sind bezeichnet. Der Pfeil markiert Zellen entlang der Mittellinie, die Pfeilspitze ein Motoneuron und der offene Pfeil eine Tracheole. Projektion von 16 Schnittebenen. Der Balken entspricht 100 μ m.

3.4.2.2 Immunhistochemischer Nachweis der NO-Synthase in Gewebeschnitten adulter Fliegenköpfe

Die Gewebeschnitte adulter Fliegenköpfe wurden, wie unter 2.11.2 beschrieben, behandelt und mit dem NOS-Antikörper inkubiert. Die Abbildung 36A zeigt den Horizontalschnitt eines Wildtyp-Fliegenkopfes, der nur mit dem Fluoreszenzfarbstoff-gekoppelten Zweitantikörper α -rb-CY5 inkubiert wurde (Kontrolle). Dieser Antikörper erzeugt keinen Hintergrund. Die Färbung mit dem NOS-Antikörper ist in Abbildung 36B gezeigt. Im visuellen System sind sowohl die Retina (R) als auch die Lamina (L) stark gefärbt. Außerdem sind die Randbereiche des Zentralgehirns gefärbt. Die

Ausschnittsvergrößerung des visuellen Systems (Abb. 36C) zeigt neben einer gleichmäßigen Färbung der Retina und Lamina auch die deutliche Färbung einzelner Zellen in der Lamina (Pfeilspitze). Diese bandförmige Anordnung der Zellen ähnelt den Ergebnissen der Diaphorase-Färbung (\Rightarrow Abb. 34A). Mit dem NOS-Antikörper werden ebenfalls die antennalen Loben gefärbt (Abb. 36D). In der Ausschnittsvergrößerung sind einzelne Glomeruli (Pfeile) innerhalb eines Lobus zu erkennen.

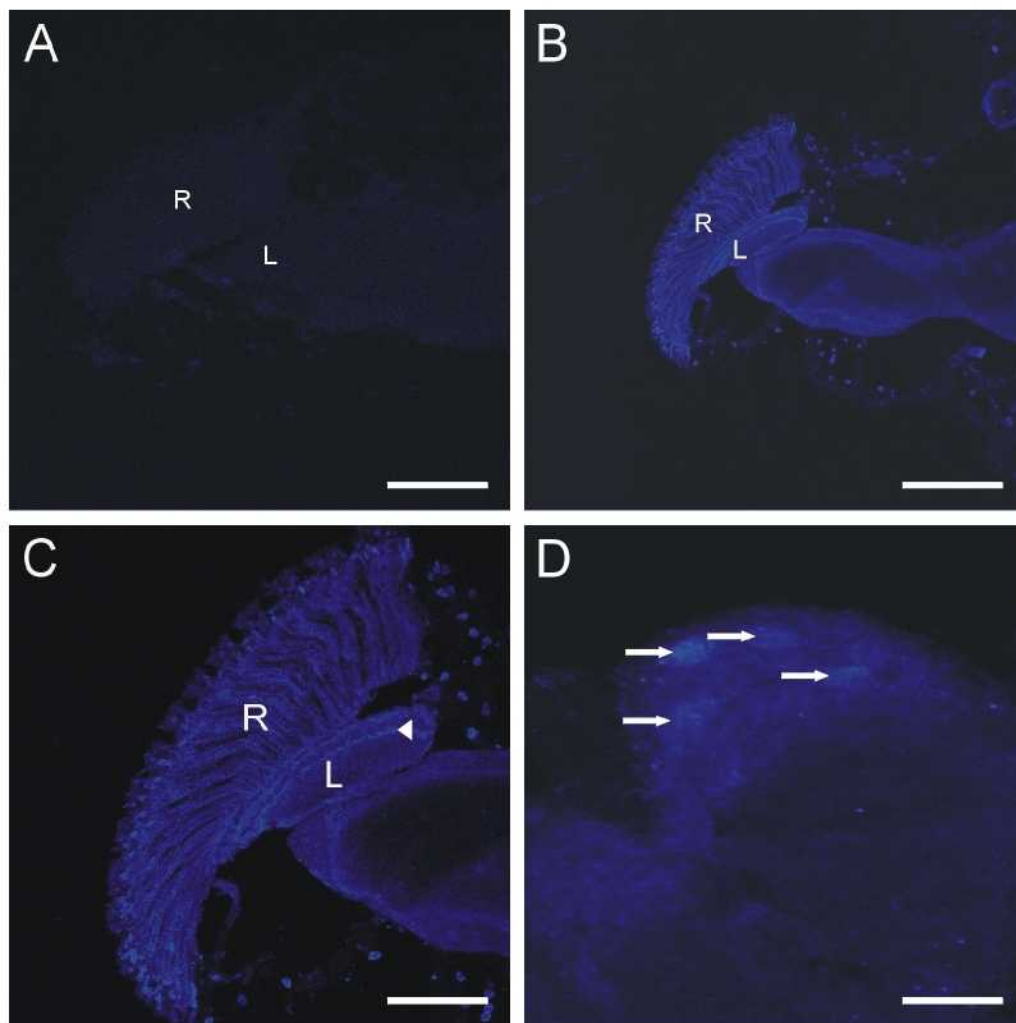


Abb. 36: Immunhistochemischer Nachweis der NOS in Gewebeschnitten adulten *Drosophila* Köpfe. Wildtyp-Fliegen wurden fixiert, 12 μm dicke Gewebeschnitte angefertigt und mit dem NOS-Antikörper (Verdünnung 1:50) inkubiert. Der Nachweis der gebundenen Erstantikörper erfolgte mit dem Fluoreszenzfarbstoff-gekoppelten Zweitantikörper $\alpha\text{-rb-CY5}$. **A)** Durchlichtaufnahme (DIC) bei Verwendung des Fluoreszenzfarbstoff-gekoppelten Zweitantikörpers (Kontrolle). Die Retina (R) und Lamina (L) sind bezeichnet. **B)** Übersichtsaufnahme der linken Kopfhälfte eines gefärbten Präparates. **C)** Ausschnittsvergrößerung des visuellen Systems (aus B). Die Pfeilspitze markiert eine gefärbte „Zellreihe“ in der Lamina. **D)** Detailaufnahme der Färbung eines antennalen Lobus. Die Pfeile markieren einzelne Glomeruli. Projektion von 8 Schnittebenen. Der Balken entspricht 100 μm in A und B, 50 μm in C und 25 μm in D.

Aus der Literatur war bekannt, dass vor allem die antennalen Loben hohe Diaphoraseaktivität besitzen. Ich habe dieses Ergebnis durch Diaphorase-Färbungen und immunhistochemische Färbungen mit einem NOS-Antikörper bestätigt. Erstmals konnte gezeigt werden, dass die NOS auch in der Retina exprimiert wird. Da die Expression der löslichen Guanylatzyklase mit molekularbiologischen Methoden nachgewiesen wurde (YOSHIKAWA et al., 1993; SHAH & HYDE, 1995) und ich die DmCNGA-Untereinheit des CNG-Kanals mit immunhistochemischen Methoden in der Retina identifiziert habe, lassen diese Ergebnisse vermuten, dass in der *Drosophila* Retina ein Signalweg existiert, der cGMP als Botenstoff verwendet und in dem ein CNG-Kanal (hier DmCNGA) als Endglied fungiert (\Rightarrow 4.4).

4 Diskussion

Die funktionelle Bedeutung von CNG-Kanälen für den Seh- und Riechvorgang bei Wirbeltieren ist intensiv untersucht und gut verstanden (Übersicht: KAUPP & SEIFERT, 2002; FIRESTEIN, 2001). Welche Aufgaben CNG-Kanäle bei *Drosophila melanogaster* haben, ist bisher nicht bekannt. Das erste *Drosophila* CNG-Kanalgen (*Dmcnga*) wurde in unserem Arbeitskreis kloniert und die elektrischen Eigenschaften homooligomerer DmCNGA-Kanäle wurden *in vitro* bestimmt (BAUMANN et al., 1994).

In dieser Arbeit wurden drei weitere homologe CNG-Kanalgene im Genom der Fruchtfliege identifiziert. Ein Gen (*Dmcngb*) wurde vollständig kloniert. Ein cDNA-Klon, der für die DmCNG3-Untereinheit kodiert, wurde von einer japanischen Arbeitsgruppe zur Verfügung gestellt. Mit immunzytochemischen Färbungen habe ich zeigen können, dass die DmCNGA-Kanaluntereinheit in der Retina adulter Fliegen exprimiert wird. In diesem Gewebe habe ich ebenfalls die Stickoxid-Synthase nachgewiesen. Es war bereits bekannt, dass Guanylatzyklasen in der Retina exprimiert werden. Diese Ergebnisse zeigen, dass in der Retina von *Drosophila* ein cGMP-gesteuerter Signalweg existiert.

4.1 Klonierung und Charakterisierung der *Drosophila* DmCNGB-Kanaluntereinheit

Im *Drosophila* Genom (ADAMS et al., 2000) wurden drei zum *Dmcnga*-Gen homologe Gene identifiziert, die für potentielle CNG-Kanaluntereinheiten kodieren. Ein Gen (*Dmcngb*) wurde vollständig aus Kopf-cDNA-Präparationen kloniert und die Eigenschaften nach der heterologen Expression in HEK293-Zellen untersucht.

Die Nukleinsäuresequenz des klonierten *Dmcngb*-Gens stimmt nicht vollständig mit der Sequenz in der Datenbank überein. An insgesamt 40 Positionen weicht die klonierte cDNA-Sequenz von der Datenbanksequenz ab. Diese Sequenzabweichungen können darin begründet sein, dass in dieser Arbeit der *Drosophila* Wildtypstamm *Oregon R* zur cDNA-Synthese verwendet wurde, während

für die Genomsequenzierung der Fliegenstamm *Canton S* verwendet wurde. Die Nukleotidaustausche führen nur an drei Positionen zu Änderungen in der Aminosäuresequenz (\Rightarrow 3.1.3); alle anderen Austausche sind „stumme Mutationen“.

Immunzytochemische Färbungen *Dmcn gb*-HA transfizierter HEK293-Zellen zeigen, dass das DmCNGB-Protein in den Zellen exprimiert wird (\Rightarrow 3.2.1.2). Weder mit Ca^{2+} -Imaging noch mit „Patch-clamp“-Messungen, die von Dr. S. Frings durchgeführt wurden, konnten jedoch zyklisch Nukleotid-aktivierbare Ströme nachgewiesen werden. Dieses negative Ergebnis kann mehrere Ursachen haben:

1. Der immunzytochemische Nachweis des DmCNGB-HA-Proteins erfolgte über das C-terminale HA-Epitop-Tag (\Rightarrow 3.2.1.2). Nur wenn das Protein vollständig in den Zellen synthetisiert wird, kann es von dem Antikörper erkannt werden. Circa 50% der transfizierten Zellen sind spezifisch angefärbt (\Rightarrow 3.2.1.2). In diesen Zellen wird das DmCNGB-HA-Protein komplett translatiert. Ob das DmCNGB-HA-Protein in die Plasmamembran eingebaut ist oder ob es sich in intrazellulären Kompartimenten (Golgi-Apparat) befindet, kann mit dieser Färbemethode nicht bestimmt werden.
2. Das Protein könnte nicht vollständig gefaltet sein, weil die Anwesenheit eines anderen Proteins oder einer anderen CNG-Kanaluntereinheit für die richtige Faltung notwendig ist. Von CNG-Kanälen aus Wirbeltieren ist bekannt, dass die β -Untereinheiten keine funktionellen homooligomeren Kanäle bilden (CHEN et al., 1993; KÖRSCHEN et al., 1995; GERSTNER et al., 2000). Werden β -Untereinheiten mit α -Untereinheiten koexprimiert, entstehen Kanäle, deren elektrische Eigenschaften sich nur geringfügig von nativen Kanälen unterscheiden (KÖRSCHEN et al., 1995; BÖNIGK et al., 1999). Die Sequenzvergleiche haben gezeigt (\Rightarrow 3.1.2), dass das DmCNGB-Protein zur Gruppe der β -Untereinheiten der CNG-Kanäle gehört. Es ist möglich, dass DmCNGB - wie Wirbeltier β -Untereinheiten - keine homooligomeren Kanäle bildet.

Auch wenn DmCNGB alleine keine funktionellen Kanäle bilden kann, so könnte sich diese Untereinheit mit den anderen *Drosophila* Kanaluntereinheiten zu heterooligomeren Komplexen zusammenlagern. Die Koexpression von DmCNGA und DmCNGB-HA hat gezeigt, dass beide Untereinheiten in denselben Zellen exprimiert werden. Der Anteil kotransfizierter Zellen beträgt ca. 5% (\Rightarrow 3.2.3.2). Die Koexpression von DmCNGA und DmCNGB-HA wirkt sich nicht auf die elektrischen Eigenschaften der zyklisch Nukleotid-gesteuerten Kanäle aus. Die Ströme entsprechen denen homooligomerer DmCNGA-Kanäle (\Rightarrow 3.2.4.1). Wie kann dieses Ergebnis interpretiert werden? Mehrere Ursachen kommen in Betracht:

1. DmCNGB-HA wird nicht in die Plasmamembran transportiert und ist somit für die Bildung heterooligomerer Kanäle nicht verfügbar.
2. Beide Proteine werden in HEK293-Zellen und HEK-TSA-Zellen exprimiert, kommen zur Plasmamembran, bilden aber keinen gemeinsamen Komplex. Nur die α -Untereinheit (DmCNGA) bildet funktionelle Kanäle, deren Ströme nachweisbar sind.
3. Die immunzytochemische Färbung *Dmcnga/Dmcngb* kotransfizierter Zellen zeigt, dass $\sim 5\%$ der Zellen beide Proteine gleichzeitig exprimieren (\Rightarrow 3.2.3.2). Möglicherweise wurden die elektrophysiologischen Messungen an Zellen durchgeführt, die nur das DmCNGA-Protein exprimierten. Das könnte erklären, warum die elektrischen Eigenschaften der Kanäle denen homooligomerer DmCNGA-Kanäle entsprechen.

Die Methode der Koimmunpräzipitation könnte dazu beitragen, zwischen diesen verschiedenen Möglichkeiten zu unterscheiden. Erste Versuche mit Membranproteinen aus unterschiedlich transfizierten HEK293-Zellen (\Rightarrow 3.2.5) wurden in dieser Arbeit durchgeführt. Das mit einem HA-Epitop markierte DmCNGB-Protein (DmCNGB-HA) wurde immunpräzipitiert. Der Ansatz, Komplexe aus DmCNGB-HA und DmCNGA koimmunpräzipitieren, scheiterte bisher.

4.2 Vergleich der *Drosophila* CNG-Kanaluntereinheiten mit anderen CNG-Kanälen

CNG-Kanäle besitzen charakteristische Strukturelemente. Dazu gehören das S4-Motiv, die Pore und der Bereich, der für die Bindung der zyklischen Nukleotide (cNMP-Bindestelle) verantwortlich ist. Der Vergleich der abgeleiteten Aminosäuresequenzen hat gezeigt, dass die neu identifizierten *Drosophila* CNG-Kanaluntereinheiten zu den menschlichen CNG-Kanaluntereinheiten homolog sind (\Rightarrow Abb. 5; Tab. 4). Betrachtet man die oben genannten Sequenzmotive genauer, fallen sowohl Gemeinsamkeiten als auch Unterschiede auf.

4.2.1 Das Spannungsfühler-Motiv (S4)

Charakteristisch für das S4-Motiv spannungsaktivierter K^+ -Kanäle sind 5-7 positiv geladene Aminosäuren (R oder K) an jeder 3. Position, die von zwei, meistens hydrophoben Aminosäuren gefolgt sind ($^R/KXX$) (JAN & JAN, 1992; PONGS, 1992). Die Grundlage des spannungsabhängigen Öffnens der spannungsaktivierten Ionenkanäle ist die Beeinflussung des Gleichgewichts zwischen offenen und geschlossenen Konformationszuständen durch die Membranspannung (YANG et al., 1996; Übersicht: HILLE, 2001). Das S4-Motiv durchspannt die Membran und registriert als molekularer Dipol die Membranspannung. Bei Depolarisation der Membran verlagert sich der S4-Bereich zur extrazellulären Seite und bewirkt eine Konformationsänderung des Kanalproteins (AGGARWAL & MACKINNON, 1996; LARSSON et al., 1996; SEOH et al., 1996; YUSAF et al., 1996; STARACE & BEZANILLA, 2001).

In CNG-Kanälen ist das S4-Motiv kürzer als in spannungsaktivierten Ionenkanälen. Die regelmäßige Abfolge ($^R/KXX$) ist in vielen CNG-Kanaluntereinheiten nur viermal wiederholt (Abb. 37). In der bCNGB1-Sequenz sind nur drei Wiederholungen vorhanden. Bezogen auf den spannungsaktivierten *Shaker* K^+ -Kanal beginnt die fünfte Wiederholung in den CNG-Kanaluntereinheiten bCNGA1/A3/B1 mit einer negativ geladenen Glutaminsäure (Abb. 37). In der nächsten „Wiederholung“ besitzt bCNGA1 ein Glutamin, bCNGA3 eine Asparaginsäure und bCNGB1 ein Asparagin. Die letzte Position des *Shaker* S4-Motivs (K368) ist bei den Rinder CNG-Kanaluntereinheiten von einer Glutaminsäure besetzt. An der zweiten Position der

„sechsten Wiederholung“ befindet sich in bCNGA1/A3/B1 ein positiv geladenes Arginin (Abb. 37).

Ein S4-Motiv ist, wie bei allen CNG-Kanälen, auch in den *Drosophila* CNG-Kanaluntereinheiten zu erkennen (Abb. 37). Bis auf DmCNG3, in dem das (^R/_KXX)-Motiv fünfmal vorkommt, besitzen DmCNGA, DmCNGB und DmCNG4 nur vier Wiederholungen des Motivs (Abb. 37). Wie in den Rinder CNG-Kanälen beginnt die „fünfte Wiederholung“ in DmCNGA und DmCNGB mit einer Glutaminsäure. In DmCNG4 ist diese Position von einem Alanin besetzt. Die „sechste Wiederholung“ beginnt in DmCNGA und DmCNG4 mit einer Asparaginsäure, in DmCNGB mit einem Arginin und in DmCNG3 mit einem Tyrosin. Wie bei den Wirbeltier CNG-Kanaluntereinheiten ist die letzte Position von einer negativ geladenen Aminosäure besetzt (Abb. 37).

CNG-Kanäle werden nicht durch Änderungen der Membranspannung aktiviert, sondern durch Bindung der intrazellulären Botenstoffe cGMP oder cAMP (Übersicht: KAUPP & SEIFERT, 2002). Dies trifft auch für die einzige bisher funktionell exprimierte *Drosophila* CNG-Kanaluntereinheit (DmCNGA) zu (BAUMANN et al., 1994). Im Vergleich zu den anderen in Abbildung 37 gezeigten CNG-Kanaluntereinheiten besitzt DmCNG3 insgesamt fünf Wiederholungen des (^R/_KXX)-Motivs. Diese Untereinheit konnte bisher noch nicht funktionell exprimiert werden (\Rightarrow 3.2.1.3; 3.2.2.3; MIYAZU et al., 2000). Wenn dies gelingt, wäre es interessant zu prüfen, ob DmCNG3-Kanäle spannungsabhängig geöffnet werden. Auffällig ist der Austausch der vierten positiv geladenen Aminosäure in der Sequenz der β -Untereinheit bCNGB1 und der DmCNGB-Sequenz (Abb. 37). Dies sind die einzigen CNG-Kanaluntereinheiten, die an dieser Position keine positiv geladene Aminosäure haben.

DmCNGA	222-	R L N R L L R I N R L W E W F D R T E	-240
DmCNGB	572-	R F P R F F K I Q S F W E V F R L L D	-590
DmCNG3	230-	R F T R F F K V Y R S V R F Y Y I V E	-248
DmCNG4	101-	R S F R L V K I Y R F W A F M D R T E	-119
bCNGA1	269-	R L N R L L R I S R M F E F F Q R T E	-287
bCNGA3	293-	R F N R L L K L A R L F E F F D R T E	-311
bCNGB1	876-	R L P R C L K Y M A F F E F N N R L E	-894
Shaker	350-	R V I R L V R V F R I F K L S R H S K	-368
DmEAG	347-	K V V R L L R L G R V V R K L D R Y L	-365
		↑ ↑ ↑ ↑ ↑ ↑ ↑	

Abb. 37: Aminosäure-Sequenzvergleich des Spannungsfühler-Motivs (S4). Die Aminosäuresequenzen des S4-Segments der vier *Drosophila* CNG-Kanaluntereinheiten (DmCNGA, DmCNGB, DmCNG3, DmCNG4), der α -Untereinheit des Rinder CNG-Kanals aus Sehstäbchen (bCNGA1; KAUPP et al., 1989) und Sehzapfen (bCNGA3; WEYAND et al., 1994), der β -Untereinheit des Rinder CNG-Kanals (bCNGB1; KÖRSCHEN et al., 1995), des *Shaker* b-Kanals aus *Drosophila melanogaster* (Shaker; PONGS et al., 1988) und des ether-a-gogo (EAG)-Kanals aus *Drosophila melanogaster* (DmEAG; WARMKE et al., 1991) werden miteinander verglichen. Die Position der ersten und letzten Aminosäure ist angegeben. Positiv geladene Aminosäuren sind fett hervorgehoben, negativ geladene Aminosäuren grau unterlegt. Die in regelmäßiger Abfolge auftretenden positiv geladenen Aminosäuren des *Shaker* b-Kanals sind durch Pfeile hervorgehoben.

4.2.2 Die Porenregion

Die Selektivitäts- und Leiteigenschaften von Ionenkanälen werden maßgeblich durch die Aminosäuresequenz der Porenregion bestimmt. Die Porenregion besteht aus etwa 25 Aminosäuren, die die Plasmamembran jedoch nicht vollständig durchspannen (Übersicht: HILLE, 2001). Die Kristallstruktur der Porenregion eines K^+ -selektiven Ionenkanals ist inzwischen aufgeklärt (DOYLE et al., 1998; ZHOU et al., 2001). Die Strukturaufklärung hat entscheidend zum molekularen Verständnis des K^+ -Durchtritts durch die Pore beigetragen (MORAIS-CABRAL et al., 2001). In spannungsaktivierten K^+ -Kanälen bilden die Aminosäuren TVGYG den Selektivitätsfilter für K^+ -Ionen (MORAIS-CABRAL et al., 2001; ZHOU et al., 2001). Eine Deletion der Aminosäuren (YG) führt zum Verlust der Ionenselektivität. Heterolog exprimierte K^+ -Kanalmutanten diskriminieren nicht mehr zwischen monovalenten Kationen und werden durch Ca^{2+} blockiert (HEGINBOTHAM et al., 1992).

CNG-Kanäle sind nicht-selektive Kationenkanäle. Sie sind für monovalente (Na^+ , K^+) und divalente (Ca^{2+} , Mg^{2+}) Kationen permeabel (Übersicht: KAUPP & SEIFERT, 2002). In Abbildung 38 ist ein Sequenzvergleich der Porenregionen von CNG-Kanälen und K^+ -selektiven Ionenkanälen gezeigt. In den CNG-Kanaluntereinheiten ist das (Y / $_F$ G)-Motiv nicht vorhanden, das für die Selektivität der K^+ -Kanäle verantwortlich ist.

DmCNGA	300-	I	Y	S	F	Y	W	S	T	L	T	L	T	T	I	G	-	-	E	T	P	T	P	E	-	320
DmCNGB	643-	V	R	C	F	A	F	A	T	K	T	A	T	S	I	G	-	-	K	N	P	K	P	E	-	663
DmCNG3	307-	L	G	S	L	Y	W	S	T	L	T	L	T	T	I	G	-	-	D	L	P	T	P	E	-	327
DmCNG4	177-	L	Q	S	Y	Y	W	C	T	L	A	L	T	T	I	G	-	-	D	L	P	K	P	R	-	197
bCNGA1	348-	V	Y	S	L	Y	W	S	T	L	T	L	T	T	I	G	-	-	E	T	P	P	P	V	-	368
bCNGA3	372-	I	Y	S	L	Y	W	S	T	L	T	L	T	T	I	G	-	-	E	T	P	P	P	V	-	392
bCNGB1	947-	I	R	C	Y	Y	W	A	V	K	T	L	I	T	I	G	-	-	G	L	P	D	P	R	-	967
Shaker	418-	P	D	A	F	W	W	A	V	V	T	M	T	T	V	G	Y	G	D	M	T	P	V	G	-	440
DmEAG	441-	V	T	A	L	Y	F	T	M	T	C	M	T	S	V	G	F	G	N	V	A	A	E	T	-	463

* *

Abb. 38: Aminosäure-Sequenzvergleich der Porenregion. Die Aminosäuresequenzen der Porenregion der vier *Drosophila* CNG-Kanaluntereinheiten (DmCNGA, DmCNGB, DmCNG3, DmCNG4), der α -Untereinheit des Rinder CNG-Kanals aus Sehstäbchen (bCNGA1; KAUPP et al., 1989) und Sehzapfen (bCNGA3; WEYAND et al., 1994), der β -Untereinheit des Rinder CNG-Kanals (bCNGB1; KÖRSCHEN et al., 1995), des *Shaker* b-Kanals aus *Drosophila melanogaster* (Shaker; PONGS et al., 1988) und des ether-a-gogo (EAG)-Kanals aus *Drosophila melanogaster* (DmEAG; WARMKE et al., 1991) werden miteinander verglichen. Die Position der ersten und letzten Aminosäure ist angegeben. Bezogen auf die DmCNGA-Sequenz sind identische Aminosäuren schwarz und konservative Aminosäureaustausche grau unterlegt. Konservative Austausche nach DAYHOFF et al. (1978) sind (P, A, G, S, T), (M, I, L, V), (H, R, K), (D, E, N, Q), (F, W, Y). Das Y / $_F$ G-Motiv der K^+ -selektiven Kanäle ist durch Sterne hervorgehoben. Zur Optimierung des Sequenzvergleichs mit den spannungsaktivierten K^+ -Kanälen wurden Lücken (-) eingefügt.

Eine interessante Eigenschaft der CNG-Kanäle ist, dass sie für Ca^{2+} -Ionen permeabel sind (FINN et al., 1996; DZEJA et al., 1999). Während des Durchtritts durch die Pore werden die Ca^{2+} -Ionen von Carboxylgruppen der Glutamat-Reste (E363 in bCNGA1; E340 in bCNGA2) gebunden (ROOT & MACKINNON, 1993; EISMANN et al., 1994; SEIFERT et al., 1999; GAVAZZO et al., 2000) und blockieren den Einstrom monovalenter Kationen. In heterolog exprimierten CNG-Kanälen wird dieser Ca^{2+} -Block durch Änderungen der Membranspannung wieder aufgehoben. Auch Änderungen des extrazellulären pH-Werts modulieren die Ca^{2+} -Permeation durch CNG-Kanäle (DZEJA et al., 1999; SEIFERT et al., 1999; GAVAZZO et al., 2000). Negativ geladene Aminosäuren befinden sich an entsprechenden Positionen wie in

bCNGA1/A2 auch in den bCNGA3- (E387), DmCNGA- (E315), DmCNG3- (D322) und DmCNG4-Untereinheiten (D192). Der *Drosophila* DmCNGA-Kanal ist für Ca^{2+} -Ionen permeabel (BAUMANN et al., 1994; DZEJA et al., 1999). Es ist zu erwarten, dass auch die *Drosophila* DmCNG3- und DmCNG4-Kanäle Ca^{2+} -permeabel sind, weil sie an der Position, die für die Ca^{2+} -Bindung wichtig ist, eine negative Ladung tragen (Abb. 38).

An mehreren Positionen in der Pore unterscheiden sich die β -Untereinheiten deutlich von den α -Untereinheiten. Einige dieser Aminosäureaustausche sind zwischen bCNGB1 und DmCNGB konserviert. Zwei positiv geladene Aminosäuren R948, K955 des bCNGB1-Proteins sind in DmCNGB an der entsprechenden Position (R644, K651) vorhanden. Die α -Untereinheiten besitzen an diesen Stellen ungeladene oder hydrophobe Aminosäuren. Eine weitere Gemeinsamkeit zwischen bCNGB1 und DmCNGB ist ein Cystein-Rest an Position C949 (bCNGB1) bzw. C645 (DmCNGB). In der β -Untereinheit des Rinder Sehstäbchenkanals bCNGB1 fehlt die negativ geladene Aminosäure, die für die Ca^{2+} -Bindung der CNG-Kanäle wichtig ist. Sie ist durch ein Glycin (G962) ersetzt. An dieser Position besitzt das DmCNGB-Protein eine positiv geladene Aminosäure (K658).

An zwei weiteren Positionen sind geladene Aminosäuren im bCNGB1- und DmCNGB-Protein ausgetauscht. Anstelle des D965 in bCNGB1 befindet sich bei DmCNGB ein Lysin (K661). Ebenso ist das R967 in bCNGB1 durch ein E663 in DmCNGB ersetzt. Die beiden zuletzt beschriebenen Positionen sind in bCNGA1 und bCNGA3 von ungeladenen Aminosäuren besetzt (Abb. 38). Auch in den DmCNGA- und DmCNG3-Untereinheiten ist die erste Position (= D965 in bCNGB1) von einem Threonin besetzt (T318; T325). In der DmCNG4-Untereinheit befindet sich an der entsprechenden Position, wie auch bei DmCNGB, ein Lysin (K195). Im Vergleich zur bCNGB1-Untereinheit (R967) hat DmCNG4 an der entsprechenden Position ebenfalls ein Arginin (R197). Im Gegensatz dazu haben DmCNGA und DmCNG3, genauso wie DmCNGB, eine negative Aminosäure (E320, E327; Abb. 38). Ob DmCNGB tatsächlich eine β -Untereinheit eines CNG-Kanals ist, muss experimentell geprüft werden. Die Sequenzähnlichkeiten zwischen bCNGB1 und DmCNGB im vorderen Porenbereich sprechen dafür, dass auch DmCNGB eine β -Untereinheit ist.

4.2.3 Die Bindestelle für zyklische Nukleotide

CNG-Kanäle werden durch die intrazellulären Botenstoffe cAMP oder cGMP geöffnet. Die zyklischen Nukleotide binden an die C-terminal gelegene Bindestelle (Übersicht: KAUPP & SEIFERT, 2002). Die Bindestelle besitzt große Sequenzähnlichkeit zu zyklischen Nukleotid-Bindestellen cAMP- und cGMP-abhängiger Proteinkinasen (WEBER et al., 1987; WEBER et al., 1989) und zum CAP (catabolite activator protein) aus *E. coli*. Die Kristallstruktur des CAP-Proteins ist aufgeklärt (MCKAY & STEITZ, 1981). In Abbildung 39 sind die Sekundärstrukturelemente unter den Sequenzen angegeben. Die Bindestelle des CAP besteht aus drei α -Helices (α A- α C) und acht β -Faltblättern (β 1- β 8). Der Ligand (cAMP) wird in einer Tasche gebunden, an deren Ausbildung mehrere β -Faltblätter und die α C-Helix beteiligt sind.

Mit Hilfe der Kristallstruktur des CAP (MCKAY & STEITZ, 1981; SCHULTZ et al., 1991) sowie durch Vergleich mit cAMP-Bindestellen cAMP-abhängiger Proteinkinasen (SHABB et al., 1995) wurden konservierte Aminosäuren identifiziert, die für die Sekundärstruktur der cNMP-Bindestelle bzw. für die Bindung des Liganden in CNG-Kanälen wichtig sind (Übersicht: KAUPP & SEIFERT, 2002). Diese Aminosäuren sind in Abbildung 39 durch Pfeile hervorgehoben.

Der Vergleich der vier *Drosophila* CNG-Kanaluntereinheiten mit den CNG-Kanälen aus Wirbeltieren zeigt, dass die Aminosäuren an den besonders wichtigen Positionen konserviert sind. Man kann deshalb erwarten, dass alle *Drosophila* CNG-Kanaluntereinheiten zyklische Nukleotide binden. Für DmCNGA, die einzige bisher funktionell exprimierte *Drosophila* CNG-Kanaluntereinheit, ist dieses nachgewiesen. DmCNGA wird bei einer Membranspannung von -80mV durch $\sim 13 \mu\text{M}$ cGMP bzw. $\sim 500 \mu\text{M}$ cAMP halbmaximal aktiviert (BAUMANN et al., 1994).

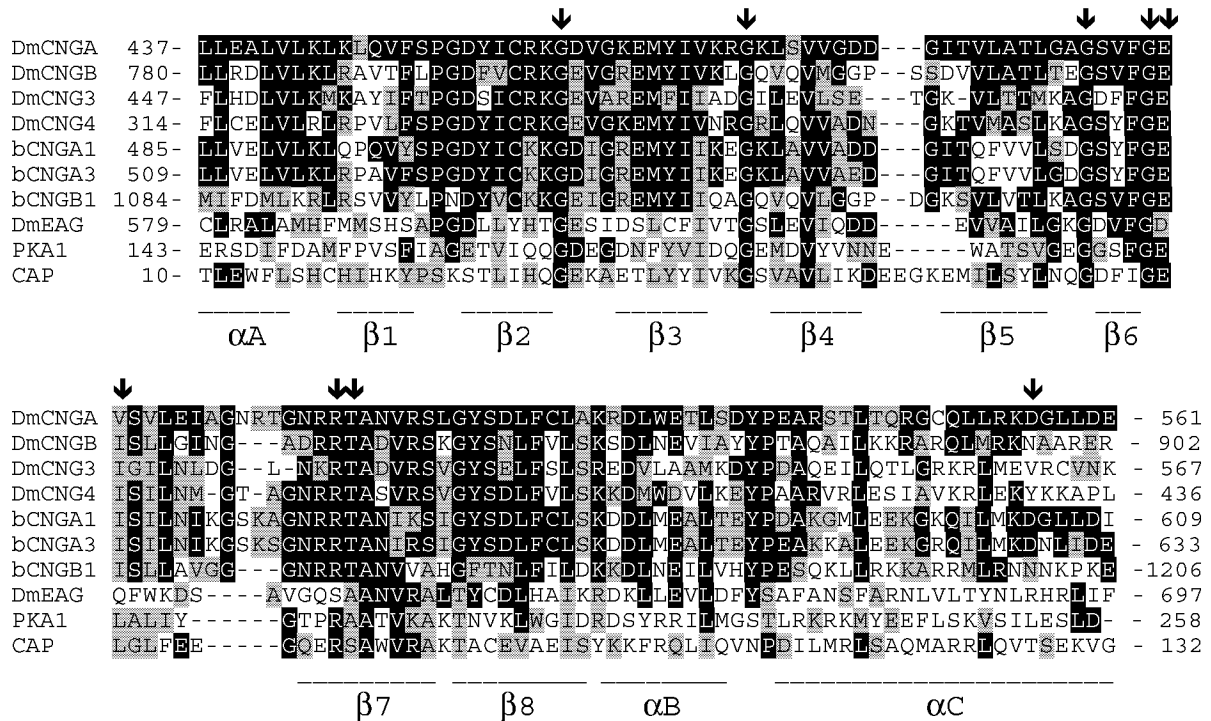


Abb. 39: Aminosäure-Sequenzvergleich der Bindestellen für zyklische Nukleotide. Die potentielle cNMP-Bindestelle der vier *Drosophila* CNG-Kanaluntereinheiten (DmCNGA, DmCNGB, DmCNG3, DmCNG4), der α -Untereinheit des Rinder CNG-Kanals aus Sehstäbchen (bCNGA1; KAUPP et al., 1989) und Sehzapfen (bCNGA3; WEYAND et al., 1994), der β -Untereinheit des Rinder CNG-Kanals (bCNGB1; KÖRSCHEN et al., 1995), des ether-a-gogo (EAG)-Kanals aus *Drosophila melanogaster* (DmEAG; WARMKE et al., 1991), der ersten Bindestelle der regulatorischen Untereinheit der cAMP-abhängigen Proteinkinase des Rindes (PKA1; TITANI et al., 1984) sowie des bakteriellen cAMP-regulierten Catabolit-Activator-Proteins (CAP; MCKAY & STEITZ, 1981) werden miteinander verglichen. Die Position der ersten und letzten Aminosäure ist angegeben. Konservierte Aminosäuren, die an der Ausbildung der Sekundärstruktur oder der Ligandenbindung beteiligt sind, sind durch Pfeile markiert (nach KAUPP & SEIFERT, 2001). Die Sekundärstrukturelemente des CAP-Proteins (α -Helices und β -Faltblätter; Swiss-Prot: P03020) sind unter den Sequenzen angegeben (nach KAUPP & SEIFERT, 2001). Bezogen auf die DmCNGA-Sequenz sind identische Aminosäuren schwarz und konservative Aminosäureaustausche grau unterlegt. Konervative Austausche nach DAYHOFF et al. (1978) sind (P, A, G, S, T), (M, I, L, V), (H, R, K), (D, E, N, Q), (F, W, Y). Zur Optimierung des Sequenzvergleichs wurden Lücken (-) eingefügt.

Die Ligandenspezifität der cNMP-Bindestelle wird von einem Arginin- und Threonin-Rest im β 7-Faltblatt (RTAN, R559/T560; bCNGA1; Abb. 39) mitbestimmt (Übersicht: KAUPP & SEIFERT, 2002). Die Sequenzabfolge ist zwischen dem DmCNGA-Protein und den Rinder CNG-Kanaluntereinheiten (bCNGA1/A3/B1) konserviert (Abb. 39). In der DmCNGB- und der DmCNG3-Untereinheit ist das Asparagin gegen eine negativ geladene Asparaginsäure ausgetauscht. In der DmCNG4-Untereinheit befindet sich an dieser Position ein Serin (Abb. 39). Ob diese Aminosäureaustausche eine Auswirkung auf die Bindeeigenschaften der Kanaluntereinheiten haben, könnte

durch gerichtete Mutageneseexperimente geklärt werden. Für die Ligandenbindung ist ebenfalls eine Asparaginsäure in der α C-Helix der cNMP-Bindestelle (D604; bCNGA1; Abb. 39) wichtig. Die Aminosäure ist in DmCNGA, bCNGA1 und bCNGA3 vorhanden (Abb. 39). In der β -Untereinheit (bCNGB1) und im DmCNGB-Protein ist sie gegen Asparagin ausgetauscht. An dieser Position besitzt DmCNG3 ein Valin und DmCNG4 ein Tyrosin. Der Austausch der negativ geladenen gegen eine neutrale oder positiv geladene Aminosäure hat in Wirbeltier CNG-Kanaluntereinheiten zur Folge, dass sie besser durch cAMP als durch cGMP aktiviert werden (Übersicht: KAUPP & SEIFERT, 2002). Es ist zu erwarten, dass CNG-Kanäle, die DmCNGB-, DmCNG3- und/oder DmCNG4-Untereinheiten enthalten, besser durch cAMP als durch cGMP aktiviert werden.

4.2.4 Sequenzmotive mit besonderen Aufgaben

Calcium ist ein wichtiger intrazellulärer Botenstoff, der an der Modulation zahlreicher Proteine beteiligt ist. Ein ubiquitärer Calciumsensor in Zellen ist das Ca^{2+} -Bindeprotein Calmodulin (CaM). Ca^{2+} -CaM-Komplexe binden an Zielproteine und aktivieren sie.

Die α -Untereinheit des CNG-Kanals aus Riechzellen (CNGA2) besitzt N-terminal eine CaM-Bindestelle (CHEN & YAU, 1994; LIU et al., 1994). Die β -Untereinheit aus Sehstäbchen (CNGB1a) besitzt zwei CaM-Bindestellen (HSU & MOLDAI, 1994; KÖRSCHEN et al., 1995; GRUNWALD et al., 1998; Übersicht: MOLDAI, 1996). Es wurde gezeigt, dass die Bindung von CaM die Ligandenempfindlichkeit des Kanals moduliert (CHEN & YAU, 1994; LIU et al., 1994; GRUNWALD et al., 1998; WEITZ et al., 1998). „Klassische“ CaM-Bindestellen umfassen in der Regel 20 Aminosäuren mit hydrophoben Aminosäuren an Position 1 und 14, häufig auch an den Positionen 5 und 8. Sie besitzen oft mehrere basische Aminosäuren (R und K), wodurch eine positive Nettoladung der Bindestelle resultiert (Übersicht: RHOADS & FRIEDBERG, 1997). Mit dem Programm MSA (Version 2.1, Washington University in St. Louis, USA; GUPTA et al., 1995) wurden CaM-Bindestellen-Sequenzen aus CNG-Kanälen von Wirbeltieren, CaM-Kinasen, Calcineurin, Stickoxid-Synthasen und Phosphodiesterasen (Sequenzen entnommen aus ZOCHÉ, 1997) mit den *Drosophila* CNG-Kanalsequenzen verglichen. Sowohl DmCNGB als auch DmCNG3 besitzen

danach eine potentielle CaM-Bindestelle. Die putative CaM-Bindestelle der DmCNG3-Sequenz liegt im C-Terminus (F1066-L1079) hinter der cNMP-Bindestelle. In der DmCNGB-Sequenz liegt der Kernbereich des CaM-Bindestellenmotivs (Aminosäure 1-14; V369-K382) im N-Terminus vor der ersten Transmembranregion. In der bCNGB1a-Untereinheit liegt die CaM-Bindestelle ebenfalls im N-Terminus (WEITZ et al., 1998). Ob CaM tatsächlich an den Bereich im DmCNGB-Protein bindet, muss zu einem späteren Zeitpunkt untersucht werden.

Die bisher beschriebenen Eigenschaften des DmCNGB-Proteins sprechen dafür, dass DmCNGB eine β -Untereinheit eines *Drosophila* CNG-Kanals ist.

4.3 Immunhistochemischer Nachweis einer CNG-Kanaluntereinheit in *Drosophila* Geweben

In den sensorischen Geweben der Wirbeltiere werden die CNG-Kanaluntereinheiten spezifisch in Sinneszellen, den Sehstäbchen, den Sehzapfen und den Zilien des olfaktorischen Epithels, exprimiert. Bei *Drosophila* wurden *Dmcnga*-Transkripte im Kopf und in den Antennen mit RT-PCR-Experimenten nachgewiesen (BAUMANN et al., 1994). Das DmCNG3-Protein wurde immunhistochemisch im Gehirn der Fliegen lokalisiert (MIYAZU et al., 2000).

In dieser Arbeit wurde zum ersten Mal auch das DmCNGA-Protein immunhistochemisch nachgewiesen. Als Antigen zur Antikörperherstellung wurde der C-Terminus dieser CNG-Kanaluntereinheit benutzt. In Gewebeschnitten adulter *Drosophila* Köpfe wurde eine spezifische Färbung ausschließlich in der Retina beobachtet. Andere Bereiche des ZNS waren ungefärbt. Eine spezifische Färbung der Antennen wurde nicht beobachtet.

Die Retina ist ein spezialisiertes sensorisches Gewebe, dessen 700-800 Einzelaugen der Bild- und Bewegungswahrnehmung dienen (DETTNER & PETERS, 1999). Jedes Einzelauge besteht aus 8 Photorezeptorzellen, in denen die molekularen Komponenten der Phototransduktion exprimiert werden (RANGANATHAN, 1995; SCOTT & ZUKER, 1997; MONTELL, 1999; HARDIE, 2001; HARDIE & RAGHU, 2001). Die Photorezeptorzellen sind von 12 akzessorischen Zellen umgeben. Welche Zellen mit dem gegen DmCNGA-gerichteten Antikörper angefärbt sind, ist unklar (\Rightarrow Abb. 28, DAB-Färbung). Im Vergleich zur Lichtmikroskopie ermöglicht die Verwendung eines

konfokalen Lasermikroskops eine bessere räumliche Auflösung. Immunhistochemische Färbungen mit Fluoreszenzfarbstoff-markierten Zweitantikörpern liefern dasselbe Ergebnis wie die oben beschriebene DAB-Färbung. Die Retina ist spezifisch gefärbt. Ob Photorezeptorzellen oder akzessorische Zellen gefärbt sind, ist nicht zu entscheiden (\Rightarrow Abb. 29).

Auch wenn die genaue zelluläre Lokalisation des DmCNGA-Proteins noch offen ist, stellt sich die Frage, an welchem Signaltransduktionsweg das DmCNGA-Protein in der Retina beteiligt sein könnte.

Die ersten Stufen des Sehvorgangs sind in Wirbellosen und Wirbeltieren konserviert. Einfallendes Licht wird in den Photorezeptorzellen von dem Sehfärbstoff Rhodopsin absorbiert. Das photoaktivierte Rhodopsin löst anschließend eine Kettenreaktion aus, die über G-Proteine vermittelt wird. Intrazelluläre Botenstoffkonzentrationen ändern sich lichtabhängig. Die mikrovillären Photorezeptoren der Wirbellosen depolarisieren nach Belichtung. Bei *Drosophila* wird die lichtinduzierte Depolarisierung von TRP- und TRPL-Kanälen getragen. Wie die TRP- und TRPL-Kanäle geöffnet werden, ist immer noch unklar. Bisher wurden Änderungen der Membranspannung, $[Ca^{2+}]_i$, IP_3 und zyklische Nukleotide experimentell ausgeschlossen (Übersicht: SCOTT & ZUKER, 1997; HARDIE & RAGHU, 2001). Auch wenn das DmCNGA-Protein in der Retina exprimiert wird, so gibt es keine Hinweise, dass CNG-Kanäle direkt an der Phototransduktion von *Drosophila* beteiligt sind.

Es ist jedoch denkbar, dass CNG-Kanäle die Neurotransmitterfreisetzung aus den Photorezeptoren auf nachgeschaltete Zellen modulieren. In Sehzapfenzellen des Salamanders sind CNG-Kanäle beschrieben, die die Ausschüttung der Botenstoffe beeinflussen (RIEKE & SCHWARTZ, 1994). Die Neurotransmitterfreisetzung ist an eine Erhöhung der $[Ca^{2+}]_i$ gekoppelt, die entweder durch spannungsaktivierte Ca^{2+} -Kanäle und/oder Ca^{2+} -permeable CNG-Kanäle erreicht wird (RIEKE & SCHWARTZ, 1994). Die *Drosophila* DmCNGA-Kanaluntereinheiten bilden im heterologen Expressionssystem nicht-selektive Kationenkanäle aus, die besonders gut für Ca^{2+} -Ionen permeabel sind (BAUMANN et al., 1994). Eine Aktivierung dieser Kanäle in den Synapsen der Photorezeptorzellen könnte einen Ca^{2+} -Einstrom bewirken und die Neurotransmitterfreisetzung modulieren.

4.4 Modell eines cGMP-gesteuerten Signalweges in sensorischen Geweben von *Drosophila*

Die CNG-Kanäle der Sehzellen aus Wirbeltieren werden spezifisch durch cGMP aktiviert (Übersicht: KAUPP & SEIFERT, 2002). Auch der homooligomere *Drosophila* DmCNGA-Kanal wird durch die Bindung von cGMP geöffnet (BAUMANN et al., 1994). Der intrazelluläre Botenstoff cGMP wird von membranständigen oder löslichen Guanylatzyklasen (GC) aus GTP gebildet. Ein Gen, das für eine membranständige GC kodiert, wird im Thorax und im Gehirn adulter *Drosophila* exprimiert (LIU et al., 1995). Eine lösliche Guanylatzyklase wird in der Retina von *Drosophila* exprimiert (YOSHIKAWA et al., 1993; SHAH & HYDE, 1995). Lösliche Guanylatzyklasen werden durch den kurzlebigen Botenstoff Stickoxid (NO) aktiviert, der von Stickoxid-Synthasen (NOS) synthetisiert wird.

Die NOS wurde mit Diaphorase-Färbungen im *Drosophila* Gehirn nachgewiesen (MÜLLER, 1993; Übersicht: MÜLLER, 1997). Neben den antennalen Loben wurde auch das laterale Protocerebrum gefärbt. Diese Färbemuster habe ich bestätigt (⇒ 3.4.1.2). In dieser Arbeit konnte ich zusätzlich sowohl mit Diaphorase-Färbungen als auch mit immunhistochemischen Färbungen zeigen, dass die NOS auch in der Retina von *Drosophila* exprimiert wird (⇒ 3.4.1.2; 3.4.2.2).

Die sich überlappenden Expressionsmuster einer löslichen Guanylatzyklase (YOSHIKAWA et al., 1993; SHAH & HYDE, 1995), der Stickoxid-Synthase (diese Arbeit) und des DmCNGA-Proteins (diese Arbeit) in der Retina der Fliege sind erste Hinweise für einen cGMP-abhängigen Signalweg im *Drosophila* Auge. Der sowohl inter- als auch intrazellulär wirkende Botenstoff Stickoxid (NO) kann lösliche Guanylatzyklasen aktivieren; cGMP wird verstärkt synthetisiert. Das cGMP kann cGMP-abhängige Phosphodiesterasen und Proteinkinasen aktivieren, aber auch zyklisch Nukleotid-gesteuerte Ionenkanäle öffnen (Übersicht: FRANCIS & CORBIN, 1996). In welchen Zellen der *Drosophila* Retina eine Signalkette mit der NOS, der löslichen GC und dem DmCNGA-Kanal vorhanden ist, muss durch weitere immunhistochemische Färbungen untersucht werden.

Es wurde postuliert, dass CNG-Kanäle bei Wirbeltieren an der Plastizität der synaptischen Signalübertragung beteiligt sind (ZUFALL et al., 1997). Schon länger ist bekannt, dass Ca^{2+} , das durch Glutamatrezeptoren in die Postsynapse einströmt, die Stickoxid-Synthase aktiviert (Übersicht: BRENNAN & BRETT, 1997). In der Postsynapse wird daraufhin NO synthetisiert. Das NO kann in die Präsynapse diffundieren und dort als „retrograder Botenstoff“ wirken (Übersicht: VINCENT, 1995). Für die Heuschrecke *Schistocerca gregaria* wird ein derartiger Signalweg zwischen Zellen des Komplexauges und den ersten postsynaptischen Interneuronen (Monopolarzellen) angenommen (BICKER, 1998). Auch für die synaptische Verschaltung von Sehzapfen- und Horizontalzellen wird eine NO-vermittelte Rückkopplung, die zur Öffnung von präsynaptischen CNG-Kanälen führt, postuliert (SAVCHENKO et al., 1997). Unter Berücksichtigung der Ergebnisse, dass in der *Drosophila* Retina das DmCNGA-Protein, die NOS und die lösliche GC exprimiert werden, ist ein solcher Mechanismus auch für *Drosophila* denkbar.

4.5 Ausblick

Die Datenbankrecherche ermöglichte *Drosophila* Gensequenzen zu identifizieren, die für zyklisch Nukleotid-gesteuerte Ionenkanäle kodieren. Drei Gene sind bisher vollständig kloniert worden (Dm*cnga*, BAUMANN et al., 1994; Dm*cngb*, diese Arbeit; Dm*cng3*, MIYAZU et al., 2000). Vom Dm*cng4*-Gen habe ich nur die C-terminalen Abschnitte durch PCR amplifizieren können. Bisher ist nur das Dm*cnga*-Gen funktionell exprimiert worden (BAUMANN et al., 1994). Mehrere Ergebnisse deuten darauf hin, dass das Dm*cngb*-Gen für eine β -Untereinheit eines CNG-Kanals kodiert:

1. In Dm*cngb* transfizierten Zellen konnten keine zyklisch Nukleotid-aktivierbaren Ströme gemessen werden (\Rightarrow 3.2.4.1)
2. Die abgeleitete Aminosäuresequenz ist den β -Untereinheiten der Wirbeltier CNG-Kanäle am ähnlichsten (\Rightarrow 3.1.2; 4.2) Dies wird beim Vergleich des S4-Motivs (\Rightarrow Abb. 37), der Pore (\Rightarrow Abb. 38) und der cNMP-Bindestelle (\Rightarrow Abb. 39) deutlich.

Sobald die heterologe Expression aller *Drosophila* CNG-Kanaluntereinheiten sichergestellt ist, sollte durch Koexpression verschiedener Untereinheiten-Kombinationen herausgearbeitet werden, ob *Dmcngb* tatsächlich für eine β -Untereinheit eines CNG-Kanals kodiert.

Zur weiteren Aufklärung der physiologischen Bedeutung der CNG-Kanäle bei *Drosophila* ist sowohl die Kenntnis der zellulären als auch der entwicklungspezifischen Expression aller CNG-Kanaluntereinheiten wichtig. Nach der zellulären Lokalisation der Kanalproteine sollte geprüft werden, welche Botenstoffe (NO/cGMP oder cAMP) in diesen Zellen synthetisiert werden und wie die Botenstoffsynthese reguliert wird.

5 Literaturverzeichnis

- ADAMS, M. D., CELNIKER, S. E., HOLT, R. A., EVANS, C. A., GOCAYNE, J. D. et al. (2000): The genome sequence of *Drosophila melanogaster*. *Science* **287**: 2185-2195
- AGGARWAL, S. K. & MACKINNON, R. (1996): Contribution of the S4 segment to gating charge in the *Shaker* K⁺ channel. *Neuron* **16**: 1169-1177
- ALTSCHUL, S. F., GISH, W., MILLER, W., MYERS, E. W. & LIPMAN, D. J. (1990): Basic Local Alignment Search Tool. *J. Mol. Biol.* **215**: 403-410
- ARMSTRONG, C. M. & HILLE, B. (1998): Voltage-gated ion channels and electrical excitability. *Neuron* **20**: 371-380
- ATKINSON, J. & PANNI, M. K. (1999): Optic target regulation of NADPH-diaphorase by larval retinal axons in *Drosophila*. *Neurosci. Lett.* **262**: 21-24
- BÄHNER, M., SANDER, P., PAULSEN, R. & HUBER, A. (2000): The visual G protein of fly photoreceptors interacts with the PDZ domain assembled INAD signaling complex via direct binding of activated G α_q to phospholipase C β . *J. Biol. Chem.* **275**: 2901-2904
- BAKALYAR, H. A. & REED, R. R. (1990): Identification of a specialized adenylyl cyclase that may mediate odorant detection. *Science* **250**: 1403-1406
- BARGMANN, C. I. (1998): Neurobiology of the *Caenorhabditis elegans* genome. *Science* **282**: 2028-2033
- BARNARD, E. A. (1996): The transmitter-gated channels: a range of receptor types and structures. *Trends Pharmacol. Sci.* **17**: 305-309
- BATE, M. & ARIAS, A. M. (Hrsg.) (1993): The Development of *Drosophila melanogaster*. Volume II. Cold Spring Harbor Laboratory Press. New York, USA.
- BAUMANN, A., FRINGS, S., GODDE, M., SEIFERT, R. & KAUPP, U. B. (1994): Primary structure and functional expression of a *Drosophila* cyclic nucleotide-gated channel present in eyes and antennae. *EMBO Journal* **13**: 5040-5050
- BENTON, W. D. & DAVIS, R. W. (1977): Screening of λ gt recombinant clones by hybridization to single plaques *in situ*. *Science* **196**: 180-182
- BICKER, G. (1998): NO news from insect brain. *Trends Neurosci.* **21**: 349-355

- BIRNBOIM, H. C. & DOLY, J. (1979): A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res.* **7**: 1513-1523
- BÖNIGK, W., ALTENHOFEN, W., MÜLLER, F., DOSÉ, A., ILLING, M., MOLDAJ, R. S. & KAUPP, U. B. (1993): Rod and cone photoreceptor cells express distinct genes for cGMP-gated channels. *Neuron* **10**: 865-877
- BÖNIGK, W., BRADLEY, J., MÜLLER, F., SESTI, F., BOEKHOFF, I., RONNETT, G. V., KAUPP, U. B. & FRINGS, S. (1999): The native rat olfactory cyclic nucleotide-gated channel is composed of three distinct subunits. *J. Neurosci.* **19**: 5332-5347
- BONIFACINO, J. S., DELL'ANGELICA, E. C. & SPRINGER, T. A. (1999): Immunoprecipitation. In: *Current Protocols in Protein Science* (Coligan, J. E., Dunn, B. M., Ploegh, H. L. et al. (Hrsg.)). John Wiley & Sons. pp. 9.8.1-9.8.28
- BRADFORD, M. M. (1976): A rapid sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**: 248-254
- BRADLEY, J., LI, J., DAVIDSON, N., LESTER, H. A. & ZINN, K. (1994): Heteromeric olfactory cyclic nucleotide-gated channels: A subunit that confers increased sensitivity to cAMP. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**: 8890-8894
- BREDT, D. S. & SNYDER, S. H. (1994): Nitric oxide: a physiologic messenger molecule. *Ann. Rev. Biochem.* **63**: 175-195
- BREER, H., WANNER, I. & STROTMANN, J. (1996): Molecular genetics of mammalian olfaction. *Behav. Genet.* **26**: 209-219
- BRENMAN, J. E. & BREDT, D. S. (1997): Synaptic signaling by nitric oxide. *Curr. Opinion Neurobiol.* **7**: 374-378
- BUCK, L. & AXEL, R. (1991): A novel multigene family may encode odorant receptors: A molecular basis for odor recognition. *Cell* **65**: 175-187
- 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**: 376-379
- BURNS, M. E. & BAYLOR, D. E. (2001): Activation, deactivation, and adaptation in vertebrate photoreceptor cells. *Annu. Rev. Neurosci.* **24**: 779-805
- CARLSON, J. R. (1996): Olfaction in *Drosophila*: from odor to behavior. *Trends Genetic* **12**: 175-180
- CATTERALL, W. A. (2000): From ionic currents to molecular mechanisms: The structure and function of voltage-gated sodium channels. *Neuron* **26**: 13-25

- CHEN, C. & OKAYAMA, H. (1987): High-efficiency transformation of mammalian cells by plasmid DNA. *Molecular and Cellular Biology* **7**: 2745-2752
- CHEN, F. H., UKHANOVA, M., THOMAS, D., AFSHAR, G., TANDA, S., BATTELLE, B.-A. & PAYNE, R. (1999): Molecular cloning of a putative cyclic nucleotide-gated ion channel cDNA from *Limulus polyphemus*. *J. Neurochem.* **72**: 461-471
- CHEN, F. H., BAUMANN, A., PAYNE, R. & LISMAN, J. E. (2001): A cGMP-gated channel subunit in *Limulus* photoreceptors. *Visual Neuroscience* **18**: 517-526
- CHEN, T.-Y. & YAU, K.-W. (1994): Direct modulation by Ca^{2+} -calmodulin of cyclic nucleotide-activated channel of rat olfactory receptor neurons. *Nature* **368**: 545-548
- CHEN, T.-Y., PENG, Y.-W., DHALLAN, R. S., AHAMED, B., REED, R. R. & YAU, K.-W. (1993): A new subunit of the cyclic nucleotide-gated cation channel in retinal rods. *Nature* **362**: 764-767
- CHEN, T.-Y., ILLING, M., MOLDAI, L. L., HSU, Y.-T., YAU, K.-W. & MOLDAI, R. S. (1994): Subunit 2 (or β) of retinal rod cGMP-gated cation channel is a component of the 240-kDa channel-associated protein and mediates Ca^{2+} -calmodulin modulation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**: 11757-11761
- CLAPHAM, D. E., RUNNELS, L. W. & STRÜBING, C. (2001): The TRP ion channel family. *Nature Rev. Neurosci.* **2**: 387-396
- CLYNE, P. J., CERTEL, S. J., DE BRUYNE, M., ZASLAVSKY, L., JOHNSON, W. A. & CARLSON, J. R. (1999): The odor specificities of a subset of olfactory receptor neurons are governed by Acj6, a POU-domain transcription factor. *Neuron* **22**: 339-347
- CLYNE, P. J., WARR, C. G. & CARLSON, J. R. (2000): Candidate taste receptors in *Drosophila*. *Science* **287**: 1830-1834
- COBURN, C. M. & BARGMANN, C. I. (1996): A putative cyclic nucleotide-gated channel is required for sensory development and function in *C. elegans*. *Neuron* **17**: 695-706
- COBURN, C. M., MORI, I., OHSHIMA, Y. & BARGMANN, C. I. (1998): A cyclic nucleotide-gated channel inhibits sensory axon outgrowth in larval and adult *Caenorhabditis elegans*: a distinct pathway for maintenance of sensory axon structure. *Development* **125**: 249-258
- COLVILLE, C. A. & MOLDAI, R. S. (1996): Primary structure and expression of the human β -subunit and related proteins of the rod photoreceptor cGMP-gated channel. *J. Biol. Chem.* **271**: 32968-32974

- COOK, N. J., MOLDAJ, L. L., REID, D., KAUPP, U. B. & MOLDAJ, R. S. (1989): The cGMP-gated channel of bovine rod photoreceptors is localized exclusively in the plasma membrane. *J. Biol. Chem.* **264**: 6996-6999
- CROWE, J., DÖBELI, H., GENTZ, R., HOCHULI, E., STÜBER, D. & HENCO, K. (1994): 6xHis-Ni-NTA chromatography as a superior technique in recombinant protein expression/purification. *Methods in Molecular Biology* **31**: 371-387
- DAWSON, T. M., BREDT, D. S., FOTUHI, M., HWANG, P. M. & SNYDER, S. H. (1991): Nitric oxide synthase and neuronal NADPH diaphorase are identical in brain and peripheral tissues. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**: 7797-7801
- DAYHOFF, M. O., SCHWARTZ, R. M. & ORCUTT, B. C. (Hrsg.: DAYHOOF, M. O.) (1978): In *Atlas of protein sequence and structure*. National Biomedical Research Foundation. Silver Spring. USA. Volume **5 (Suppl. 3)**: 345-352
- DETTNER, K. & PETERS, W. (Hrsg.) (1999): Lehrbuch der Entomologie. Gustav Fischer Verlag, Jena.
- DHALLAN, R. S., YAU, K.-W., SCHRADER, K. A. & REED, R. R. (1990): Primary structure and functional expression of a cyclic nucleotide-activated channel from olfactory neurons. *Nature* **347**: 184-187
- DOYLE, D. A., MORAIS CABRAL, J., PFUETZNER, R. A., KUO, A., GULBIS, J. M., COHEN, S. L., CHAIT, B. T. & MACKINNON, R. (1998): The structure of the potassium channel: molecular basis of K⁺ conduction and selectivity. *Science* **280**: 69-77
- DUTZLER, R., CAMPBELL, E. B., CADENE, M., CHAIT, B. T. & MACKINNON, R. (2002): X-ray structure of a CIC chloride channel at 3.0 Å reveals the molecular basis of anion selectivity. *Nature* **415**: 287-294
- EISMANN, E., BÖNIGK, W. & KAUPP, U. B. (1993): Structural features of cyclic nucleotide-gated channels. *Cell. Physiol. Biochem.* **3**: 332-351
- DZEJA, C., HAGEN, V., KAUPP, U. B. & FRINGS, S. (1999): Ca²⁺ permeation in cyclic nucleotide-gated channels. *EMBO Journal* **18**: 131-144
- EISMANN, E., MÜLLER, F., HEINEMANN, S. H. & KAUPP, U. B. (1994): A single negative charge within the pore region of a cGMP-gated channel controls rectification, Ca²⁺ blockage, and ionic selectivity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**: 1109-1113
- ENIKOLOPOV, G., BANERJI, J. & KUZIN, B. (1999): Nitric oxide and *Drosophila* development. *Cell Death and Differentiation* **6**: 956-963
- FEINBERG, A. P. & VOGELSTEIN, B. (1983): A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. *Analyt. Biochem.* **132**: 6-13

- FENG, D.-F. & DOOLITTLE, R. F. (1987): Progressive sequence alignment as a prerequisite to correct phylogenetic trees. *J. Mol. Evol.* **25**: 351-360
- FESENKO, E. E., KOLESNIKOV, S. S. & LYUBARSKY, A. L. (1985): Induction by cyclic GMP of cationic conductance in plasma membrane of retinal rod outer segment. *Nature* **313**: 310-313
- FINN, J. T., GRUNWALD, M. E. & YAU, K.-W. (1996): Cyclic nucleotide-gated ion channels: An extended family with diverse functions. *Annu. Rev. Physiol.* **58**: 395-426
- FIRESTEIN, S. (2001): How the olfactory system makes sense of scents. *Nature* **413**: 211-218
- FISCHBACH, K.-F. & DITTRICH, A. P. M. (1989): The optic lobe of *Drosophila melanogaster*. I. A Golgi analysis of wild-type structure. *Cell Tissue Res.* **258**: 441-475
- FOSTER, D. C., WEDEL, B. J., ROBINSON, S. W. & GARBERS, D. L. (1999): Mechanisms of regulation and functions of guanylyl cyclases. *Reviews of physiology, biochemistry and pharmacology* **135**: 1-39
- FRANCIS, S. H. & CORBIN, J. D. (1996): Cyclic AMP and cyclic GMP in cell signaling. In: Signal Transduction (Hrsg.: Heldin, C.-H. & Purton, M.). Chapman & Hall: 223-240
- FREITAG, J., LUDWIG, G., ANDREINI, I., RÖSSLER, P. & BREER, H. (1998): Olfactory receptors in aquatic and terrestrial vertebrates. *J. Comp. Physiol.* **183**: 635-650
- GALINDO, K. & SMITH, D. P. (2001): A large family of divergent *Drosophila* odorant-binding proteins expressed in gustatory and olfactory sensilla. *Genetics* **159**: 1059-1072
- GAO, Q. & CHESS, A. (1999): Identification of candidate *Drosophila* olfactory receptors from genomic DNA sequence. *Genomics* **60**: 31-39
- GARTHWAITE, J. & BOULTON, C. L. (1995): Nitric oxide signaling in the central nervous system. *Annu. Rev. Physiol.* **57**: 683-706
- GAUSS, R. (1998): Molekulare Identifizierung eines hyperpolarisationsaktivierten (I_h) Ionenkanals in Seeigelspermien. Berichte des Forschungszentrums Jülich; 3547. ISSN 0944-2952 (Dissertation Universität Köln)
- GAVAZZO, P., PICCO, C., EISMANN, E., KAUPP, U. B. & MENINI, A. (2000): A point mutation in the pore region alters gating, Ca^{2+} blockage, and permeation of olfactory cyclic nucleotide-gated channels. *J. Gen. Physiol.* **116**: 311-326

- GERSTNER, A., ZONG, X., HOFMANN, F. & BIEL, M. (2000): Molecular cloning and functional characterization of a new modulatory cyclic nucleotide-gated channel subunit from mouse retina. *J. Neurosci.* **20**: 1324-1332
- GIBBS, S. M. & TRUMAN, J. W. (1998): Nitric oxide and cyclic GMP regulate retinal patterning in the optic lobe of *Drosophila*. *Neuron* **20**: 83-93
- GIBBS, S. M., BECKER, A., HARDY, R. W. & TRUMAN, J. W. (2001): Soluble guanylate cyclase is required during development for visual system function in *Drosophila*. *J. Neurosci.* **21**: 7705-7714
- GIGLIOTTI, S., CAVALIERE, V., MANZI, A., TINO, A., GRAZIANI, F. & MALVA, C. (1993): A membrane guanylate cyclase *Drosophila* homolog gene exhibits maternal and zygotic expression. *Dev. Biol.* **159**: 450-461
- GOULDING, E. H., TIBBS, G. R., LIU, D. & SIEGELBAUM, S. A. (1993): Role of H5 domain in determining pore diameter and ion permeation through cyclic nucleotide-gated channels. *Nature* **364**: 61-64
- GRAY-KELLER, M. P. & DETWILER, P. B. (1994): The calcium feedback signal in the phototransduction cascade of vertebrate rods. *Neuron* **13**: 849-861
- GRIFFITH, O. W. & STUEHR, D. J. (1995): Nitric oxide synthases: properties and catalytic mechanism. *Annu. Rev. Physiol.* **57**: 707-736
- GRUNWALD, M. E., YU, W.-P., YU, H.-H. & YAU, K.-W. (1998): Identification of a domain on the β -subunit of the rod cGMP-gated cation channel that mediates inhibition by calcium-calmodulin. *J. Biol. Chem.* **273**: 9148-9157
- GUPTA, S. K., KECECIOGLU, J. D. & SCHAFFER, A. A. (1995): Improving the practical space and time efficiency of the shortest-paths approach to sum-of-pairs multiple sequence alignment. *J. Comput. Biol.* **2**: 459-472
- HALLANI, M., LYNCH, J. W. & BARRY, P. H. (1998): Characterization of calcium-activated chloride channels in patches excised from the dendritic knob of mammalian olfactory receptor neurons. *J. Membr. Biol.* **161**: 163-171
- HAMILL, O. P., MARTY, A., NEHER, E., SAKMANN, B., & SIGWORTH, F. J. (1981): Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches. *Pflügers Arch.* **391**: 85-100
- HARDIE, R. C. (2001): Phototransduction in *Drosophila melanogaster*. *J. Experimental Biol.* **204**: 3403-3409
- HARDIE, R.C. & MINKE, B. (1993): Novel Ca^{2+} channels underlying transduction in *Drosophila* photoreceptors: implications for phosphoinositide-mediated Ca^{2+} mobilization. *Trends Neurosci.* **16**: 371-376

- HARDIE, R. C. & RAGHU, P. (2001): Visual transduction in *Drosophila*. *Nature* **413**: 186-193
- HARTENECK, C., PLANT, T. D. & SCHULTZ, G. (2000): From worm to man: three subfamilies of TRP channels. *Trends Neurosci.* **23**: 159-166
- HAYNES, L. W. & YAU, K.-W. (1985): Cyclic GMP-sensitive conductance in outer segment membrane of catfish cones. *Nature* **317**: 61-64
- HE, Y., RUIZ, M.L. & KARPEN, J. W. (2000): Constraining the subunit order of rod cyclic nucleotide-gated channels reveals a diagonal arrangement of like subunits. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97**: 895-900
- HEERY, D. M., GANNON, F. & POWELL, R. (1990): A simple method for subcloning DNA fragments from gel slices. *Trends Gen.* **6**: 173
- HEGINBOTHAM, L., ABRAMSON, T. & MACKINNON, R. (1992): A functional connection between the pores of distantly related ion channels as revealed by mutant K⁺ channels. *Science* **258**: 1152-1155
- HENN, D. K., BAUMANN, A. & KAUPP, U. B. (1995): Probing the transmembrane topology of cyclic nucleotide-gated ion channels with a gene fusion approach. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**: 7425-7429
- HILLE, B. (2001): Ionic Channels in Excitable Membranes. 3rd ed. Sinauer Associates, Sunderland, Mass., USA.
- HODGKIN, A. L., MCNAUGHTON, P. A. & NUNN, B. J. (1987): Measurement of sodium-calcium exchange in salamander rods. *J. Physiol.* **391**: 347-370
- HOPE, B. T., MICHAEL, G. J., KNIGGE, K. M. & VINCENT, S. R. (1991): Neuronal NADPH diaphorase is a nitric oxide synthase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**: 2811-2814
- HSU, S., RAINE, L. & FANGER, H. (1981): The use of avidin-biotin-peroxidase complex (ABC) in immunoperoxidase technique - A comparison between ABC and unlabeled antibody (PAP) procedures. *J. Histochem. Cytochem.* **29**: 577-580
- HSU, Y.-T. & MOLDAY, R. S. (1994): Interaction of calmodulin with the cyclic GMP-gated channel of rod photoreceptor cells. Modulation of activity, affinity purification, and localization. *J. Biol. Chem.* **269**: 29765-29770
- HU, Y. & SCHILLING, W. P. (1995): Receptor-mediated activation of recombinant Trp1 expressed in Sf9 insect cells. *Biochem. J.* **305**: 605-611
- JAN, L. Y. & JAN, Y. N. (1990): A superfamily of ion channels. *Nature* **345**: 672

- JAN, L. Y. & JAN, Y. N. (1992): Structural elements involved in specific K⁺-channel functions. *Annu. Rev. Physiol.* **54**: 537-555
- JAN, L. Y. & JAN, Y. N. (1997): Cloned potassium channels from eukaryotes and prokaryotes. *Annu. Rev. Neurosci.* **20**: 91-123
- KATSUKI, S., ARNOLD, W., MITTAL, C. & MURAD, F. (1977): Stimulation of guanylate cyclase by sodium nitroprusside, nitroglycerin and nitric oxide in various tissue preparations and comparison to the effects of sodium azide and hydroxylamine. *J. Cyclic Nucleotide Research* **3**: 23-25
- KAUPP, U. B. (1995): Family of cyclic nucleotide gated ion channels. *Curr. Opinion Neurobiol.* **5**: 434-442
- KAUPP, U. B. & KOCH, K.-W. (1992): Role of cGMP and Ca²⁺ in vertebrate photoreceptor excitation and adaptation. *Annu. Rev. Physiol.* **54**: 153-175
- KAUPP, U. B. & SEIFERT, R. (2001): Molecular Diversity of Pacemaker Ion Channels. *Annu. Rev. Physiol.* **63**: 235-257
- KAUPP, U. B. & SEIFERT, R. (2002): Cyclic nucleotide-gated ion channels. *Physiol. Rev.* **82**: 769-824
- KAUPP, U. B., NIIDOME, T., TANABE, T., TERADA, S., BÖNIGK, W., STÜHMER, W., COOK, N. J., KANGAWA, K., MATSUO, H., HIROSE, T., MIYATA, T. & NUMA, S. (1989): Primary structure and functional expression from complementary DNA of the rod photoreceptor cyclic GMP-gated channel. *Nature* **342**: 762-766
- KELLERMANN, O. K. & FERENCI, T. (1982): Maltose-binding protein from *Escherichia coli*. *Methods in Enzymology* **90**: 459-463
- KENT, U. M. (1994): Purification of antibodies using affinity chromatography. *Methods in Molecular Biology* **34**: 29-35
- KLEENE, S. J. (1993): Origin of the chloride current in olfactory transduction. *Neuron* **11**: 123-132
- KLEENE, S. J. (1997): High gain, low-noise amplification in olfactory transduction. *Biophys. J.* **73**: 1110-1117
- KLEENE, S. J. & GESTELAND, R. C. (1991): Calcium-activated chloride conductance in frog olfactory cilia. *J. Neurosci.* **11**: 3624-3629
- KOCH, K.-W. & KAUPP, U. B. (1985): Cyclic GMP directly regulates a cation conductance in membranes of bovine rods by a cooperative mechanism. *J. Biol. Chem.* **260**: 6788-6800

- KÖRSCHEN, H. G., ILLING, M., SEIFERT, R., SESTI, F., WILLIAMS, A., GOTZES, S., COLVILLE, C., MÜLLER, F., DOSÉ, A., GODDE, M., MOLDAJ, L., KAUPP, U. B. & MOLDAJ, R. S. (1995): A 240 kDa protein represents the complete β subunit of the cyclic nucleotide-gated channel from rod photoreceptor. *Neuron* **15**: 627-636.
- KÖRSCHEN, H. G., BEYERMANN, M., MÜLLER, F., HECK, M., VANTLER, M., KOCH, K.-W., KELLNER, R., WOLFRUM, U., BODE, C., HOFMANN, K. P. & KAUPP, U. B. (1999): Interaction of glutamic-acid-rich-proteins with the cGMP signalling pathway in rod photoreceptors. *Nature* **400**: 761-766
- KOESLING, D. (1999): Studying the structure and regulation of soluble guanylyl cyclase. *Methods* **19**: 485-493
- KOMATSU, H., MORI, I., RHEE, J.-S., AKAIKE, N. & OHSHIMA, Y. (1996): Mutations in a cyclic nucleotide-gated channel lead to abnormal thermosensation and chemosensation in *C. elegans*. *Neuron* **17**: 707-718
- KOMATSU, H., JIN, Y.-H., L'ETOILE, N., MORI, I., BARGMANN, C. I., AKAIKE, N. & OHSHIMA, Y. (1999): Functional reconstitution of a heteromeric cyclic nucleotide-gated channel of *Caenorhabditis elegans* in cultured cells. *Brain Research* **821**: 160-168
- KOZAK, M. (1984): Compilation and analysis of sequences upstream from the translational start site in eukaryotic mRNAs. *Nucleic Acids Res.* **12**: 857-872
- KUNES, S. & STELLER, H. (1993): Topography in the *Drosophila* visual system. *Curr. Opinion Neurobiol.* **3**: 53-59
- KUZIN, B., ROBERTS, I., PEUNOVA, N. & ENIKOLOPOV, G. (1996): Nitric oxide regulates cell proliferation during *Drosophila* development. *Cell* **87**: 639-649
- LAEMMLI, U. K. (1970): Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680-685
- LARSSON, H. P., BAKER, O. S., DHILLON, D. S. & ISACOFF, E. Y. (1996): Transmembrane movement of the *Shaker* K⁺ channel S4. *Neuron* **16**: 387-397
- LIMAN, E. R. & BUCK, L. B. (1994): A second subunit of the olfactory cyclic nucleotide-gated channel confers high sensitivity to cAMP. *Neuron* **13**: 611-621
- LITTLETON, J. T. & GANETZKY, B. (2000): Ion channels and synaptic organization: Analysis of the *Drosophila* genome. *Neuron* **26**: 35-43
- LIU, M., CHEN, T.-Y., AHAMED, B., LI, J. & YAU, K.-W. (1994): Calcium-calmodulin modulation of the olfactory cyclic nucleotide-gated cation channel. *Science* **266**: 1348-1354

-
- LIU, W., YOON, J., BURG, M., CHEN, L. & PAK, W. L. (1995): Molecular characterization of two *Drosophila* guanylate cyclases expressed in the nervous system. *J. Biol. Chem.* **270**: 12418-12427
- LOWE, G., NAKAMURA, T. & GOLD, G. H. (1989): Adenylate cyclase mediates olfactory transduction for a wide variety of odorants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **86**: 5641-5645
- LUDWIG, J., MARGALIT, T., EISMANN, E., LANCET, D. & KAUPP, U. B. (1990): Primary structure of cAMP-gated channel from bovine olfactory epithelium. *FEBS Lett.* **270**: 24-29
- LYNCH, J. W. & LINDEMANN, B. (1994): Cyclic nucleotide-gated channels of rat olfactory receptor cells: divalent cations control the sensitivity to cAMP. *J. Gen. Physiol.* **103**: 87-106
- MCKAY, D. B. & STEITZ, T. A. (1981): Structure of catabolite gene activator protein at 2,9 Å resolution suggests binding of left-handed B-DNA. *Nature* **290**: 744-749
- MCNEIL, L., CHINKERS, M. & FORTE, M. (1995): Identification, characterization, and developmental regulation of a receptor guanylyl cyclase expressed during early stages of *Drosophila* development. *J. Biol. Chem.* **270**: 7189-7196
- MEYER, M. R., ANGELE, A., KREMMER, E., KAUPP, U. B. & MÜLLER, F. (2000): A cGMP-signaling pathway in a subset of olfactory sensory neurons. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97**: 10595-10600
- MEYER, T. S. & LAMBERTS, B. L. (1965): Use of coomassie brilliant blue R250 for the electrophoresis of microgram quantities of parotid saliva proteins on acrylamide-gel strips. *Biochim. Biophys. Acta* **107**: 144-145
- MIYAZU M., TANIMURA, T. & SOKABE, M. (2000): Molecular cloning and characterization of a putative cyclic nucleotide-gated channel from *Drosophila melanogaster*. *Insect Mol. Biol.* **9**: 283-292
- MOLDAY, R. S. (1996): Calmodulin regulation of cyclic-nucleotide-gated channels. *Curr. Opin. Neurobiol.* **6**: 445-452.
- MOLDAY, R. S., MOLDAY, L. L., DOSÉ, A., CLARK-LEWIS, I., ILLING, M., COOK, N. J., EISMANN, E. & KAUPP, U. B. (1991): The cGMP-gated channel of the rod photoreceptor cell. Characterization and orientation of the amino terminus. *J. Biol. Chem.* **266**: 21917-21922
- MONTELL, C. (1999): Visual transduction in *Drosophila*. *Annu. Rev. Cell. Dev. Biol.* **15**: 231-268
- MORAIS-CABRAL, J. H., ZHOU, Y. & MACKINNON, R. (2001): Energetic optimization of ion conduction rate by the K⁺ selectivity filter. *Nature* **414**: 37-42

- MÜLLER, F. & KAUPP, U. B. (1998): Signaltransduktion in Sehzellen. *Naturwissenschaften* **85**: 49-61
- MÜLLER, U. (1993): Histochemical localization of NADPH-diaphorase in the adult *Drosophila* brain. *Naturwissenschaften* **80**: 524-526
- MÜLLER, U. (1994): Ca^{2+} /Calmodulin-dependent Nitric Oxide Synthase in *Apis mellifera* and *Drosophila melanogaster*. *Europ. J. Neurosci.* **6**: 1362-1370
- MÜLLER, U. (1997): The nitric oxide system in insects. *Progress in Neurobiol.* **51**: 363-381
- MULLIS, K., FALOONA, F., SCHARF, S., SAIKI, R., HORN, G. & ERLICH, H. (1986): Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: The polymerase chain reaction. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*. Vol. **LI**: 263-273
- NAKAMURA, T. & GOLD, G. H. (1987): A cyclic nucleotide-gated conductance in olfactory receptor cilia. *Nature* **325**: 442-444
- NAKATANI, K. & YAU, K.-W. (1988): Calcium and magnesium fluxes across the plasma membrane of the toad rod outer segment. *J. Physiol.* **395**: 695-729
- NIEMEYER, B. A., SUZUKI, E., SCOTT, K., JALINK, K. & ZUKER, C. S. (1996): The *Drosophila* light-activated conductance is composed of the two channels TRP and TRPL. *Cell* **85**: 651-659
- PALCZEWSKI, K. & SAARI, J. C. (1997): Activation and inactivation steps in the visual transduction pathway. *Curr. Opin Neurobiol.* **7**: 500-504
- PERETZ, A., SANDLER, C., KIRSCHFELD, K., HARDIE, R. C. & MINKE, B. (1994): Genetic dissection of light-induced Ca^{2+} influx into *Drosophila* photoreceptors. *J. Gen. Physiol.* **104**: 1057-1077
- POETSCH, A., MOLDAJ, L. L. & MOLDAJ, R. S. (2001): The cGMP-gated channel and related glutamic acid-rich proteins interact with Peripherin-2 at the rim region of rod photoreceptor disc membranes. *J. Biol. Chem.* **276**: 48009-48016
- PONGS, O. (1992): Structural basis of voltage-gated K^+ channel pharmacology. *Trends Pharmacol. Sci.* **13**: 359-365
- PONGS, O., KECSKEMETHY, N., MÜLLER, R., KRAH-JENTGENS, I., BAUMANN, A., KILTZ, H. H., CANAL, I., LLAMAZARES, S. & FERRUS, A. (1988): *Shaker* encodes a family of putative potassium channel proteins in the nervous system of *Drosophila*. *EMBO Journal* **7**: 1087-1096
- PUGH, E. N., DUDA, T., SITARAMAYYA, A. & SHARMA, R. K. (1997): Photoreceptor guanylate cyclases: A review. *Bioscience Reports* **17**: 429-473

-
- RANGANATHAN, R., MALICKI, D. M. & ZUKER, C. S. (1995): Signal transduction in *Drosophila* photoreceptors. *Annu. Rev. Neurosci.* **18**: 283-317
- RATTO, G. M., PAYNE, R., OWEN, W. G. & TSIEN, R. Y. (1988): The concentration of cytosolic free calcium in vertebrate rod outer segments measured with fura-2. *J. Neurosci.* **8**: 3240-3246
- REGULSKI, M. & TULLY, T. (1995): Molecular and biochemical characterization of dNOS: A *Drosophila* Ca²⁺/Calmodulin-dependent nitric oxide synthase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**: 9072-9076
- REUSS, H., MOJET, M. H., CHYB, S. & HARDIE, R. C. (1997): *In vivo* analysis of the *Drosophila* light-sensitive channels, TRP and TRPL. *Neuron* **19**: 1249-1259
- RHO, S.-H. & PARK, C.-S. (1998): Extracellular proton alters the divalent cation binding affinity in a cyclic nucleotide-gated channel pore. *FEBS Lett.* **440**: 199-202
- RHOADS, A. R. & FRIEDBERG, F. (1997): Sequence motifs for calmodulin recognition. *FASEB J.* **11**: 331-340
- RIEKE, F. & SCHWARTZ, E. A. (1994): A cGMP-gated current can control exocytosis at cone synapses. *Neuron* **13**: 863-873
- ROOT, M. J. & MACKINNON, R. (1993): Identification of an external divalent cation-binding site in the pore of a cGMP-activated channel. *Neuron* **11**: 459-466
- SAMBROOK, J., FRITSCH, E. F. & MANIATIS, T. (1989): Molecular Cloning: A Laboratory Manual. Second edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press. Cold Spring Harbor. USA.
- SANGER, F., NICKLEN, 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
- SAUTTER, A., ZONG, X., HOFMANN, F. & BIEL, M. (1998): An isoform of the rod photoreceptor cyclic nucleotide-gated channel β subunit expressed in olfactory neurons. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**: 4696-4701
- SAVCHENKO, A., BARNES, S. & KRAMER, R. H. (1997): Cyclic-nucleotide-gated channels mediate synaptic feedback by nitric oxide. *Nature* **390**: 694-698
- SCHILD, D. & RESTREPO, D. (1998): Transduction mechanisms in vertebrate olfactory receptor cells. *Physiol. Rev.* **78**: 429-466

- SCHULTZ, S. C., SHIELDS, G. C. & STEITZ, T. A. (1991): Crystal structure of a CAP-DNA complex: the DNA is bent by 90 degrees. *Science* **253**: 1001-1007
- SCOTT, K. & ZUKER, C. (1997): Lights out: deactivation of the phototransduction cascade. *Trends Biochem. Sci.* **22**: 350-354
- SCOTT, K., BECKER, A., SUN, Y., HARDY, R. & ZUKER, C. (1995): G_{qα} protein function in vivo: genetic dissection of its role in photoreceptor cell physiology. *Neuron* **15**: 919-927
- SEIFERT, R., EISMANN, E., LUDWIG, J., BAUMANN, A. & KAUPP, U. B. (1999): Molecular determinants of a Ca²⁺-binding site in the pore of cyclic nucleotide-gated channels: S5/S6 segments control affinity of intrapore glutamates. *EMBO Journal* **18**: 119-130
- SEOH, S.-A., SIGG, D., PAPAIZIAN, D. M. & BEZANILLA, F. (1996): Voltage-sensing residues in the S2 and S4 segments of the *Shaker* K⁺ channel. *Neuron* **16**: 1159-1167
- SHABB, J. B., POTEET, C. E., KAPPAHN, M. A., MUHONEN, W. M., BAKER, N. E. & CORBIN, J. D. (1995): Characterization of the isolated cAMP-binding B domain of cAMP-dependent protein kinase. *Protein Sci.* **4**: 2100-2106
- SHAH, S. & HYDE, D. R. (1995): Two *Drosophila* genes that encode the α and β subunit of the brain soluble guanylyl cyclase. *J. Biol. Chem.* **270**: 15368-15376
- SHAMMAT, I. M. & GORDON, S. E. (1999): Stoichiometry and arrangement of subunits in rod cyclic nucleotide-gated channels. *Neuron* **23**: 809-819
- 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. *Nucl. Acids Res.* **16**: 7583-7600
- SIEWING, R. (Hrsg.) (1980): Lehrbuch der Zoologie. Band 1. Gustav Fischer Verlag, Jena.
- SMITH, D. P. (1996): Olfactory mechanisms in *Drosophila melanogaster*. *Curr. Opinion Neurobiol.* **6**: 500-505
- SNYDER, S. H. (1992): Nitric oxide: First in a new class of neurotransmitters ? *Science* **257**: 494-496
- STARACE, D. M. & BEZANILLA, F. (2001): Histidine scanning mutagenesis of basic residues of the S4 segment of the *Shaker* K⁺ channel. *J. Gen. Physiol.* **117**: 469-490

- STASIV, Y., REGULSKI, M., KUZIN, B., TULLY, T. & ENIKOLOPOV, G. (2001): The *Drosophila* nitric-oxide gene (*dNOS*) encodes a family of proteins that can modulate NOS activity by acting as dominant negative regulators. *J. Biol. Chem.* **276**: 42241-42251
- STONE, J. R. & MARLETTA, M. A. (1995): Heme stoichiometry of heterodimeric soluble guanylate cyclase. *Biochemistry* **34**: 14668-14674
- STRYER, L. (1991): Visual excitation and recovery. *J. Biol. Chem.* **266**: 10711-10714
- SUGIMOTO, Y., YATSUNAMI, K., TSUJIMOTO, M., KHORANA, H.G., & ICHIKAWA, A. (1991): The amino acid sequence of a glutamic acid-rich protein from bovine retina as deduced from the cDNA sequence. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**: 3116-3119
- TERLAU, H. & STÜHMER, W. (1998): Structure and function of voltage-gated ion channels. *Naturwissenschaften* **85**: 437-444
- THOMPSON, J. D., HIGGINS, D. G. & GIBSON, T. J. (1994): CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research* **22**: 4673-4680
- TITANI, K., SASAGAWA, T., ERICSSON, L. H., KUMAR, S., SMITH, S. B., KREBS, E. G. & WALSH, K. A. (1984): Amino acid sequence of the regulatory subunit of bovine type I adenosine cyclic 3',5'-phosphate dependent protein kinase. *Biochemistry* **23**: 4193-4199
- TOWBIN, H., STAEGELIN, T. & GORDON, J. (1979): Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: Procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **76**: 4350-4354
- VACA, L., SINKINS, W. G., HU, Y., KUNZE, D. L. & SCHILLING, W. P. (1994): Activation of recombinant *trp* by thapsigargin in Sf9 insect cells. *Am. J. Physiol.* **267**: C1501-C1505
- VINCENT, S. R. (Hrsg.) (1995): Nitric Oxide in the Nervous System. Academic Press Inc. San Diego.
- WARMKE, J., DRYSDALE, R. & GANETZKY, B. (1991): A distinct potassium channel polypeptide encoded by the *Drosophila eag* locus. *Science* **252**: 1560-1562
- WEBER, I. T., STEITZ, T. A., BUBIS, J. & TAYLOR, S. S. (1987): Predicted structures of cAMP binding domains of type I and II regulatory subunits of cAMP-dependent protein kinase. *Biochemistry* **26**: 343-351
- WEBER, I. T., SHABB, J. B. & CORBIN, J. D. (1989): Predicted structures of the cGMP binding domains of the cGMP-dependent protein kinase: A key alanine/threonine difference in evolutionary divergence of cAMP and cGMP binding sites. *Biochemistry* **28**: 6122-6127

- WEI, J.-Y., ROY, D. S., LECONTE, L. & BARNSTABLE, C. J. (1998): Molecular and pharmacological analysis of cyclic nucleotide-gated channel function in the central nervous system. *Progr. Neurobiol.* **56**: 37-64
- WEITZ, D., ZOCHÉ, M., MÜLLER, F., BEYERMANN, M., KÖRSCHEN, H. G., KAUPP, U. B. & KOCH, K.-W. (1998): Calmodulin controls the rod photoreceptor CNG channel through an unconventional binding site in the N-terminus of the β -subunit. *EMBO Journal* **17**: 2273-2284
- WEYAND, I., GODDE, M., FRINGS, S., WEINER, J., MÜLLER, F., ALTENHOFEN, W., HATT, H. & KAUPP, U. B. (1994): Cloning and functional expression of a cyclic-nucleotide-gated channel from mammalian sperm. *Nature* **368**: 859-863
- WILDEMAN, B. & BICKER, G. (1999): Developmental expression of nitric oxide/cyclic GMP synthesizing cells in the nervous system of *Drosophila melanogaster*. *J. Neurobiol.* **38**: 1-15
- XU, X.-Z., CHIEN, F., BUTLER, A., SALKOFF, L. & MONTELL, C. (2000): TRP γ , a *Drosophila* TRP-related subunit, forms a regulated cation channel with TRPL. *Neuron* **26**: 647-657
- YANG, N., GEORGE JR., A. L. & HORN, R. (1996): Molecular basis of charge movement in voltage-gated sodium channels. *Neuron* **16**: 113-122
- YAU, K.-W. (1994): Phototransduction mechanism in retinal rods and cones. The Friedenwald lecture. *Invest. Ophthalmol. & Vis. Sci.* **35**: 9-32
- YAU, K.-W. & BAYLOR, D. A. (1989): Cyclic GMP-activated conductance of retinal photoreceptor cells. *Annu. Rev. Neurosci.* **12**: 289-327
- YOSHIKAWA, S., MIYAMOTO, I., ARUGA, J., FURUICHI, T., OKANO, H. & MIKOSHIBA, K. (1993): Isolation of a *Drosophila* gene encoding a head-specific guanylyl cyclase. *J. Neurochem.* **60**: 1570-1573
- YUSAF, S. P., WRAY, D. & SIVAPRASADARAO, A. (1996): Measurement of the movement of the S4 segment during the activation of a voltage-gated potassium channel. *Pflügers Archiv* **433**: 91-97
- ZAGOTTA, W. N. & SIEGELBAUM, S. A. (1996): Structure and function of cyclic nucleotide-gated channels. *Annu. Rev. Neurosci.* **19**: 235-263
- ZHOU, Y., MORAIS-CABRAL, J. H., KAUFMAN, A. & MACKINNON, R. (2001): Chemistry of ion coordination and hydration revealed by a K⁺ channel-Fab complex at 2.0 Å resolution. *Nature* **414**: 43-48
- ZOCHÉ, M. (1997): Charakterisierung der molekularen Wechselwirkung zwischen Calmodulin und Zieldomänen - eine Oberflächen-Plasmon-Resonanz-spektroskopische Studie. Berichte des Forschungszentrums Jülich; 3393. ISSN 0944-2952 (Dissertation Universität Köln)

-
- ZUFALL, F., FIRESTEIN, S. & SHEPHERD, G. M. (1994): Cyclic nucleotide-gated ion channels and sensory transduction in olfactory receptor neurons. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **23**: 577-607
- ZUFALL, F., SHEPHERD, G. M. & BARNSTABLE, C. J. (1997): Cyclic nucleotide gated channels as regulators of CNS development and plasticity. *Curr. Opinion Neurobiol.* **7**: 404-412
- ZUKER, C. S. (1996): The biology of vision in *Drosophila*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**: 571-576

Anhang

A Nuklein- und Aminosäuresequenzen

Dmcnga :

```

      10      20      30      40      50      60      70
ATGCGACATTTCAAAGTCAAAGCCATGGTGCAGTCGCTGGATATATCCGCCATAACGGGACAGCAAACAGATGCG
M R H F K V K A M V Q S L D I S A I T G Q Q T D A

      80      90      100      110      120      130      140      150
GAGCCAAGCAAACGGAGCAAACCCCTCCGCTTTAAGACGCACTCTGCAGGCACTGCGCCAGCGTCTGACTAAAAGG
E P S K R S K P S A L R R T L Q A L R Q R L T K R

      160      170      180      190      200      210      220
AATCGCCCCAAACCGCCGGACTGGTTCCTCGAGAAGTTCTCCAACACCACCAACACGGACAAGATTGCAAGGGT
N R P K P P D W F L E K F S N T T N T D K I R K G

      230      240      250      260      270      280      290      300
TGTCGGCGATGGAGGATGCGGGCGCTATCCAGCGAAATACGTGGCTCCAGTGTCTGTGCAACCGTCTGTCCGTC
C P A M E D A A L S S E I R G S S V L C N R L S V

      310      320      330      340      350      360      370
GATCCCACCTGCAGTCGCATTACAGATGGCTGGCCATCGTTTTCACTGGCAGTGCTTTACAATATCATCTTCGTG
D P T L Q S H Y R W L A I V S L A V L Y N I I F V

      380      390      400      410      420      430      440      450
GTGGGACGTGCGGTCTTCTGGGAGATCAATAAGAGTGCTCCCGCCTTTTGGTACACGCTGGACTACCTGTGCGAC
V G R A V F W E I N K S A P A F W Y T L D Y L C D

      460      470      480      490      500      510      520
TTTATCTATCTGCTGGATACGCTCGTCCACATGCACGAGGGATTTTTGGACCAAGGTCTCCTCGTGCGGGATGCC
F I Y L L D T L V H M H E G F L D Q G L L V R D A

      530      540      550      560      570      580      590      600
TTTCGGCTGCGCCGGCACTATTTCCACACCAAGGGCTGGTACCTCGACGTCCTGTCCATGCTGCCCACGGACTTG
F R L R R H Y F H T K G W Y L D V L S M L P T D L

      610      620      630      640      650      660      670
GCCTACATCTGGTGGCCGCCGGAGACCTGCTCCAGTCTGTATCTGCCGTGTCCCGTGATAGTGCGTCTGAATCGT
A Y I W W P P E T C S S L Y L P C P V I V R L N R

      680      690      700      710      720      730      740      750
CTGCTCAGGATCAATCGACTGTGGGAGTGGTTCGATCGAACGGAGACAGCGACGGGATATCCGAATGCCTTCCGC
L L R I N R L W E W F D R T E T A T G Y P N A F R

      760      770      780      790      800      810      820
ATCTGCAAGTGGTGTCTGGCCATTTTGGTGTGCTGATCCACTGGAATGCCTGCATGTACTTTGCCATCAGCTACGAA
I C K V V L A I L V L I H W N A C M Y F A I S Y E

      830      840      850      860      870      880      890      900
ATCGGCTTCAGTTCGATTTCGTGGGTGTATAATCTGAATGGAACGAGAAACAATACGTTGCAGCGGCAGTACATC
I G F S S D S W V Y N L N G T R N N T L Q R Q Y I

```

910 920 930 940 950 960 970
 TATAGTTTCTACTGGTTCGACGCTAACGCTGACCACCATTGGCGAGACTCCAACGCCGAGAACGATGTGGAGTAT
 Y S F Y W S T L T L T T I G E T P T P E N D V E Y

980 990 1000 1010 1020 1030 1040 1050
 CTGTTTCGTGGTGGCCGATTTCTGGCTGGCGTCCCTAATCTTCGCCACCATTGTGGGTAACATTGGCTCCATGATC
 L F V V A D F L A G V L I F A T I V G N I G S M I

1060 1070 1080 1090 1100 1110 1120
 TCCAACATGAATGTGGCCCGCTGGAATTCAGAATCGCATGGACGGTGTCAAGCAGTACATGGCCTTCCGGCGA
 S N M N V A R V E F Q N R M D G V K Q Y M A F R R

1130 1140 1150 1160 1170 1180 1190 1200
 GTGGGTCACGAGCTGGAGGCCCGGGTGATCCGCTGGTTTGCCTACACGTGGTCGCAAAGTGGTGCCTGGACGAG
 V G H E L E A R V I R W F A Y T W S Q S G A L D E

1210 1220 1230 1240 1250 1260 1270
 GAGCGTGTGCTGGCCGCCCTGCCGGACAAGCTGAAGGCGGAGATCGCTATCCAGGTGCACATGGATAACGCTGAAG
 E R V L A A L P D K L K A E I A I Q V H M D T L K

1280 1290 1300 1310 1320 1330 1340 1350
 CAGGTGCGCATCTTCCACGACACGGAACCGGGTCTCCTCGAGGCCCTGGTGTGAAGCTCAAGCTGCAGGTCTTC
 Q V R I F H D T E P G L L E A L V L K L K L Q V F

1360 1370 1380 1390 1400 1410 1420
 AGTCCGGGCGACTATATCTGTGCGAAGGGTGACGTGGGCAAGGAGATGTATATCGTGAAGCGGGGCAAGTTGTCC
 S P G D Y I C R K G D V G K E M Y I V K R G K L S

1430 1440 1450 1460 1470 1480 1490 1500
 GTCGTGCGCGATGATGGCATCACCGTGTGGCCACCTTGGGCGCCGGTTCGGTGTTCGGCGAGGTTTCCGTACTC
 V V G D D G I T V L A T L G A G S V F G E V S V L

1510 1520 1530 1540 1550 1560 1570
 GAGATTGCGGCAATCGGACGGGCAATCGGCGCACGGCCAATGTGAGATCCCTGGGCTACTCGGATCTCTTCTGT
 E I A G N R T G N R R T A N V R S L G Y S D L F C

1580 1590 1600 1610 1620 1630 1640 1650
 CTGGCGAAACGGGATTTGTGGGAGACCCTGTCCGACTATCCGGAGGCCAGATCCACGCTCACTCAGCGAGGATGC
 L A K R D L W E T L S D Y P E A R S T L T Q R G C

1660 1670 1680 1690 1700 1710 1720
 CAGCTGCTGCGCAAGGATGGCTTACTGGACGAGCAAATATTCGCTGATTCACAAAGGTTACACGACAGCATTGAG
 Q L L R K D G L L D E Q I F A D S Q R V H D S I E

1730 1740 1750 1760 1770 1780 1790 1800
 GGCGGCATCGAAAAGCTGGAGCTCTCGGTGGAGAACCTCAACATGCGGCTGGCCCGCCTCCTCGCTGAGTACACG
 G G I E K L E L S V E N L N M R L A R L L A E Y T

1810 1820 1830 1840 1850 1860 1870
 GCCAGCCAGGCCAAGATCAAGCAGCGCCTCGCGAAGCTGGAGATGAATGGCGGCCCTGGCACGTGGCGATTGGAG
 A S Q A K I K Q R L A K L E M N G G P G T W R L E

1880 1890 1900 1910 1920 1930 1940 1950
 TGTGAGCCCCAAAGTCGGGCTCGCAGCGGACGCCTCTATTCGCTGCAGCCCCAAGCGGCGCCACGTTTCGCGACCC
 C E P Q S R A R S G R L Y S L Q P K R R P R S R P

1960 1970 1980 1990
 GACGCGACTGCCAAGAGCAGCGATGCTGCCAAACAGAACACACTGTAA
 D A T A K S S D A A K Q N T L -

Abb. A1: Nukleinsäure- und abgeleitete Aminosäuresequenz des *Dmcnga*-Gens.

Dmcngb :

10 20 30 40 50 60 70
ATGGCACGTTTTCGGAAGGTGAATCGCCAAAGTGAGAAGCTCGAACCGGAGGCGAGTGCATCGTTGCTAAAATCA
M A R F R K V N R Q S E K L E P E A S A S L L K S

80 90 100 110 120 130 140 150
TCCCCGAATATATTGGAGAACTTTGCCTACGACGAGTTTCAGCCAATACAAACCAATCACCCGCTTCTAAAGCGG
S P N I L E N F A Y D E F Q P I Q T N H P L L K R

160 170 180 190 200 210 220
ATGGCCACCACACCCGTCGCCAATCCGGCTCCCAGAGCAGCTCCTCTTCCACATCGTCTACGCGTAAAGCGGAG
M A T T P V A Q S G S Q S S S S S T S S T R K A E

230 240 250 260 270 280 290 300
CCTAAGTTCTGCGACACCCTGGAGCGACATGCCTTCATGCGGAATGTCATTAATCAGCAGCCGGAGAGCACACGC
P K F C D T L E R H A F M R N V I N Q Q P E S T R

310 320 330 340 350 360 370
CGCTACTCGACTCCTGGCGAAAAGGAGGCCAGGTGCGGCGCAGCCTGGAGGAGATCACCAAGGATCTGAAGGAA
R Y S T P G E K E A Q V R R S L E E I T K D L K E

380 390 400 410 420 430 440 450
ATCGAGCAGTTTCGTTAGTGCCACCGAGGAGCTCATGCAGAGGGAGAAGGAACAGGAGCAGATGATGTACTCCAAC
I E Q F V S A T E E L M Q R E K E Q E Q M M Y S N

460 470 480 490 500 510 520
AAGGAGAATAAGTGCCCCAGTCCGGTGAAGAGGGTTACATATAAAATAAACGCCTACAAGGCGCCGCTCGAAGA
K E N K C P S P V K R V T Y K I N A Y K A P P R R

530 540 550 560 570 580 590 600
CATCGTCCTGGAAGTCCACGATTCTACCACTCCAGATTGTACTTTAGGAATGGAAAAATTGGATGTGTGCGACTCC
H R P G S P R F Y H S R L Y F R N G K I G C V D S

610 620 630 640 650 660 670
ACGGAGCATCAGAACAATGTGGGCGCCACTCATGCTCTGGTCAAGCACATACTGCACCATGAGAAGCCCCTAGTG
T E H Q N N V G A T H A L V K H I L H H E K P L V

680 690 700 710 720 730 740 750
AGTCCGGATAGTGTGAGGAGAGTGCTCGAGCAGGACAGCTTCGAAATGGTTCCACTACCAGGAGCTGTTTCTGAA
S P D S V R R V L E Q D S F E M V P L P G A V P E

760 770 780 790 800 810 820
ATCGTACCCGATCCAATTGCCATTCAGCGGGCGGAGGAACTGGCCGCAGCCACTGGCCAGGTCGTTTTGCCCAA
I V P D P I A I Q R A E E L A A A T G Q V V L P K

830 840 850 860 870 880 890 900
GAGGAGGAGGAGGAGGAGAAGAGTTCCGCACTGCATCAAGTGAATCCCAACCAGACGTTGACGAGGACGAACAG
E E E E E E K S S P L H Q V E S Q P D V D E D E Q

910 920 930 940 950 960 970
GATGTGCAGATCTGTTACAACGAATCGCCCCGAGCTCCAAAATGAGGATCGAAATGAGCGAACCAGAGGACACCC
D V Q I C Y N E S P E L Q N E D R N E R T Q R T P

980 990 1000 1010 1020 1030 1040 1050
TCAATAAACGAGAGCGAGATAGTGGCCGTCGATGAACCGGACACGAAATGAACTCGGATGTGGATCACCGCAAG
S I N E S E I V A V D E P D T E M N S D V D H R K

1060 1070 1080 1090 1100 1110 1120
CCAAGCAGCGCTGGTAGCTTGGACTCCAGGGTCAGCAGTTCCTCCGCGATCAGGTTCTGTCATTTGGTTTCGTCGC
P S S A G S L D S Q G Q Q F L R D Q V R H L V R R

1130 1140 1150 1160 1170 1180 1190 1200
TTTACAGCCAGAGCCAACAAGGTGAAGTCCCGGATCGAGCTGCCTCCGACTCCTTCGTCCAGCAGCACGGTCAGT
F T A R A N K V K S R I E L P P T P S S S S T V S

1210 1220 1230 1240 1250 1260 1270
TCACCATCTCCGCTCCGACCAAGAGTCTGCACCCTTCGCCGACGACACAAGGTGCGTCTGGTGCCGGCTGGTCAA
S P S P P P T K S L H P S P Q H K V R L V P A G Q

1280 1290 1300 1310 1320 1330 1340 1350
TCACCCCATCGTGGAAGACTCTTTCGAAGCGGATACTCCAAGGTCCAATGTGTGGCTCTGTTCCAGTTTGTGCGGC
S P H R G R L F E A D T P R S N V W L C S S L C G

1360 1370 1380 1390 1400 1410 1420
GCCAACAATGATGAGCGAACCCCTGGATCCCCAGGGCAAGATCTACATCTCCTGGCTATGCGTTGTATCGCTATCG
A N N D E R T L D P Q G K I Y I S W L C V V S L S

1430 1440 1450 1460 1470 1480 1490 1500
TTTCTCTATAACGCCTGGGTAATCCCGCTGCGTGCCTCGTTTCCCTTTCAAACCAAGGAGAACACCAATATCTGG
F L Y N A W V I P L R A S F P F Q T K E N T N I W

1510 1520 1530 1540 1550 1560 1570
CTGGCCTGCGACTTTTGGCTGACATCATATATCTACTGGATGTGGTCTTCTTTAAACATCGGGTTATGTACCTT
L A C D F C A D I I Y L L D V V F F K H R V M Y L

1580 1590 1600 1610 1620 1630 1640 1650
TTTGAGGGATTTCTGGGTGAAAAACAAGAACCCTCACCAGAAAAGAACTACATGCGAAAACCTGCAGTTTAAGCTGGAT
F E G F W V K N K N L T R K N Y M R K L Q F K L D

1660 1670 1680 1690 1700 1710 1720
CTGCTGGCCCTTCTTCCGCTGGAGCTATTGTACTTTAAACTCGGAACACAGGCGGTTTGGTTGCGTTTTTCCAAGG
L L A L L P L E L L Y F K L G T Q A V W L R F P R

1730 1740 1750 1760 1770 1780 1790 1800
TTCTTTAAGATTTCAGAGCTTCTGGGAAGTGTTCGCTTTTGGATCGAGTCATATCTTCTCCGCACTTTGTTTCGA
F F K I Q S F W E V F R L L D R V I S S P H F V R

1810 1820 1830 1840 1850 1860 1870
GTGGCCAAAACCCTAACCTACATGCTCTACATGATCCACATCACGGCTGCTCTGTACTACGCCTATAGTGACTAC
V A K T L T Y M L Y M I H I T A A L Y Y A Y S D Y

1880 1890 1900 1910 1920 1930 1940 1950
CAGGGTCTGGGACAGAATCGTTGGGTCTTCAGCGGCAAAGGGCATCCCTATGTAAGGTGCTTTGCTTTTGCCACC
Q G L G Q N R W V F S G K G H P Y V R C F A F A T

1960 1970 1980 1990 2000 2010 2020
AAGACGGCAACTTCGATAGGAAAAACCCCAAGCCGGAACGTCAGGGAGAGTACGTCTTCATGACGGTGGCCCTGG
K T A T S I G K N P K P E R Q G E Y V F M T V A W

2030 2040 2050 2060 2070 2080 2090 2100
CTAATGGGCGTCTTTGTGTTGCTCTGCTTATCGGTTCAGATCAGGGATATCATCTCGACAGCCACTCGGAATAAG
L M G V F V F A L L I G Q I R D I I S T A T R N K

2110 2120 2130 2140 2150 2160 2170
CATGAGTATCGCCAGCTGGAGGATGAGACACTGGAGTACATGCGACGCCTCAATCTCTCGCAGGAGGTGCAGTCC
H E Y R Q L E D E T L E Y M R R L N L S Q E V Q S

2180 2190 2200 2210 2220 2230 2240 2250
AGGGTCAAAATGTGGTTCCAGTTTACATGGGAGCAGCAGCGCACTTTGGATGAATCCAACATATTGGATGCTTTG
R V K M W F Q F T W E Q Q R T L D E S N I L D A L

2260 2270 2280 2290 2300 2310 2320
CCCATCAATTTGAAAACCGATATCGCCATCTCCGTGCACATCCAAACGCTCTCCAAGGTGCAACTCTTTGCTGAT
P I N L K T D I A I S V H I Q T L S K V Q L F A D

2330 2340 2350 2360 2370 2380 2390 2400
 TGCGAGGAGGCTTTACTCAGAGATCTGGTTCATAAACTAAGGGCAGTCACATTTTGGCCAGGAGATTTTCGTTTGC
 C E E A L L R D L V L K L R A V T F L P G D F V C

2410 2420 2430 2440 2450 2460 2470
 CGCAAAGGCGAAGTGGGCAGAGAGATGTATATCGTGAAACTGGGACAGGTTCAAGTGATGGGTGGTCTAGTAGC
 R K G E V G R E M Y I V K L G Q V Q V M G G P S S

2480 2490 2500 2510 2520 2530 2540 2550
 GATGTAGTGTGGCCACTCTAACCGAAGGTTCCGTGTTTCGGGGAGATCAGTCTGCTGGGAATAAATGGAGCCGAT
 D V V L A T L T E G S V F G E I S L L G I N G A D

2560 2570 2580 2590 2600 2610 2620
 CGCAGAACAGCAGATGTCCGATCCAAGGGCTACTCCAACCTGTTTCGTGCTGTCCAATCGGATTTAAACGAGGTC
 R R T A D V R S K G Y S N L F V L S K S D L N E V

2630 2640 2650 2660 2670 2680 2690 2700
 ATTGCCCTACTATCCACGGCCCAGGCGATTCTCAAAAAGCGTGCTCGTCAGCTAATGCGAAAAAATGCAGCCAGA
 I A Y Y P T A Q A I L K K R A R Q L M R K N A A R

2710 2720 2730 2740 2750 2760 2770
 GAGCGGAAGAGGAGCGAGAGCGAGCACGACGCGCCCTCCAGGCAGATGTGGTTATCGGCAATCCCAAAACACCA
 E R E E E R E R A R S A L Q A D V V I G N P K T P

2780 2790 2800 2810 2820 2830 2840 2850
 GAGACGGCGCCCAAACTTCTGCAGACAGTTATCCAGGCGCTGCCGTTTGAATCGCCCGCCGTGGTGCTCATCAG
 E T A P K L L Q T V I Q A L P F E S P A V V L I T

2860 2870 2880 2890 2900 2910 2920
 AGAGGTTTCGAAGAGGATGCGCCGCAAGCGCCAGTCCGTGCAGATGGAGACCATTGTTGAGCCCAAGATGGAGGTG
 R G S K R M R R K R Q S V Q M E T I V E P K M E V

2930 2940 2950 2960 2970 2980 2990 3000
 ACAGGCGCTGCCGAGACGCAAGATCAAAAGGGCTTAAAGACAGGACGATGTTCCGCCAGATTTGCTATCTTCCATA
 T G A A E T Q D Q K G L K T G R C S P D L L S S I

3010 3020 3030 3040 3050 3060 3070
 CAGCAAGAGCTGAAGTCTAAGCACAAAGTTTATCAACCTCACGGACTCGGAGAAGGCGCTGATCAGCCAATCGGCA
 Q Q E L K S K H K F I N L T D S E K A L I S Q S A

3080 3090 3100 3110
 AACAAATCCCTGGAGGACATGAAGGTGGTGGATCTCTAA
 N N S L E D M K V V D L -

Abb. A2: Nukleinsäure- und abgeleitete Aminosäuresequenz des *Dmcrngb*-Gens.

Dmcng3 :

10 20 30 40 50 60 70
ATGAACAGAAATAAAAGTACAAAAGAAACAGCAAGAAACAAAAGAAAATGAAATACTTTTCGAAACTCGTTTAGG
M N R N K S T K E T A R N K K K M K Y F R N S F R

80 90 100 110 120 130 140 150
AAATCGCGTATCGGAGATGGAGCTTCAGATCCAGATTCCGATTGGACACGATCGAACCAACGCTGGATGAAGCTA
K S R I G D G A S D P D S D W T R S N Q R W M K L

160 170 180 190 200 210 220
CGCACCACCGTGCAGATCTCATCGGCGATACAGAAGAAACCACCGCTCAAGCGGAAGACTCCTTCCTGAAGCGT
R T T V Q I S S A I Q K K P P L K R E D S F L K R

230 240 250 260 270 280 290 300
TTCTCGACTAGACAGATACCCGAAACACAGGAACTGTTGAAGATACGGGTTTCAGAAAAGTGCCTCTGGTGACGTC
F S T R Q I P E T Q E T V E D T G S E S A S G D V

310 320 330 340 350 360 370
GACAAGAGTGTAAACGACGGCGACGCTATCTGCAGAAACGACGATCCGTTGTTAATCCAGATGAAAATTTTTAC
D K S V K R R R R Y L Q K R R S V V N P D E N F Y

380 390 400 410 420 430 440 450
TTCTATTGGTTAATGATGTTAACTGTATGTGTTCTATATAATCTATGGACCCTAATTGTGAGGCAGAGCTTTCCT
F Y W L M M L T V C V L Y N L W T L I V R Q S F P

460 470 480 490 500 510 520
GAACTGCAGCAATCTGTGCCACGTTTTGGCTCATCTGCGATTTCGATGACAGATGTGTATTTATCCTAGATATA
E L Q Q S V P T F W L I C D S M T D V V F I L D I

530 540 550 560 570 580 590 600
ATAGTTCAATTACGCACAGGCTATCTGGAGCAGGGCCTAATGGTATACGACGACAGGAAGCTGGCCTGTCACTAC
I V Q L R T G Y L E Q G L M V Y D D R K L A C H Y

610 620 630 640 650 660 670
GTTCACTCGCGGACTTTATCTTCGATATGATAGCGCTGATACCATTGGATTTGCTGCAGCTCAAGATGGGCACA
V H S R D F I F D M I A L I P L D L L Q L K M G T

680 690 700 710 720 730 740 750
CATCCGCTCTGCGTTTTACGCGCTTTTTTAAAGTTTATCGATCTGTGAGATTTTATTACATCGTAGAAAGTAGA
H P L L R F T R F F K V Y R S V R F Y Y I V E S R

760 770 780 790 800 810 820
ACAGTTTGGCCAAATTTATGGCGTGTGTTAACCTAATTCATATCCTGTTAATACTGGCACACTGGTTCGGTTGT
T V W P N L W R V V N L I H I L L I L A H W F G C

830 840 850 860 870 880 890 900
TTCTATTTTTTACTCTCCGAGGCGGAGGGCTTTCAGGGCGACTGGGTGTATCCGTATCGACCCGGCGACTACCCT
F Y F L L S E A E G F Q G D W V Y P Y R P G D Y P

910 920 930 940 950 960 970
ACCCTAACGCGAAAAGTATCTGGGCAGCCTGTACTGGTTCGACCCTGACACTGACGACCATTGGGGACCTGCCACA
T L T R K Y L G S L Y W S T L T L T T I G D L P T

980 990 1000 1010 1020 1030 1040 1050
CCCGAAACGAATGCAGAATATATTTTTACGATCGTTAGCTATTTGATTGGTGTTTTTTATCTTCGCCACCATTGTG
P E T N A E Y I F T I V S Y L I G V F I F A T I V

1060 1070 1080 1090 1100 1110 1120
GGCCAAGTGGGCAATGTGATAACGAACCGAAATGCGAATCGCCTGGAGTTCGAGCGCCTTCTGGATGGGGCCAAG
G Q V G N V I T N R N A N R L E F E R L L D G A K

1130 1140 1150 1160 1170 1180 1190 1200
ACCTATATGCGGCACCAAGGTGCCCGGAGGGATGAAGCGGCGCGTGTGCGATGGTACGACTATAGCTGGTCC
T Y M R H H K V P G G M K R R V L R W Y D Y S W S

1210 1220 1230 1240 1250 1260 1270
CGCGGCAGGATACAGGGTGGCGGTGACATCAATACCGCACTGGGCCTCCTGCCCGACAAGCTGAAAACCGAATTG
R G R I Q G G G D I N T A L G L L P D K L K T E L

1280 1290 1300 1310 1320 1330 1340 1350
GCCTTACATGTCAACCTGAGCGTTCTGAAGAAGGTGACCATATTCCAAGAGTGCCAGCCCAGTTTCCTTACAGAT
A L H V N L S V L K K V T I F Q E C Q P E F L H D

1360 1370 1380 1390 1400 1410 1420
CTCGTGTCAAGATGAAGGCCTACATCTTTACGCCGGGCGACTCCATTTGCCGTAAGGGCGAGGTGGCCCAGGAG
L V L K M K A Y I F T P G D S I C R K G E V A R E

1430 1440 1450 1460 1470 1480 1490 1500
ATGTTTCATCATTGCCGATGGCATTCTGGAGGTGCTGAGCGAGACGGGCAAGGTCCTAACCCACCATGAAGGCTGGC
M F I I A D G I L E V L S E T G K V L T T M K A G

1510 1520 1530 1540 1550 1560 1570
GATTTTTTTGGCGAAATCGGCATCCTCAATCTGGACGGGCTTAACAAACGCACAGCGGATGTGCGCTCCGTGGGC
D F F G E I G I L N L D G L N K R T A D V R S V G

1580 1590 1600 1610 1620 1630 1640 1650
TACTCGGAGCTCTTCTCTGTCCCGCGAGGATGTCTGGCGGCCATGAAGGACTACCCCGATGCCAGGAGATT
Y S E L F S L S R E D V L A A M K D Y P D A Q E I

1660 1670 1680 1690 1700 1710 1720
CTGCAGACCCCTGGGCCGCAAGCGGCTAATGGAGGTGCGTTGCGTGAACAAAAAGTACGCCAAGGCGCAGAGTGAC
L Q T L G R K R L M E V R C V N K K Y A K A Q S D

1730 1740 1750 1760 1770 1780 1790 1800
AAGGAGGCGGCCCTATGCGGCAGCTCATCCGCATCACCATCAGAGCCATCACCAGGGTCAGGTGCACCAGAGC
K E A A A Y A A A H P H H H Q S H H Q G Q V H Q S

1810 1820 1830 1840 1850 1860 1870
GACAGCAGCGAGAACAGTGCCTCCAAGAAGATCGTGGACAAGCTGAAGCACGACGTCAAGGGATTCCGCAACGTG
D S S E N S A S K K I V D K L K H D V K G F R N V

1880 1890 1900 1910 1920 1930 1940 1950
CTGAAGAAGTCCAGGACCTCGCGCAAAAGCGATGAATCCTTGGAGATGCAGCCACTGCACAACACCTCGCCGCGC
L K K S R T S R K S D E S L E M Q P L H N T S P R

1960 1970 1980 1990 2000 2010 2020
GGCAGCAAGATCCTGCTGAAGCGCATGTACGCGTTTCGATCGGACGAAAAGGATGCGGATAGCGCCGAGGCCAAG
G S K I L L K R M S R V R S D E K D A D S A E A K

2030 2040 2050 2060 2070 2080 2090 2100
GACGAGTTGCACGACAAGACGCCAGCCCAATTGGGGCGGACTGCCATTGCTGCAGCGCCTCCGGCTCCTCAAG
D E L H D K T P S P I G A G L P L L Q R L R L L K

2110 2120 2130 2140 2150 2160 2170
GAGAAGCAGGATCGCGAAGAGCGAGCTGTAAAGTCCACACCACCACAGAAATCTCCACCTCACTCACATGTAACG
E K Q D R E E R A V K S T P P Q K S P P H S H V T

2180 2190 2200 2210 2220 2230 2240 2250
TGTACGTTATCGCCGAGGAATCGATCCAGGAGGAGCCCCGAACGCGAGTTCAGCGAAGGCTTTCCCCTGATCCAG
C T L S P Q E S I Q E E P E R E F S E G F P L I Q

2260 2270 2280 2290 2300 2310 2320
CGACTCCAGCAGTTGAAAATTAAGAATGAGCCGAGGCAAACGCCCGAACC CGCGTCGTTCATGGTCAACACA
R L Q Q L K I K N E P Q A N A A E P G V V M V N T

2330 2340 2350 2360 2370 2380 2390 2400
CCGCCAACATTAGCAGCAAAATCGATTTCGCTGCCAGCCAGGCAGGGGCATCGCATCCTGGCCAAAT
P P N I S S K I D S H F A A S Q A G A S H P G P N

2410 2420 2430 2440 2450 2460 2470
GGCGGAGCCATCGGCATCTCGGCGCCGGGACAATCGCTGACGGTGGCCCAGATCAAGCCCATCATGAAGGTGTCC
G G A I G I S A P G Q S L T V A Q I K P I M K V S

2480 2490 2500 2510 2520 2530 2540 2550
TTCAAGCAGAAGATCCAGCAGATGCAGGGTGGCGGCGGAGGAGCCAGCAGTTCACCGGGTCCAAGCACGGGAGCC
F K Q K I Q Q M Q G G G G G A S S S P G P S T G A

2560 2570 2580 2590 2600 2610 2620
ATAGCCAAGAAGGAGCCACCCAAGTCACTGGCTCTGGTGGCCAAGCACGCTACATCCGAGGATCCCCTCGCCGCA
I A K K E P P K S L A L V A K H A T S E D P V A A

2630 2640 2650 2660 2670 2680 2690 2700
GCCGGATTGGGTTTGGGATCTGGTTCTAGTTCGGCATTGCCACCATATCGAAGAGGGTAGTCAAACCTCAAAGC
A G L G L G S G S S S G I A T I S K R V V K P Q S

2710 2720 2730 2740 2750 2760 2770
CATCGGATGGCTACGCCGCTGCAATCCGACACCGACACCGATGGCAGCCCATCAAGCCGTGGTCCAAGCTGAAA
H R M A T P L Q S D T D T D G T P I K P W S K L K

2780 2790 2800 2810 2820 2830 2840 2850
CTGGCCACCTGATGTCTCCAGCTACACGAGCTTAACCAACTGTTTCGCCGGATGATCTGGCCTCACCGCTGAAG
L A T L M S S S Y T S L T N C S P D D L A S P L K

2860 2870 2880 2890 2900 2910 2920
AACTACTCGTGAGCAACATAACCGCAGCAGATGGAGACGCATACGCGACCACGTCAACATAGCGCCAGAAGTAGT
N Y S L S N I P Q Q M E T H T R P R H H S A R S S

2930 2940 2950 2960 2970 2980 2990 3000
TCGAGATCACCGGTCATGGACACCACCATCACCATCATCATGGCCACCACCAGCACGGACAGCTTCAGGGGCCA
S R S P R H G H H H H H H G H H Q H G Q L Q G P

3010 3020 3030 3040 3050 3060 3070
AGCTCCACGAGACCAACGGCTCCACGACCAGCCAGGTGAACCAGGTGACGGCGAGTGCAAAGCGGGATTGCTTG
S S T S T N G S T T S Q V N Q V T A S A K R D C L

3080 3090 3100 3110 3120 3130 3140 3150
CGTCTCCAGAAGCCGGAACAGCACTTGCCCGACGGCGAACTGACCGAACTGGGCGGCAATGGACGGAGGAAGCTC
R L Q K P E Q H L P D G E L T E L G G N G R R K L

3160 3170 3180 3190 3200 3210 3220
TACCAAAGCGTGTTCGATCTGTTCGCCGAATACTGCGGACTGCCGTTTGTCAAGCGATTGAAGATCCTCAATGAG
Y Q S V F D L S P E Y C G L P F V K R L K I L N E

3230 3240 3250 3260 3270 3280 3290 3300
CGCCAGAAGCTTGCGGAACTGGAGCGGGCATTGCAAACCCGTAGCTTTAGCCTCGACTGCTCCAAGTCCGGGCCG
R Q K L A E L E R A L Q T R S F S L D C S K S G P

3310 3320 3330 3340 3350 3360 3370
GATAGCAAGGTGCCATAACGGAGTCC'TTGATCGATGTTATAGCGACACTTCCGGCATCTACTCGCAGTTCCTC
D S K V P I T E S L Y R C Y S D T S G I Y S Q F L

3380 3390 3400 3410 3420 3430 3440 3450
AGCACGTACGAATCAACCACCAGCTCCACCTCGATATCCACCAATACTTCCGCCTCTGCATCGGCATCCGCCTCC
S T Y E S T T S S T S I S T N T S A S A S A S A S

3460 3470 3480 3490 3500 3510 3520
GCATCCGCATCCGCATCGGATAGCAACTCCAGGCAATTGCAATACGTACCCCTGCCACTCAGTCCCGAATCGAAT
A S A S A S D S N S R Q L Q Y V P L P L S P E S N

3530 3540 3550 3560 3570 3580 3590 3600
 GAGACCATGGAGCGGCGCAAGCTGAAGAGCATACTCAAGAACTCCAGATGGGCGGTGGTTCAGCAGGAGGAGGCG
 E T M E R R K L K S I L K K L Q M G G G Q Q E E A

3610 3620 3630 3640 3650 3660 3670
 GGGCCGGGCACGGGAACGGGAGCGGGAGCGGTAATGGGAACGGGGTCAAAGGTCAACTCCAGTGCCAGCCAAAAG
 G P G T G T G A G A V M G T G S K V N S S A S Q K

3680 3690 3700 3710 3720 3730 3740 3750
 GGGCAGGGCCTGCCGGCGGAGCCGACCTTGGGAAGCCCCGCCAGTGCCAAGGAGGAGGAATCTCCCTTCGGC
 G Q G L P A E P T L E G P P A S A K E E E S P F G

3760 3770 3780 3790 3800 3810 3820
 GGTGCTGCGCGGATCGGTTTCGGTGAATAATGCTTGCGGTAACGGTAACGGTAGCGTTAGTGGTAACGGT
 G A A A I G S V N N A C G N G N G N G S V S G N G

3830 3840 3850 3860 3870 3880 3890 3900
 AACGGTAGCGGTACGGTAAACGATAGCAGTGCTAATTTCGAGTTCGCATCCGAGCAATAACGGCAACAGTGCAT
 N G S G T V N D S S A N S S S H P S N N G N S A Y

3910 3920 3930 3940 3950 3960 3970
 ACGTGTCTCCTCCACCGTCAGTGGCTTTCCGTTTCCGGTACCCATTGCACCAGCATCCGGCTCAGTTCCTACTA
 T C P P P P S V A F P F P V P I A P A S G S V P L

3980 3990 4000 4010 4020 4030 4040 4050
 CCATTGGAGCCCGGAGTGTCTGAATGTCTGGTCGCCGACGTTGACGTTGGTAGCGCCACGAATTCGCCGAGGAG
 P L E P G V S N V W S P T L T L V A P T N S P Q E

4060 4070 4080 4090 4100 4110 4120
 AGCTTCGCGTTTCTCCGCAACTGCAGGGGAGTTGGGCGGACACGGAACCGGGCGCGGACTCGTTGGTGGCGTT
 S F A F P A Q L Q G E L G G H G T G R G L V G G V

4130 4140 4150 4160 4170 4180 4190 4200
 GGCAGCGCCTCAGCGTCGATGTTGCCAGCGGGAGCGGGAGCAAGTGCATCCGCATCCGCATCCGCATCCACATCC
 G S A S A S M L P A G A G A S A S A S A S A S T S

4210 4220 4230 4240 4250 4260 4270
 ACGTCTACGTCCGCCTCGTATGTCTGTCGAGTGTCTCAGCGTCGTCGAATCAAATCCTTCATGCCCAGTCCACCACT
 T S T S A S Y V V E C S A S S N Q I L H A Q S T T

4280 4290 4300 4310 4320 4330 4340 4350
 GATTTGAATTTGAATTTGCAGCTCAGGCAGAACACGACCAAGTTCGATGGGCGGACCGGGTCCAGCGCAACGGATT
 D L N L N L Q L R Q N T T S S M G G P G P A Q R I

4360 4370 4380 4390
 GAAGGGTTTTACCGAAATATAAAAAAAGAGCTCAAGTCCTGATAA
 E G F Y R N I K K E L K S - -

Abb. A3: Nukleinsäure- und abgeleitete Aminosäuresequenz des *Dmcng3*-Gens. Nach MIYAZU et al. (2000).

„*Dmcng3*-Datenbank“ (3'-Ende):

4360 4370 4380 4390 4400 4410 4420
 GAAGGCTTCCCGGAGGCACAGGACTACTTCAATCAGATCCTGAACGGCATCAATCACGTGATCAAGACGCACATG
 E G F P E A Q D Y F N Q I L N G I N H V I K T H M

4430 4440 4450 4460 4470 4480 4490 4500
 AACGAGATGCACTCCAAGTTCGAGACGCAATTCCTCCAGCATGGCTGGTGGAGGTGCGACGACGCGACGCTATCATT
 N E M H S K F E T Q F S S M A G E V R R R D A I I

4510 4520 4530 4540 4550 4560 4570
 GCCCAGCTGCAGCTCAAGCTGCGCTCCATAGAGGGCAAGTCCTCGGCGGCACCGACATCCTCATCCTCCTCCGCA
 A Q L Q L K L R S I E G K S S A A P T S S S S S A

4580 4590 4600 4610 4620 4630 4640 4650
 CTGGTTCTGCCATCAGCCGGCGCCAGAAGAAGATGCCCCAGCTGTCCGGTGGACGACGATGAGCCGCCGGAGGAG
 L V L P I S R R Q K K M P Q L S V D D D E P P E E

4660 4670 4680 4690 4700 4710 4720
 GAGGACAACAGCAGTTCCGGGTTCTTCGGCGGAACTTTTGTATTATGCGAGGTGACTCCCTGGACACGGTGTTCACC
 E D N S S S G S S A E L L F M R G D S L D T V F T

4730 4740 4750 4760 4770 4780 4790 4800
 TCATCGCCGCCATTCAAGGGGGCAGGCGCAGACATCGCCGGGTCTAGTCGTCATCATGCGGCCTCGGCTAAC
 S S P P I Q G G R R S T S P G P S R H H A A S A N

4810 4820 4830 4840 4850 4860 4870
 GCCCTGAAGTGTCCGAGCAGCTACTACGGAGGACCCGGATCCCTGAGCTCACGCCAGCCAGAGCCACCCAGC
 A L N C P S S Y Y G G P G S L S S R H A Q S H P S

4880 4890 4900 4910 4920 4930 4940 4950
 TTCTATTCGGCCAGGGAAATGGACGGAACAGCGGGCGCAGCAGTGGATATCGCGAGTGGAGCGGCGCAGCGGAG
 F Y S G Q G N G R N S G R S S G Y R E W S G A A E

4960 4970 4980 4990 5000 5010 5020
 AGCGGACACCTGGTCACTGGGAGTGGATCGAGCGCGCGGTTCATGGTGGCCGATGTCACGGGCAATCTGGCCCGC
 S G H L V S G S G S S G A V M V A D V T G N L A R

5030 5040 5050 5060 5070 5080 5090 5100
 CTGTCCGACAGCGTGATCCTCGACATTGGCGAGAGTTCAGTTCGAGCTCCTCGTCCAGCAAGATCAACATGGCC
 L S D S V I L D I G E S S S S S S S S S K I N M A

5110 5120 5130 5140 5150 5160 5170
 GAAGTGGATGACGACGAGGAGGAGGAGGATCCGAGGGTGCGGGATGCTCGAAACGAGGAGGACATAGACGATGGC
 E V D D D E E E E D P R V R D A R N E E D I D D G

5180 5190 5200 5210 5220 5230 5240 5250
 GAAGGTGGTTTGGCGAGCCACAACGACTGGGAGGTGCAGATGCTGGCCGCCGAGATGGAACGGCAGGAACGGAAG
 E G G L A S H N D W E V Q M L A A E M E R Q E R K

5260 5270 5280 5290 5300 5310 5320
 CGTGGTCACTCCCTATCCGACAATCTGGGCGAACTGAAGCACTGCAGCACGTTTCTGCGGCGACGCCGGAAGTTC
 R G H S L S D N L G E L K H C S T F L R R R R K F

5330 5340 5350 5360 5370 5380 5390 5400
 AGCGACACGGAACGGAATTTAGTGGAGACGACATGGAGGAGCAGTTGGCCAGATCGGGCAGCGGCCCGATGGAG
 S D T E T E F S E T D M E E Q L A R S G S G P M E

5410 5420 5430 5440 5450 5460 5470
 CCAAGCGGATCGGCACCATCTAGCTCTGGAGCCGGTGGCTCCACATCCGCTGGACATCAGAGCGGCAGCCAGCGA
 P S G S A P S S S G A G G S T S A G H Q S G S Q R

5480 5490 5500 5510 5520 5530 5540 5550
 CCGAGGGCCTCCAGTCTGGATCAGTTCAATCTGCGCTACGGCATCGGGCGCGGAATCTTTAAAGCAATGAGCATC
 P R A S S L D Q F N L R Y G I G R G I F K A M S I

5560 5570
 GATCGTGATAAAGACAAGCTTTGA
 D R D K D K L -

Abb. A4: Nukleinsäure- und abgeleitete Aminosäuresequenz des 3'-Endes des *Dmcmg3*-Gens aus der Datenbank. Die letzten mit der *Dmcmg3*-Sequenz übereinstimmenden Aminosäuren sind grau unterlegt.

Dmcng4 :

10 20 30 40 50 60 70
ATGGTGGTGTCCATGGCCTTCCTGTACAACCTTCTGGGTGATAATCTACCGCTTCGCCTTCAGGAGATCAATCGG
M V V S M A F L Y N F W V I I Y R F A F Q E I N R

80 90 100 110 120 130 140 150
CGAACGATCGCCATTTGGTTCTGTCTGGACTACCTGTCCGACTTCCTGTATCTGATCGATATACTGTTCCACTTT
R T I A I W F C L D Y L S D F L Y L I D I L F H F

160 170 180 190 200 210 220
CGCACCGGATACCTGGAGGACGGGGTGTCTGCAGACGGACGCTTTGAAGCTGCGCACCCACTACATGAACTCGACG
R T G Y L E D G V L Q T D A L K L R T H Y M N S T

230 240 250 260 270 280 290 300
ATCTTCTACATCGACTGCCTGTGCCTGTGCCGCTGGACTTTCTCTATTTGTCCATCGGCTTTAACTCGATCCTG
I F Y I D C L C L L P L D F L Y L S I G F N S I L

310 320 330 340 350 360 370
CGCAGCTTCCGGCTGGTGAAGATCTACCGGTTCTGGGCTTCATGGATCGCACCGAGCGGCACACCAACTACCCG
R S F R L V K I Y R F W A F M D R T E R H T N Y P

380 390 400 410 420 430 440 450
AACCTGTTCCGGAGCACGGCCCTCATCCACTACCTGCTTGTGATATTCCATTGGAACGGTTGTCTCTACCACATC
N L F R S T A L I H Y L L V I F H W N G C L Y H I

460 470 480 490 500 510 520
ATACACAAGAACAATGGGTTCCGGATCACGCAACTGGGTCTACCACGACTCGGAGTCGGCGGACGTGGTCAAGCAG
I H K N N G F G S R N W V Y H D S E S A D V V K Q

530 540 550 560 570 580 590 600
TATCTGCAGAGCTACTACTGGTGCACCCTGGCCCTGACCACCATCGGGGATCTTCCCAAGCCGCGCTCCAAGGGC
Y L Q S Y Y W C T L A L T T I G D L P K P R S K G

610 620 630 640 650 660 670
GAGTACGTCTTTGTTATCCTGCAGCTGCTCTTTGGCTGATGCTCTTCGCCACGGTACTGGGGCACGTGGCCAAC
E Y V F V I L Q L L F G L M L F A T V L G H V A N

680 690 700 710 720 730 740 750
ATTGTGACGTCAGTGAGTGCAGCGCGCAAGGAGTTTCAAGCCAAGCTGGATGGCGTGAAGACGTACATGCGGATG
I V T S V S A A R K E F Q A K L D G V K T Y M R M

760 770 780 790 800 810 820
CGACGTGTGCCGAATCATCTGCAGGTGAAGTCAATGTTTCGATTACCTGTGGCTTACGCAAAAATGCTCG
R R V P N H L Q V K V I K W F D Y L W L T Q K C S

830 840 850 860 870 880 890 900
GACGAGGAGCGCGCGTGTCTTCCCTGATAAATTAAGGCTGAAATAGCAATTAACGTCCATTTAGATACG
D E E R A V S C L P D K L K A E I A I N V H L D T

910 920 930 940 950 960 970
CTCAAGCGGGTGGAGATTTTCCAAAACACAGAGGCCGGCTTCTATGCGAACTGGTGTGCGCCTGAGGCCCGTG
L K R V E I F Q N T E A G F L C E L V L R L R P V

980 990 1000 1010 1020 1030 1040 1050
CTCTTCTCGCCCCGGCGACTACATCTGCAGAAAGGGCGAGGTGGGCAAGGAGATGTACATTGTGAACCGAGGACGA
L F S P G D Y I C R K G E V G K E M Y I V N R G R

1060 1070 1080 1090 1100 1110 1120
TTGCAGGTGGTGGCCGACAATGGAAAGACGGTGTGGCCTCCCTGAAGGCTGGTTCCTATTTTGGCGAGATTAGT
L Q V V A D N G K T V M A S L K A G S Y F G E I S

1130 1140 1150 1160 1170 1180 1190 1200
 ATACTCAATATGGGCACCGCAGGCAACCGACGCACAGCCAGCGTTCGCTCAGTGGGATACAGCGACCTCTTCGTC
 I L N M G T A G N R R T A S V R S V G Y S D L F V

1210 1220 1230 1240 1250 1260 1270
 CTGAGCAAGAAGGACATGTGGGACGTGCTGAAGGAGTATCCGGCGGCGCGTGTTCGCTGGAGTCGATAGCCGTC
 L S K K D M W D V L K E Y P A A R V R L E S I A V

1280 1290 1300 1310 1320 1330 1340 1350
 AAGCGATTGGAGAAATACAAGAAGGCCCGCTGGAGAAAGTCAAAGGCCGCACGTCTCTGGAGGAGATGTGGCTG
 K R L E K Y K K A P L E K V K G R T S L E E M W L

1360 1370 1380 1390 1400 1410 1420
 CCACCGCGACGGCTGGCGCATCATCGCTGATGCACCACCACCAGGCGCTCCAGCAGCAGCATCAGGCATCCCAG
 P P A T A G A S S L M H H H Q A L Q Q Q H Q A S Q

1430 1440 1450 1460 1470 1480 1490 1500
 CAGCAGCCCCATCGACAGGAGTCCACACAAACCTCCTCCCAAACACATGGGTACAGTCCCGCAGCTATGCCGAT
 Q Q P H R Q E S T Q T S S Q T H G Y S P R S Y A D

1510 1520 1530 1540 1550 1560 1570
 CGTTTGGCTCGGGCCACGGACTCACCCAGGTCGGTTAGCCCCAGTGCCCATGGATCCGAGGAACGACCACGTAGT
 R L A R A T D S P R S V S P S A H G S E E R P R S

1580 1590 1600 1610 1620 1630 1640 1650
 CGAACGACTTCGCACCACTCAATAAGGCCACAATCCCAACCCAGCCACACGGGTACATTTGCGACTCCAGTTCG
 R T T S H H S I R P Q S Q P S H T G H I C D S S S

1660 1670 1680 1690 1700 1710 1720
 CAGCTGGAGTGCTATGGAGCGGGTGTGGGTGGAGCTGGTGGTGGAAACCACGCCCCCTCTGGGGCTCCCACGAAGTT
 Q L E C Y G A G V G G A G G G T T P L L G S H E V

1730 1740 1750 1760 1770 1780 1790 1800
 CTCGAGGACGAGATCAAGCGGCTGAGGGAACGCTGCACACGGTGGAAATCAGAGAACCAGGCCCTAAACACAAAA
 L E D E I K R L R E R L H T V E S E N Q A L N T K

1810 1820 1830 1840 1850 1860 1870
 CTCTCGCAGCAGCAGTGGGATCTGGAGAATCGACTAGCCGAGATCGAGATGCAAATCTGCGGAGTTTCGTCGACG
 L S Q Q Q W D L E N R L A E I E M Q I C G V S S T

1880 1890 1900 1910 1920 1930 1940 1950
 TCCAGCGTCGATCCCGAGAATGAGACGGAGGAGCTGGAACGGAACAGAGAGAGAGCAGCAGCAGCTATACAGCAG
 S S V D P E N E T E E L E R N R E R A A A A I Q Q

1960 1970 1980 1990 2000 2010 2020
 CAGGAGGATCGCAAGGATCGGGAGAGGAAGGCTCAAAGAGGAAGACCAATCGAGAGCGCAACGGGATCTCAGTCC
 Q E D R K D R E R K A Q R G R P I E S A T G S Q S

2030 2040
 TGTGCCAAGTACTTCTCGCTTTAG
 C A K Y F S L -

Abb. A5: Nukleinsäure- und abgeleitete Aminosäuresequenz des *Dmcmg4*-Gens.

B Exon/Intron-Übergänge und Aminosäureanzahl ausgewählter Proteinbereiche

Tabelle A1: Exon/Intron-Übergänge der vier *Drosophila* CNG-Kanalgene. Die Grenzen wurden durch Sequenzvergleich der cDNA's mit der genomischen DNA-Sequenz ermittelt.

Dmcnga	Dmcngb	Dmcng3	Dmcng4
A25	K6	W40	Q238
R109	K548	Q85	K289
E163	F598	Q153	E338
G344	L741	M189	G383
A565		R233	K438
M615		Q287	Y493
		E331	T542
		K382	E642
		K516	
		R630	
		Q703	
		M772	
		G1237	
		E1452	

Tabelle A2: Vergleich der Aminosäureanzahl ausgewählter Bereiche der *Drosophila* CNG-Kanaluntereinheiten. Die Aminosäuren vom Startkodon bis zur ersten Transmembranregion S1 (N-terminal), von S1 bis hinter die cNMP-Bindestelle (S1-cNMP-Bindestelle), der C-Termini (C-terminal) sowie die Gesamtlänge der abgeleiteten Aminosäuresequenzen (Gesamtanzahl) sind angegeben.

Gen	N-terminale Aminosäuren	S1 - cNMP-Bindestelle	C-terminale Aminosäuren	Gesamtanzahl Aminosäuren
Dmcnga	106	455	104	665
Dmcngb	464	438	135	1.037
Dmcng3	124	443	896	1.463
Dmcng4	-	436	246	682

C Verwendete Oligonukleotide

Tabelle A3: Sequenzen und Verwendungszwecke der eingesetzten Oligonukleotide. Die Sequenzen aller in dieser Arbeit verwendeten Oligonukleotide sind in 5' ⇒ 3'-Richtung angegeben.

Bezeichnung	Sequenz (5' ⇒ 3')	Verwendung
#594	TCC TAA TCT TCG CCA CC	Oligonukleotid zur Herstellung von <i>Dmcnga</i> -HA
#2503	GGG TTT AAA GTG TGT TCT GTT TGG C	Mutagenese-Oligonukleotid zur Herstellung von <i>Dmcnga</i> -HA
#2694	GCG AAG CTT CCA CCA TGG CAC GTT TTC GGA AGG	Mutagenese-Oligonukleotid zur Herstellung von <i>Dmcngb</i>
#2695	CCC TGG GGA TCC AGG GT	Oligonukleotid zur Herstellung von <i>Dmcngb</i>
#2696	CCT GGA TCC CCA GGG CA	Oligonukleotid zur Herstellung von <i>Dmcngb</i>
#2697	TCC TCC AGC TGG CGA TAC	Oligonukleotid zur Herstellung von <i>Dmcngb</i>
#2699	GCG GAA TTC TTA GAG ATC CAC CAC CTT CA	Mutagenese-Oligonukleotid zur Herstellung von <i>Dmcngb</i>
#2705	TGG AGC CGA TCG CAG AAC	Oligonukleotid zur Herstellung von <i>Dmcngb</i> und <i>Dmcngb</i> -HA
#2751	AGA GTG CTC GAG CAG GAC	Oligonukleotid zur Herstellung von <i>Dmcngb</i>
#2752	TGT CCT GCT CGA GCA CTC	Oligonukleotid zur Herstellung von <i>Dmcngb</i>
#2753	GCG AAA ACT GCA GTT TAA GC	Oligonukleotid zur Herstellung von <i>Dmcngb</i>
#2754	GCT TAA ACT GCA GTT TTC GC	Oligonukleotid zur Herstellung von <i>Dmcngb</i>
#2764	CCA CCT CGA TAT CCA CCA A	Oligonukleotid zur Herstellung von <i>Dmcng3</i> -His
#2968	AGA GAT CCA CCA CCT TCA T	Mutagenese-Oligonukleotid zur Herstellung von <i>Dmcngb</i> -HA
#3034	ACA GGA TCC TCG GAC TTG AGC TCT TTT TTT ATA	Mutagenese-Oligonukleotid zur Herstellung von <i>Dmcng3</i> -His
#3036	TGG GCG GAC CGG GTC	Oligonukleotid zur Herstellung von „ <i>Dmcng3</i> -Datenbank“
#3037	ATC ATC TAG ATC AAA GCT TGT CTT TAT CAC	Mutagenese-Oligonukleotid zur Herstellung von „ <i>Dmcng3</i> -Datenbank“
#3055	AGC AGT GGA TAT CGC GAG T	Oligonukleotid zur Herstellung von „ <i>Dmcng3</i> -Datenbank“
#3056	ACT CGC GAT ATC CAC TGC T	Oligonukleotid zur Herstellung von „ <i>Dmcng3</i> -Datenbank“
#9001	AAT TAA CCC TCA CTA AAG GG	T3-Oligonukleotid zur Sequenzierung von pBluescript SK
#9002	TAA TAC GAC TCA CTA TAG GG	T7-Oligonukleotid zur Sequenzierung von pBluescript SK und pcDNA1.1/Amp
#9006	AGC ATT TAG GTG ACA CTA TAG	SP6-Oligonukleotid zur Sequenzierung von pcDNA1.1/Amp

Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde am Institut für Biologische Informationsverarbeitung (IBI 1) der Forschungszentrum Jülich GmbH angefertigt. Ich danke allen Mitarbeitern und Mitarbeiterinnen für deren Unterstützung und die gute Zusammenarbeit. Mein besonderer Dank gilt

Herrn Prof. Dr. U. Benjamin Kaupp für die freundliche Aufnahme in das Institut, die guten Arbeitsbedingungen und seine Diskussionsbereitschaft,

Herrn PD Dr. Arnd Baumann für die Überlassung des Themas, die sehr gute Betreuung und Förderung meiner Arbeit sowie die hilfreichen Tipps und zahlreichen Diskussionen,

Frau Sabine Balfanz für ihre Unterstützung im Laboralltag, die angenehme Arbeitsatmosphäre und ihren Optimismus,

Herrn Dr. Frank Müller für die Ratschläge bezüglich immunzyto- und immunhistochemischer Färbungen sowie die Einführung in die konfokale Fluoreszenzmikroskopie,

Herrn Dr. Wolfgang Bönigk und Herrn Steffen Meurer für die Unterstützung bei molekularbiologischen Fragen,

Frau Dr. Renate Gauss für die Überlassung des Hämagglutinin A Vektors,

Herrn PD Dr. Stephan Frings für die Einweisung in die Ca^{2+} -Imaging-Apparatur, die Durchführung der elektrophysiologischen Messungen und Überlassung dieser Daten,

Frau Mechthilde Bruns für die Unterstützung im Zellkulturlabor,

Herrn Rudolf Esser für die unkomplizierte Hilfe bei allen organisatorischen Fragen,

Herrn Dr. Alexander Scholten für die konstruktiven Anmerkungen zum Manuskript,

und meinen Kodoktoranden für die reibungslose Integration in die Arbeitsgruppe.

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

Mein besonderer Dank gilt meiner Familie, die mich in allen Phasen dieser Arbeit tatkräftig unterstützt hat.

Außerdem danke ich

Herrn Prof. Dr. Masahiro Sokabe (Nagoya University School of Medicine, Japan) für die Überlassung des cDNA-Klons *Dmcng3*,

Herrn Dr. Klemens Störtkuhl (Ruhr-Universität Bochum) für die Einführung in die Immunhistochemie an Gewebeschnitten von *Drosophila melanogaster* und die Überlassung des weißäugigen Fliegenstamms *w1118*

sowie Herrn Dr. Armin Huber (Universität Karlsruhe) für die Überlassung des α -Opsin-Antikörpers und weiterführender Präparationsvorschriften.

Forschungszentrum Jülich
in der Helmholtz-Gemeinschaft



Jü1-3997
Juli 2002
ISSN 0944-2952