

JOHANNES GUTENBERG
UNIVERSITÄT MAINZ



Eine zellspezifische Hypothese zum Tyramin-Abbau
im Nervensystem von *Drosophila melanogaster*

Dissertation

zur Erlangung des Grades

Doktor der Naturwissenschaften

am Fachbereich Biologie

der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

Andres de Visser

geb. in Seeheim-Jugenheim

Mainz, November 2016

Dekan:

1. Gutachter:

2. Gutachter:

Datum der mündlichen Prüfung: 16.12.2016

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis.....	IV
Tabellenverzeichnis.....	V
1 Einleitung.....	1
1.1 Entwicklung und Nomenklatur der Gliazellen von <i>Drosophila</i>	1
1.2 Verhalten von <i>Drosophila</i> -Larven.....	3
1.3 Das motorische System von <i>Drosophila</i> -Larven.....	4
1.4 Das Octopamin-Tyramin-System.....	5
1.5 Ziel der Arbeit.....	6
2 Material und Methoden.....	8
2.1 Fliegenzucht.....	8
2.1.2 Kreuzungen.....	8
2.1.3 Eiablagen.....	8
2.1.4 Balancieren von Mutationen.....	8
2.1.5 Das UAS/GAL4 System.....	9
2.1.6 Verwendete Fliegenstämme.....	10
2.2 Verhaltensversuche.....	10
2.2.1 Versuchsaufbau zur Beobachtung des Explorationsverhaltens von L3-Larven.....	11
2.2.2 Durchführung der Verhaltensversuche.....	11
2.2.3 Videobearbeitung und Auswertung.....	12
2.2.4 Statistische Auswertung.....	13
2.3 Fluoreszenz-Immunhistochemie.....	13
2.3.1 Fluoreszenzfärbung von Embryonen.....	14
2.3.2 Fluoreszenzfärbung von larvalen Zentralnervensystemen.....	14
2.3.3 Nachweis von Tyramin im zentralen Nervensystem von L3-Larven.....	15
2.3.4 Nachweis von Tyramin in S2R+-Zellen.....	16
2.3.5 Dokumentation von Fluoreszenzfärbungen.....	16
2.4 Molekularbiologische Methoden.....	17
2.4.1 Präparation genomischer DNA.....	17
2.4.2 Präparation von Plasmid-DNA.....	17
2.4.3 Präparation von total-RNA.....	18
2.4.3 Polymerase-Kettenreaktion.....	18
2.4.4 Agarose-Gelelektrophorese.....	23
2.4.5 Klonierungen von DNA-Fragmenten in Plasmide.....	23
2.4.6 Transformation chemisch-kompetenter <i>E. coli</i> -Zellen.....	23

2.4.7 Herstellung des Eaat1-Expressionsvektors.....	24
2.4.8 Zellkultur.....	25
3 Ergebnisse.....	27
3.1 Expression des Nazgul-Proteins.....	27
3.1.1 Expression des Nazgul-Proteins im wildtypischen embryonalen VNS	27
3.1.2 Expression des Nazgul-Proteins im wildtypischen larvalen VNS.....	29
3.1.3 Nazgul-Expression in den Gehirnhemisphären wildtypischer L3-Larven	31
3.1.4 Nazgul wird auch in wenigen nicht-glialen Zellen exprimiert	34
3.2 Untersuchung von <i>nazgul</i> -Exzisionsmutanten	36
3.2.1 Nazgul-Expression der <i>nazgul</i> -Exzisionsmutanten.....	36
3.2.2 Kartierung der <i>nazgul</i> -Exzisionsmutationen	38
3.2.3 Verhaltensversuche mit <i>nazgul</i> -Mutanten	40
3.2.4 Mutationen im <i>nazgul</i> -Lokus führen zu erhöhten Richtungsänderungsraten.....	40
3.2.5 Transheterozygote <i>nazgul</i> -Mutanten zeigen ein verändertes Explorationsverhalten	46
3.3 <i>nazgul</i> -RNAi-Versuche.....	48
3.3.2 Überprüfung des KK-RNAi-Konstrukt-Insertionsortes.....	51
3.4 Nazgul ist am Tyramin-Metabolismus beteiligt.....	52
3.4.1 Astrozyten ähnliche Glia sind Tyramin-positiv	54
3.5 Pharmakologische Eingriffe in den Tyramin-Metabolismus	57
3.5.1 Yohimbin rettet das veränderte Explorationsverhalten von <i>nazgul</i> -RNAi-Tieren und Exzisionsmutanten	57
3.5.2 Fütterung von Tyramin kann erhöhte Richtungsänderungsraten verursachen.....	62
3.5.3 Tranylcypromin kann erhöhte Richtungsänderungsraten verursachen.....	64
3.6 RNAi-Screen zur Identifizierung potentieller Tyramin-Transporter	65
3.6.1 Versuchter Nachweis des Tyramin-Transports durch Eaat1	69
4 Diskussion	71
4.1 Mutationen im <i>nazgul</i> -Lokus führen zu Verhaltensphänotypen	71
4.2 Die beobachteten Verhaltensphänotypen sind auf gliaspezifischen Funktionsverlust von Nazgul in ALGs zurückzuführen.....	72
4.3 Nazgul ist am Tyramin-Abbau beteiligt	73
4.4 Eaat1 als potentieller Tyramin-Transporter	75
4.5 Argumente für einen Tyramin-Abbau unter Beteiligung einer Monoaminoxidase	78
4.6 Die molekulare Funktion von Nazgul bleibt unklar	79
5 Zusammenfassung.....	81
6 Literaturverzeichnis.....	82
7 Anhang.....	90
7.1 Abkürzungsverzeichnis	90

7.1.1 Allgemeine Abkürzungen	90
7.1.2 Namen und Abkürzungen der Gene	91
7.2 Verwendete Lösungen.....	92
7.3 Geräteliste	94
7.4 Verhalten der <i>nazgul</i> -Exzisionsmutanten auf Apfelsaftagar.....	95
7.5 Statistische Datentafeln	96
7.6 Sequenzierungen.....	124
7.6.1 Sequenzierung der <i>nazgul</i> ^{Δ1-17} mRNA	124
7.6.2 Sequenzierung 1 der <i>nazgul</i> ^{Δ2-11} mRNA	126
7.6.3 Sequenzierung 2 der <i>nazgul</i> ^{Δ2-11} mRNA	127
7.6.4 Sequenzierung des P-Element Exzisions-Lokus in <i>nazgul</i> ^{Δ1-17}	129
7.6.5 Sequenzierung des P-Element Exzisions-Lokus in <i>nazgul</i> ^{Δ1-36}	130
7.6.6 Sequenzierung des P-Element Exzisions-Lokus in <i>nazgul</i> ^{Δ2-11}	131
7.7 Eidesstattliche Erklärung	132

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Nazgul-Expression im embryonalen VNS wildtypischer Tiere	28
Abbildung 2: Nazgul-Expression im VNS wildtypischer Larven des dritten Larvenstadiums.....	30
Abbildung 3: Nazgul-Expression in den Gehirnhemisphären wildtypischer L3-Larven	32
Abbildung 4: Nazgul-Expression in Neuropil-assoziierten Glia des Zentralhirns.....	33
Abbildung 5: Nazgul-Expression im optischen Lobus wildtypischer L3-Larven	34
Abbildung 6: Nazgul-Expression in Repo-negativen Zellen	35
Abbildung 7: Expression des Nazgul Proteins im VNS der untersuchten Exzisionsmutanten	37
Abbildung 8: Molekulargenetische Untersuchung der nazgul-Mutanten.....	39
Abbildung 9: Bewegungsmuster von wildtypischen und nazgul ^{Δ1-36} -mutanten Tieren.....	41
Abbildung 10: Statistischer Vergleich von WT- und nazgul ^{Δ1-36} -Tieren.....	42
Abbildung 11: Pfadmorphologie der untersuchten nazgul-Mutanten.....	43
Abbildung 12: Richtungsänderungsraten der nazgul-Mutanten im Vergleich zum WT	45
Abbildung 13: Transheterozygoten nazgul-Mutanten zeigen einen verminderten Phänotyp	47
Abbildung 14: Verhalten von nazgul-RNAi-Tieren	49
Abbildung 15: Statistische Auswertung der nazgul-RNAi-Versuche.....	50
Abbildung 16: Insertionspunkt-Überprüfung des VDRC-KK-RNAi-Konstrukts.....	51
Abbildung 17: Hypothetischer Tyramin-Abbauweg	53
Abbildung 18: Tyramin-positive Zellen im wildtypischen ZNS	55
Abbildung 19: Astrozyten ähnliche Glia sind Tyramin-positiv.....	56
Abbildung 20: Yohimbin erhöht die Richtungsänderungsrate wildtypischer Tiere.....	58
Abbildung 21: Yohimbin unterdrückt den Verhaltensphänotyp der nazgul-RNAi	59
Abbildung 22: Statistische Auswertung des Yohimbin-Verhaltensversuchs.....	60
Abbildung 23: Yohimbin rettet den Phänotyp der nazgul ^{Δ1-36} -Mutante.....	61
Abbildung 24: Fütterung von Tyramin erhöht die Richtungsänderungsrate	63
Abbildung 25: Tranylcypromin kann erhöhte Richtungsänderungsraten verursachen.....	65
Abbildung 26: Ergebnisse des Tyramin-Transporter-RNAi-Screens	67
Abbildung 27: Der Eaat1-RNAi-Phänotyp ist durch Applikation von Yohimbin unterdrückbar... 68	
Abbildung 28: Versuchter Nachweis des Tyramin-Transports durch Eaat1	70
Abbildung 29: Verhalten der nazgul-Exzisionsmutanten auf Apfelsaftagar	95

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Verwendete Fliegenstämme.....	10
Tabelle 2 : Verwendete Primäre-Antikörper.....	13
Tabelle 3: Primer zur Amplifikation der P-Element-Insertion.....	20
Tabelle 4: Verwendete Primer Multiplex-PCR.....	21
Tabelle 5: Verwendete Primer naz-RT-PCR.....	22
Tabelle 6: Verwendete Primer der Eaat1-Aplifikation.....	24
Tabelle 7: Kandidaten des Tyramin-Transporter-RNAi-Screens.....	66
Tabelle 8: Frequenzanalyse Richtungsänderungen.....	96
Tabelle 9: Richtungsänderungsraten WT.....	96
Tabelle 10: Richtungsänderungsraten WT auf Apfelsaftagar.....	98
Tabelle 11: Richtungsänderungsraten nazgul ^{Δ1-36}	101
Tabelle 12: Richtungsänderungsraten nazgul ^{Δ1-36} auf Apfelsaftagar.....	103
Tabelle 13: Richtungsänderungsraten nazgul ^{Δ1-17}	104
Tabelle 14: Richtungsänderungsraten nazgul ^{Δ1-17} auf Apfelsaftagar.....	105
Tabelle 15: Richtungsänderungsraten nazgul ^{Δ2-11}	105
Tabelle 16: Richtungsänderungsraten nazgul ^{Δ2-11} auf Apfelsaftagar.....	106
Tabelle 17: Richtungsänderungsraten P-Element Insertion.....	106
Tabelle 18: Richtungsänderungsraten Df(3R)EXEL6178/nazgul ^{Δ1-36}	107
Tabelle 19: Richtungsänderungsraten naz-RNAi VDRC.....	108
Tabelle 20: Richtungsänderungsraten naz-RNAi TRiP.....	108
Tabelle 21: Richtungsänderungsraten heterozygote naz-RNAi VDRC Kontrolle.....	109
Tabelle 22: Richtungsänderungsraten heterozygote naz-RNAi TRiP Kontrolle.....	110
Tabelle 23: Richtungsänderungsraten heterozygote dicer; repo-GAL4-Treiber Kontrolle.....	111
Tabelle 24: Richtungsänderungsraten WT nach 2h auf Instant Futtermedium.....	112
Tabelle 25: Richtungsänderungsraten WT 0,5mg/ml Yohimbin.....	112
Tabelle 26: Richtungsänderungsraten WT 1,0mg/ml Yohimbin.....	113
Tabelle 27: Richtungsänderungsraten WT 1,5mg/ml Yohimbin.....	113
Tabelle 28: Richtungsänderungsraten WT 3,0mg/ml Yohimbin.....	114
Tabelle 29: Richtungsänderungsraten naz-RNAi TRiP 0,5mg/ml Yohimbin.....	114
Tabelle 30: Richtungsänderungsraten nazgul ^{Δ1-36} 0,5mg/ml Yohimbin.....	115
Tabelle 31: Richtungsänderungsraten WT 4mg/ml Tyramin.....	115
Tabelle 32: Richtungsänderungsraten WT 0,1mg/ml Tranylcypromin.....	116
Tabelle 33: Richtungsänderungsraten WT 0,5mg/ml Tranylcypromin.....	116
Tabelle 34: Richtungsänderungsraten WT 1,0mg/ml Tranylcypromin.....	117
Tabelle 35: Richtungsänderungsraten WT 2,0mg/ml Tranylcypromin.....	117
Tabelle 36: Richtungsänderungsraten Eaat1-RNAi.....	118
Tabelle 37: Richtungsänderungsraten heterozygote Eaat1-RNAi Kontrolle.....	118
Tabelle 38: Richtungsänderungsraten heterozygote Eaat1-GAL4 Kontrolle.....	119
Tabelle 39: Richtungsänderungsraten Eaat2-RNAi.....	119
Tabelle 40: Richtungsänderungsraten hoe2-RNAi.....	120
Tabelle 41:: Richtungsänderungsraten CG5549-RNAi.....	120
Tabelle 42: Richtungsänderungsraten CG7708-RNAi.....	121
Tabelle 43: Richtungsänderungsraten Eaat1-RNAi 0,5mg/ml Yohimbin.....	121
Tabelle 44: Stop Turns.....	123

1 Einleitung

Das Nervensystem (NS) bildet die Grundlage unserer Wahrnehmung der Umwelt und unseres Verhaltens. Die Funktionsweise dieses komplexen Organs zu ergründen, hat schon viele Generationen von Wissenschaftlern fasziniert. Dementsprechend werden seit geraumer Zeit große Anstrengungen unternommen, um die Entstehung und Funktion des NS zu erforschen.

In diesem Kontext hat sich die Taufliege *Drosophila melanogaster* (im Folgenden als *Drosophila* bezeichnet) als nützlicher Modellorganismus erwiesen. *Drosophila* ist leicht unter Laborbedingungen zu halten und experimentell sehr gut zugänglich. Diese Umstände haben dazu geführt, dass *Drosophila* einen der am besten untersuchten Organismen überhaupt darstellt. Das Genom von *Drosophila* ist seit dem Jahr 2000 komplett sequenziert und für jedermann im Internet zugänglich (Adams *et al.*, 2000). Zudem existiert eine Vielzahl von Mutanten sowie genetischer und molekularbiologischer Werkzeuge, die experimentelle Manipulationen stark vereinfachen.

Das NS von *Drosophila* setzt sich aus zwei grundlegend verschiedenen Zellpopulationen zusammen: den Neuronen und den Gliazellen. Die Neurone bilden komplexe Netzwerke und sind für die Verarbeitung und Weiterleitung von Informationen im NS zuständig. Den Gliazellen wurde lange Zeit lediglich eine Stütz- und Haltefunktion zugeschrieben. Dies spiegelt sich auch in dem, von Rudolf Virchow, dem Entdecker der Gliazellen, gewählten Namen „Neuroglia“ (Nervenkitt) wieder. Diese Annahme war nicht korrekt, denn inzwischen sind diverse für die Entwicklung und Funktion des NS unerlässliche Funktionen von Gliazellen bekannt. So sind Gliazellen während der Entwicklung des NS an der axonalen Wegfindung und Bildung von Synapsen beteiligt (Nassif *et al.*, 1998; Mauch *et al.*, 2001), sie bilden die Bluthirnschranke und halten so die Erregbarkeit der Neurone aufrecht (Auld *et al.*, 1995). Gliazellen sind für die korrekte Funktion des NS unerlässlich und übernehmen neben den hier erwähnten noch viele weitere Funktionen. Diese Arbeit beschäftigt sich mit dem Beitrag der Gliazellen zum Tyramin-Metabolismus im zentralen Nervensystem (ZNS) der Larven von *Drosophila*.

1.1 Entwicklung und Nomenklatur der Gliazellen von *Drosophila*

Im ZNS von *Drosophila* ist das initiale Schicksal der von Neuroblasten (NBs) generierten Zellen das eines Neurons. Dieses Schicksal muss durch eine Änderung des genetischen Programms der Zelle unterdrückt werden, um die Bildung von Gliazellen auszulösen. Dafür ist die Aktivität verschiedener Transkriptionsfaktoren verantwortlich, die nach ihrer Aktivierung dafür sorgen, dass die Zelle ein gliales Schicksal annimmt. Im NS von *Drosophila* unterscheidet man zwischen zwei Populationen von Gliazellen: den lateralen Glia (im Folgenden als Glia bezeichnet) und den Mittellinienglia. Während die Glia von den, aus dem Ektoderm delaminierten NBs gebildet werden

(Doe & Technau, 1993; Bossing *et al.*, 1996), sind die Mittellinienglia mesectodermalen Ursprungs (Bossing & Technau, 1994).

Die Glia des embryonalen ZNS werden von unterschiedlichen NBs gebildet und lassen sich aufgrund ihrer Lage im ZNS sowie der Expression bestimmter genetischer Marker in mehrere Klassen untergliedern (Ito *et al.*, 1995; Schmidt *et al.*, 1997; Beckervordersandforth *et al.*, 2008). Grundsätzlich unterscheidet man zwischen drei Klassen von Glia, die ihrerseits in mehrere Unterklassen eingeteilt werden können. Die oberflächenassoziierten Glia werden in superineural- und *channel*-Glia untergliedert. Die Klasse der cortexassoziierten Glia beinhaltet lediglich die sogenannten *cell body*-Glia. Die neuropilassoziierten Glia werden in die *segmental nervroot* Glia, die *intersegmental nerveroot* Glia, die *interface* Glia und die *midline* Glia untergliedert. Zur weitergehenden Unterscheidung der embryonalen Zellen wird in dieser Arbeit die Nomenklatur nach Beckervordersandforth *et al.* (2008) verwendet.

Die in dieser Arbeit betrachteten longitudinal Glia (LG) stammen alle von einer als lateraler Glioblast bezeichneten Stammzelle ab. Entsprechend ihrer Lage entlang der anterior-posterior Achse sowie der Expression verschiedener genetischer Marker, werden sie in den, aus vier Zellen bestehenden, anterioren (A) Cluster, den, aus zwei Zellen bestehenden, medialen (M) Cluster, den ebenfalls zwei Zellen umfassenden posterioren (P) Cluster sowie eine neunte als lateral-posteriore LG (LP-LG) bezeichnete Zelle unterteilt (Beckervordersandforth *et al.*, 2008). Die sechs Zellen des A- und M-Cluster, differenzieren sich in der Larve zu Astrozyten-ähnlichen Glia (ALG) (Peco *et al.*, 2016). Diese Zellen befinden sich an den Grenzen des Neuropils und senden weit verzweigte Fortsätze in dieses hinein (Doherty *et al.*, 2009). Die zwei Zellen des P-Cluster bilden *ensheathing* Glia. Diese Zellen sind eher flach und umschließen das Neuropil (Doherty *et al.*, 2009). Die LP-LG zeigt Eigenschaften sowohl von *ensheathing* als auch von *wrapping* Glia, da sie Teile des dorsalen Neuropils sowie proximale Teile des Intersegmental-Nervs abdeckt (Peco *et al.*, 2016). Das grundlegende „Schaltergen“ für die Entwicklung der Glia ist *glia cells missing* (*gcm*). Der Ausfall von *Gcm* führt zum Verlust aller Glia des zentralen und peripheren NS (PNS) (Jones *et al.*, 1995; Hosoya *et al.*, 1995; Vincent *et al.*, 1996). *Gcm* aktiviert entweder direkt oder indirekt eine große Anzahl weiterer Gene, die dafür sorgen, dass das initiale neuronale Schicksal der Zelle unterdrückt und für die Differenzierung und Funktion der Glia wichtige Gene aktiviert werden. Prominente Beispiele für diesen Prozess sind die Transkriptionsfaktoren Reverse polarity (*Repo*), Pointed (*Pnt*) und Tramtrack (*Ttk*). *Repo* und *Pnt* aktivieren im Zusammenspiel mit *Gcm* weitere, für die Differenzierung der Glia wichtige Gene wie zum Beispiel *locomotion defects* (Klaes *et al.*, 1994; Halter *et al.*, 1995; Granderath *et al.*, 1999; Granderath *et al.*, 2000). *Ttk* wiederum inhibiert im Zusammenspiel mit *Repo* neuronale Gene und unterdrückt das initiale neuronale Schicksal der Zelle (Xiong & Montell, 1993; Giesen *et al.*, 1997; Badenhorst, 2001; Yuasa *et al.*, 2003).

Die hier beschriebenen Faktoren können hinsichtlich der morphologischen und biochemischen Vielfalt der Glia nur den Anfang einer mit Sicherheit wesentlich komplexeren

Determinationskaskade bilden. Um weitere, an der Differenzierung von Gliazellen beteiligte Gene zu identifizieren, wurden bereits mehrere genomweite *Screens* nach Gcm-Zielgenen durchgeführt (Egger *et al.*, 2002; Freeman *et al.*, 2003; Altenhein *et al.*, 2006). Diese konnten zeigen, dass sowohl Transkriptionsfaktoren als auch viele für die spätere Funktion der Zelle wichtige Gene von Gcm aktiviert werden. Welche Faktoren benötigt werden, um die Differenzierung bestimmter Glia auszulösen, ist für die meisten Glia-Typen noch weitgehend unbekannt. In jüngster Zeit konnten allerdings bezüglich der Entwicklung von ALGs Fortschritte erzielt werden. Es konnte gezeigt werden, dass ALGs durch das Zusammenspiel von Notch und Pnt spezifiziert werden. Diese beiden aktivieren wiederum *prospero* (*pros*), was die Zellen dann veranlasst, sich als ALG zu differenzieren. *Pros* ist für die Differenzierung als ALG hinreichend und notwendig und nimmt damit für die Annahme des ALG-Schicksals eine Schlüsselposition ein (Peco *et al.*, 2016).

1.2 Verhalten von *Drosophila*-Larven

Drosophila-Larven sind trotz ihres relativ einfachen NS bereits fähig, recht komplexe Verhaltensmuster auszuführen. Sofern Futter vorhanden ist, ist die Nahrungsaufnahme das am häufigsten zu beobachtende Verhalten (Green *et al.*, 1983). Zudem sind die Tiere fähig, sich zielgerichtet in ihrer Umwelt zu bewegen. *Drosophila*-Larven bewegen sich, ihrer wurmartigen Körperform entsprechend, kriechend fort. Vorwärts sowie rückwärts gerichtete Fortbewegung wird dabei durch peristaltische Kontraktionswellen realisiert, die entlang der anterior-posterior Achse über die abdominalen Segmente der Tiere laufen. Im Fall einer Vorwärtsbewegung beginnt die Kontraktionswelle mit der simultanen Kontraktion der beiden posterioren Segmente A8/9. Parallel dazu werden die thorakalen und Kopf-Segmente nach vorne gestreckt und mit den Mundwerkzeugen im Substrat verankert. In der Folge werden die Segmente A7-A1 nacheinander angehoben und etwas weiter vorne wieder abgesetzt. Die vor allem auf der Unterseite der abdominalen Segmente vorhandenen Dentikel unterstützen dabei die Haftung am Substrat. Bewegen sich die Tiere rückwärts, läuft die Kontraktionswelle in die entgegengesetzte Richtung von A1-A8/9. In regelmäßigen Abständen unterbrechen die Tiere die Fortbewegung und führen laterale Kopfbewegungen aus, die oftmals zu einer Richtungsänderung der anschließenden Bewegung führen (Green *et al.*, 1983; Dixit *et al.*, 2008). Aufgrund dieses stereotypen Verhaltensmusters weisen die Pfade der Tiere meist eine sehr ähnliche Morphologie auf. Die Tiere sind auch in der Lage die Kopf- und Thorax-Segmente vom Substrat abzuheben und zu einer Seite fallen zu lassen. Dieses als *rearing* bezeichnete Verhalten kann beobachtet werden, wenn die Tiere plötzlich auf unwirtliche Verhältnisse, wie zum Beispiel trockenen Untergrund, stoßen (Benz, 1956). Die Tiere können auch seitwärts gerichtete Rollbewegungen ausführen. Diese werden durch starke Temperatur- oder Druckreize ausgelöst. Es konnte gezeigt werden, dass diese Rollbewegung der Verteidigung gegen parasitäre Wespen wie z. B. *Leptopilina boulardi* dient.

Diese Wespen durchstoßen die Körperwand der Larven mit ihrem Ovipositor, um Eier in den Tieren abzulegen. Die *Drosophila*-Larve dient in der Folge den Larven der Wespe als Nahrung. Durch die Rollbewegung sind die *Drosophila*-Larven in der Lage, den Ovipositor um ihren Körper zu wickeln, was die Wespe auf den Rücken wirft und somit zwingt den Angriff abubrechen. Dies erklärt auch die zunächst erstaunliche Tatsache, dass die Rollbewegung immer zum Reiz hin, ausgeführt wird (Hwang *et al.*, 2007).

Die Entwicklung koordinierter Bewegungen beginnt (bei 25 °C) etwa 14 Stunden nach der Eiablage im embryonalen Stadium 16 (Crisp *et al.*, 2008). Zu diesem Zeitpunkt können erste kurze Muskelkontraktionen in einzelnen Hemisegmenten (HS) beobachtet werden. Diese sind myogenen Ursprungs, da die meisten Neurone zu diesem Zeitpunkt noch nicht in der Lage sind, Aktionspotentiale zu generieren (Baines & Bate, 1998). Mit fortlaufender Entwicklung des Embryos werden diese lokalen Kontraktionen immer stärker. Erste unter neuronaler Kontrolle stehende Bewegungen treten etwa 17 Stunden nach der Eiablage auf. Die Tiere zeigen nun periodisch wiederkehrend Häufungen kurzer Kontraktionen, die mit der Zeit in Kontraktionswellen übergehen. Das Auftreten dieser Kontraktionswellen kann durch pan-neuronale Expression von Tetanus-Toxin unterbunden werden (Crisp *et al.*, 2008). Vollständige Kontraktionswellen treten etwa 18 Stunden nach der Eiablage zum ersten Mal auf. Diese laufen zuerst vom posterioren zum anterioren Ende des Embryos und kurze Zeit danach auch in die entgegengesetzte Richtung (Crisp *et al.*, 2008). Kurz nach Auftreten ausgereifter Kontraktionswellen sind die Embryonen in der Lage, auf Berührungen zu reagieren. Etwa 20 Stunden nach der Eiablage sind die Tiere schließlich in der Lage sich selbst auf die ventrale Seite zurückzurollen, wenn sie auf die dorsale Seite gedreht wurden (Pereanu *et al.*, 2007; Crisp *et al.*, 2008). Nach 21-22 Stunden Embryonalentwicklung schlüpfen die Tiere und sind zu allen larvalen Verhaltensmustern befähigt.

1.3 Das motorische System von *Drosophila*-Larven

Die Fähigkeit zur Bewegung ist für die meisten Tiere von essentieller Bedeutung. Sie bildet die Grundlage des Nahrungserwerbs sowie der Vermeidung unwirtlicher Umwelteinflüsse. Den Larven von *Drosophila* steht dazu ein bereits recht umfangreiches System von Muskeln zur Verfügung, das sie in die Lage versetzt, auch komplexere Verhaltensweisen auszuführen.

Die larvale Muskulatur besteht aus 24-30 Muskeln pro HS. Die Muskulatur der Segmente A2-A7 ist gleichförmig organisiert und besteht aus 30 Muskeln pro HS. Die Muskulatur der thorakalen Segmente sowie der Segmente A1 und A8 zeigt eine abweichende Organisation (Hooper, 1986). Als Gegenspieler der Muskulatur dient die Cuticula, die als Exoskelett fungiert. Die Muskeln werden jeweils von einem oder mehreren Motoneuronen innerviert, deren Zellkörper im ventralen Nervensystem (VNS) lokalisiert sind. Außerdem erhalten einige Muskeln

modulatorische Eingänge von den sogenannten *ventral unpaired medial* (VUM) Neuronen (Landgraf *et al.*, 1997).

Die Axone der Motoneurone bilden Faszikel und verlassen das VNS über die drei in jedem HS vorhandenen Nervenbündel. Über diese, als segmentaler Nerv (SN), intersegmentaler Nerv (ISN) und transversaler Nerv (TN) bezeichneten, Nervenbündel erreichen sie ihre Zielmuskeln im Muskelfeld. Motoneurone, die die inneren segmentüberspannenden Muskeln innervieren, benutzen dazu den ISN während Motoneurone, die transversal orientierte Muskeln innervieren, über den SN und den TN projizieren (Landgraf *et al.*, 1997; Schmid *et al.*, 1999). Die Motoneurone erhalten über ihre, im dorsalen Bereich des Neuropils lokalisierten Dendriten, Eingänge von vorgeschalteten Interneuronen (Landgraf *et al.*, 2003). Diese Interneurone bilden mit großer Wahrscheinlichkeit die zentralen Mustergeneratoren (ZMG) für die Lokomotion und das Explorationsverhalten der Larve. Der genaue Aufbau der ZMGs der *Drosophila*-Larve ist bisher noch nicht bekannt. Es konnte aber bereits gezeigt werden, dass das Explorationsverhalten der Tiere ohne Beteiligung der Hirnloben und des Unterschlundganglions durchgeführt wird (Berni *et al.*, 2012). Die neuronalen Netzwerke, die diesem Verhalten zugrunde liegen, müssen demnach in den thorakalen und abdominalen Segmenten des VNS der Tiere lokalisiert sein. Die ZMGs für geradlinige Fortbewegung konnten in den abdominalen Segmenten des VNS lokalisiert werden. Die für seitliche Beugungen verantwortlichen ZMGs liegen in den thorakalen Segmenten (Berni, 2015). Die Aktivität der ZMGs wird durch sensorische Eingänge aus dem PNS unterstützt (Hughes & Thomas, 2007). Ohne diese Eingänge kommt es zu Veränderungen der Pfadmorphologie sowie zu einer starken Verlangsamung der Kontraktionswellen (Caldwell *et al.*, 2003; Song *et al.*, 2007). Auch ein Einfluss der Neuromodulatoren Octopamin (OA) und Tyramin (TA) auf die ZMGs konnte bereits nachgewiesen werden (Saraswati *et al.*, 2004; Fox *et al.*, 2006; Selcho *et al.*, 2012).

1.4 Das Octopamin-Tyramin-System

Das OA-TA-System ist ein, zum Adrenalin-Noradrenalin-System der Vertebraten äquivalentes, modulatorisches System der Insekten. Wie auch in Vertebraten wirkt es auf eine Vielzahl von Organen und Verhaltensmuster ein, um den Tieren zu ermöglichen, auf verschiedene Situationen zu reagieren. So ist OA in Insekten mit für die Auslösung der *fight or flight*-Reaktion verantwortlich (Adamo *et al.*, 1995). OA erhöht den Muskeltonus während TA diesen erniedrigt (Nagaya *et al.*, 2002; Ormerod *et al.*, 2013). Auch Einflüsse von OA und TA auf das Lokomotions- und Aggressionsverhalten konnten bereits gezeigt werden (Saraswati *et al.*, 2004; Selcho *et al.*, 2012; Rohrscheib *et al.*, 2015).

In *Drosophila* werden OA und TA von einer relativ geringen Anzahl von Neuronen produziert, die jedoch weit verzweigt sind und in so gut wie alle Bereiche des ZNS und PNS projizieren (Monastirioti *et al.*, 1995; Nagaya *et al.*, 2002; Selcho *et al.*, 2012; Selcho *et al.*, 2014).

Als Ausgangsstoff dient die Aminosäure Tyrosin. Tyrosin wird von der Tyrosin-Decarboxylase (Tdc2) zu TA umgesetzt. TA wiederum dient zum einen selbst als Transmitter, dient aber auch als Substrat der Tyramin- β -Hydroxylase (T β h), welche TA zu OA umsetzt. Aufgrund dieser Synthesekette wurde TA lange Zeit nur als Zwischenprodukt und nicht als eigenständiger Neurotransmitter angesehen. Diese Einschätzung musste allerdings revidiert werden, nachdem Neurorezeptoren mit höherer Affinität zu TA als zu OA sowie Neurone, die lediglich TA- aber keine OA-Immunreaktivität aufweisen, identifiziert wurden (Saudou *et al.*, 1990; Nagaya *et al.*, 2002; Cazzamali *et al.*, 2005). Inzwischen gilt auch TA als eigenständiger Neurotransmitter.

1.5 Ziel der Arbeit

Ziel dieser Arbeit war es herauszufinden, welche Rolle die Dehydrogenase/Reduktase CG31235 (in der Folge als Nazgul bezeichnet) im NS von *Drosophila* spielt. Nazgul (Naz) wurde in zwei unabhängigen *screens* nach Gcm-Zielgenen als gliaspezifisch reguliertes Enzym identifiziert (Freeman *et al.*, 2003; Altenhein *et al.*, 2006). Erste Expressionsanalysen zeigten, dass Naz im Embryo ein sehr spezifisches, auf longitudinale Glia beschränktes, Expressionsmuster aufweist (Freeman *et al.*, 2003). Die Aufklärung der Funktion von Naz versprach somit, tiefere Einblicke in die Funktion dieser Zellpopulation zu ermöglichen.

Die Gensequenz von Naz ist auf dem rechten Arm des dritten Chromosoms im Bereich 92A2 lokalisiert. Das Gen umfasst 12,8 kb und gliedert sich in fünf Exons und vier Introns. Aus dieser Sequenz werden zwei Transkripte mit 1564 bp und 2494 bp gebildet, die sich jedoch nur in der Länge der 3'-untranslatierten Region unterscheiden. Das Protein umfasst 406 Aminosäuren. Es existieren bislang keine experimentellen Daten über die Funktion dieses Enzyms.

Aufgrund der auf LGs beschränkten Expression von Naz wurde die Hypothese aufgestellt, dass Naz am Neurotransmitter-Metabolismus beteiligt sein könnte. Eine Subpopulation der LGs, die ALGs, wurden bereits mit dem Neurotransmitter-Metabolismus in Verbindung gebracht. Diese exprimieren den Glutamat-Transporter Eaat1 (Rival *et al.*, 2004; Stacey *et al.*, 2010) sowie das für den Glutamat-Abbau wichtige Enzym Glutamin-Synthetase 2 (Freeman *et al.*, 2003). Sollte die Hypothese einer Beteiligung von Naz am Neurotransmitter-Metabolismus zutreffen, müsste sich ein eine Störung dieses Systems im Verhalten der Tiere widerspiegeln. Deshalb wurde ein experimenteller Aufbau etabliert, der eine computergestützte Analyse des larvalen Verhaltens ermöglicht. Zur Analyse des Verhaltens von zuvor gefilmten Tieren wurde die Software Dynamic Image Analysis System (DIAS) verwendet, die bereits des Öfteren erfolgreich für die Analyse von Verhaltensphänotypen eingesetzt wurde (Wang *et al.*, 1997; Wang *et al.*, 2002; Caldwell *et al.*, 2003; Saraswati *et al.*, 2004; Fox *et al.*, 2006).

Als Ausgangspunkt für eine funktionelle Analyse von Naz dienten drei, durch unpräzise Mobilisierung eines im dritten Intron lokalisierten P-Elements generierte, Mutanten. Da diese Mutanten keine offensichtlichen anatomischen Phänotypen zeigten (persönliche Kommunikation

Benjamin Altenhein), sollten sie auf Veränderungen des larvalen Explorationsverhaltens hin untersucht werden. Auf Basis vorhandener Verhaltensphänotypen sollten dann Rückschlüsse auf die Funktion von Naz im NS der Tiere ermöglicht werden.

2 Material und Methoden

2.1 Fliegenzucht

Die verwendeten Fliegen wurden bei 25 °C in Kulturgefäßen unterschiedlicher Größe gehalten. Diese waren zu ca. 20 % mit Futtermedium gefüllt. Die Kulturgefäße wurden mit einem Schaumstoffstopfen verschlossen. Das Futtermedium bestand aus Wasser (59,6 %), Maisgrieß (14,9 %), Malzextrakt (13,1 %), Zuckerrübensaft (6,5 %), Hefeflocken (3 %), Sojamehl (1,5 %) und Agar (1,4 %) (Angaben in Massenprozent). Die Fliegen wurden alle 14 Tage auf neue Kulturgefäße umgesetzt.

2.1.2 Kreuzungen

Um Fliegen unterschiedlicher Genotypen zu kreuzen, wurden zunächst alle adulten Fliegen aus einem bereits mit Larven besiedelten Zuchtgefäß entfernt, sobald die ersten Puppen erschienen. Danach konnten von den frisch geschlüpften Tieren die jungfräulichen Weibchen abgesammelt werden. Dazu wurden die Tiere mit CO₂ betäubt. Da die Tiere bei 25 °C bereits nach ca. vier Stunden paarungsbereit sind, wurde in Dreistundenintervallen abgesammelt. Es wurden nur Tiere abgesammelt, bei denen das Mekonium noch deutlich sichtbar war. Die Jungfrauen wurden in einem separaten Zuchtgefäß gehalten, bis genug Tiere vorhanden waren, um sie mit Männchen des gewünschten Genotyps zu kreuzen. Dazu wurden weibliche und männliche Tiere im Verhältnis 3:1 in einem neuen Kulturgefäß vereint.

2.1.3 Eiablagen

Um Eiablagen durchzuführen, wurden die Tiere zunächst für zwei Tage in normalen Kulturgefäßen angefüttert. Dazu wurde ein wenig zusätzliche Trockenhefe auf das Futtermedium gegeben. Danach wurden die Tiere in Ablagegefäße überführt und bei 25 °C gehalten. Als Ablagegefäße wurden normale Kulturgefäße verwendet, welche allerdings nicht mit Futtermedium, sondern mit Apfelsaftagar (2,7 % (w/v) Agar-Agar in Apfelsaft) gefüllt waren. Die glatte Oberfläche des Agars ermöglichte eine leichte Entnahme der Eier für die nachfolgende Fixierung. Auch hier wurde Trockenhefe auf die Agaroberfläche gestreut. Die Ablagegefäße wurden alle 12 Std. gewechselt.

2.1.4 Balancieren von Mutationen

Um Mutationen in einer Fliegenpopulation zu stabilisieren, wurden Balancer-Chromosomen eingesetzt. Diese zeichnen sich durch ihre veränderte Struktur aus, die *crossing-over*-Ereignisse unterdrückt und so dafür sorgt, dass Mutationen in der Population erhalten bleiben. Des Weiteren

besitzen die meisten Balancer-Chromosomen Marker, die in larvalen und/oder adulten Stadien leicht erkennbar sind. So wird ermöglicht, homozygote von heterozygoten Tieren zu unterscheiden. Diese Marker sind meist dominante homozygot-letale Mutationen, sodass Tiere, die nur das Balancer-Chromosom tragen, zumindest in adulten Stadien nicht vorkommen, während heterozygote Tiere leicht identifizierbar sind. Einige Balancer-Chromosomen sind zusätzlich mit transgenen Markern wie GFP-Enhancerkonstrukten ausgestattet. Diese ermöglichen die Identifikation balancierter Tiere auch in embryonalen und larvalen Stadien.

2.1.5 Das UAS/GAL4 System

Das UAS/GAL4-System ist ein aus der Hefe entnommenes Expressionssystem, das es ermöglicht, zuvor klonierte Gene gewebespezifisch zur Expression zu bringen (Brand & Perrimon, 1993). Dazu werden zwei Linien transgener Tiere erzeugt. Die sogenannte Treiberlinie, die eine Kopie des Gens *GAL4*, eines Transkriptionsfaktors aus Hefe enthält, welches sich unter der Kontrolle eines endogenen Enhancers befindet. Dies wird entweder durch zufällige Insertion im Genom der Tiere oder durch Klonierung einer bekannten Enhancersequenz vor das *GAL4*-Gen und anschließende Insertion ins Genom erreicht. In der Folge wird der Transkriptionsfaktor GAL4 in Zellen exprimiert, die eine Aktivität des entsprechenden Enhancers zeigen. Da es im *Drosophila*-Genom keine Zielsequenz für diesen Transkriptionsfaktor gibt, bleibt die Expression des GAL4 in der Treiberlinie ohne Effekt. Um ein Gen zur Expression zu bringen, wird eine UAS-Linie benötigt. Hier wird das Zielgen, das zuvor hinter die Zielsequenz des GAL4, die sogenannte *upstream activating sequence* (UAS), kloniert wurde ins Genom der Tiere eingebracht. Werden beide Bestandteile des UAS/GAL4-Systems durch Kreuzen der entsprechenden Linien in einem Tier vereint, kommt es zu GAL4-getriebener Expression des Zielgens im Muster des entsprechenden Enhancers.

2.1.6 Verwendete Fliegenstämme

Tabelle 1: Verwendete Fliegenstämme

Name	Genotyp	Bezugsquelle
WT	Oregon R	Stammsammlung des Instituts für Genetik
<i>nazgul</i> ^{Δ1-36}	$W^*;; \frac{nazgul\Delta1-36}{TM6b,Tb,Sb,Hu,Dfd-EYFP}$	Benjamin Altenhein
<i>nazgul</i> ^{Δ1-17}	$W^*;; \frac{nazgul\Delta1-17}{TM6b,Tb,Sb,Hu,Dfd-EYFP}$	Benjamin Altenhein
<i>nazgul</i> ^{Δ2-11}	$W^*;; \frac{nazgul\Delta2-11}{TM6b,Tb,Sb,Hu,Dfd-EYFP}$	Benjamin Altenhein
nazgul P-Element Insertion	$y^1, w^{67c23}; ry^{506} P\{y^{+mDint2}, w^{BR.E.BR=SUPor-P}\} CG31235^{KG00956}$	Bloomington Stock Center #13169
Defizienz Exel6178	$w^{1118}; \frac{Df(3R)Exel6178, P\{XP-U\}Exel6178}{TM6b, Tb1}$	Bloomington Stock Center #7657
dicer; repo-GAL4	$w^*; dicer; \frac{repo-Gal4}{TM6b, Tb, Sb, Dfd-EYFP}$	Stammsammlung des Instituts für Genetik
Eaat1-GAL4	$w^*; P\{w^{+mC}=Eaat1-GAL4.R\}2;$	Bloomington Stock Center #8849
UAS-CG5549-RNAi	$w^{1118}; P\{GD3564\}v8222;$	Vienna <i>Drosophila</i> Resource Center #v8222
UAS-CG7708-RNAi	$; P\{KK109385\}VIE-260B;$	Vienna <i>Drosophila</i> Resource Center #v101485
UAS-Eaat1-RNAi	$; P\{KK100187\}VIE-260B;$	Vienna <i>Drosophila</i> Resource Center #v109401
UAS-Eaat2-RNAi	$; P\{KK107989\}VIE-260B;$	Vienna <i>Drosophila</i> Resource Center #v104371
UAS-hoe2-RNAi	$; P\{KK106411\}VIE-260B;$	Vienna <i>Drosophila</i> Resource Center #v106723
UAS-nazgul RNAi VDRC KK	$; P\{KK112028\}VIE-260B;$	Vienna <i>Drosophila</i> Resource Center #v107974
UAS-nazgul RNAi TRiP	$y^1, v^1; P\{y^{+t7.8}, v^{+t1.8}=TRiP.JF03201\}attP2;$	Bloomington Stock Center #28773

2.2 Verhaltensversuche

Um das Verhalten der Tiere zu untersuchen, wurden diese in einem dafür angefertigten Versuchsaufbau beobachtet. Ziel war es, etwaige Veränderungen des Explorationsverhaltens festzustellen. Dazu wurden die Tiere in eine mit Agar gefüllte Petrischale gesetzt und zwei Minuten gefilmt. Durch computergestützte Auswertung der Aufnahmen konnten so Veränderungen der Parameter Geschwindigkeit und Richtungsänderung registriert und verglichen werden.

Die Versuche wurden in einer, bis auf die Beleuchtung, Stimulus-freien Umgebung durchgeführt. Es wurden nur Tiere in die Auswertung einbezogen, die während des Tests keine Berührungen mit anderen Tieren oder der Wand der Testarena hatten.

Die Verhaltensversuche wurden mit WT-Tieren, bestimmten Mutanten sowie RNAi- Tieren durchgeführt. Außerdem wurden pharmakologische Versuche durchgeführt, bei denen Substanzen über das Futter verabreicht wurden, die in den TA-Stoffwechsel eingreifen.

2.2.1 Versuchsaufbau zur Beobachtung des Explorationsverhaltens von L3-Larven

Um die Tiere von möglichst vielen Störfaktoren abzugrenzen, wurden alle Verhaltensversuche in einer dafür angefertigten Kunststoffbox durchgeführt. Diese enthielt ein Podest, auf dem die mit 2,7%igem (v/w) Agar-Agar gefüllte Petrischale platziert wurde. Um den Kontrast zwischen Agaroberfläche und den Tieren zu verstärken, wurde dem Agar-Agar der ungiftige Farbstoff Patentblau V beigemischt. Dadurch hoben sich die weißen Tiere deutlich vom blauen Untergrund ab und konnten von der Tracking-Software leichter erkannt werden.

Zur Beleuchtung wurde eine LED-Ringleuchte eingesetzt. Diese hat, gegenüber konventionellen Glühlampen, den Vorteil, dass so gut wie keine Wärme erzeugt wird und die Temperatur innerhalb des Versuchsaufbaus auch bei längerem Betrieb unverändert bleibt.

Die Tiere wurden mit einer Webcam (Logitech) von oben beobachtet. Diese war an einen Rechner angeschlossen, mit dem die Aufnahmen und späteren Auswertungen durchgeführt wurden. Die Aufnahmen wurden mit fünf Bildern pro Sekunde und einer Auflösung von 800x600 Bildpunkten durchgeführt. Dazu wurde die Software BTV pro verwendet.

2.2.2 Durchführung der Verhaltensversuche

Die Verhaltensversuche wurden bei 22 °C Umgebungstemperatur durchgeführt. Dies traf auch auf die verwendete Agarplatte zu. Um den Tieren zu ermöglichen, sich an die Raumtemperatur (RT) zu gewöhnen, wurden die Zuchtröhrchen ca. eine Stunde vor Versuchsbeginn in den Raum gestellt. Anschließend wurden jeweils vier Tiere mit einer Federstahlpinzette kurz aus dem Zuchtröhrchen in ein Wasserbad überführt, um Futteranhaftungen zu entfernen und danach auf die Agarplatte gesetzt. Die Videoaufzeichnung wurde gestartet, sobald sich alle Tiere auf der Platte befanden. Die Tiere wurden zwei Minuten beobachtet und dann aus dem Versuchsaufbau entfernt.

Wenn der Versuch die Applikation bestimmter Pharmaka erforderte, wurden diese in der gewünschten Konzentration über Instant-Futter verabreicht. Dazu wurden die Tiere in die Zuchtröhrchen überführt, die mit dem entsprechenden Futter gefüllt waren. Das Futter wurde mit 4 ml Wasser pro Gramm Trockenmasse angesetzt. Die Pharmaka wurden vor der Zubereitung des Futters in der entsprechenden Konzentration im Wasser gelöst. Die Tiere wurden für zwei Stunden auf dem mit den entsprechenden Pharmaka versetzten Futter belassen, bevor sie getestet wurden. Um sicherzustellen, dass die zu testenden Tiere die Substanz aufgenommen hatten, wurden nur Tiere verwendet, bei denen das blaue Instant-Futter deutlich im Darm zu sehen war.

Abweichend vom zuvor beschriebenen Modus der Pharmakon-Applikation, wurde die Yohimbin-Applikation bei *naz*-RNAi-Tieren während des in 3.5.1 beschriebenen Experiments in Standard-Futterbrei durchgeführt. Dazu wurde dem noch flüssigen Futtermedium eine Yohimbin-Stammlösung zugesetzt. Um die finale Yohimbin-Konzentration von 0,5 mg/ml zu erhalten, wurden jeweils 1 ml der 5 mg/ml Yohimbin-Stammlösung zu 9 ml Futtermedium gegeben und gut gemischt. Da in diesem Fall keine optische Kontrolle für die Aufnahme des Mediums möglich war, wurden die Tiere 24 Std. auf dem Yohimbin-Medium belassen.

2.2.3 Videobearbeitung und Auswertung

Zur weiteren Auswertung wurden die Filme zunächst auf eine Länge von genau 600 Bildern geschnitten. Da die verwendete Software in den ersten drei Sekunden der Aufnahme keine bewegten Bilder aufnahm, wurden bei allen Filmen die ersten 15 Bilder entfernt.

Die Auswertung des Verhaltens erfolgte mit der Software DIAS. Im ersten Schritt der Auswertung wurden die Tiere *getrackt*. Dazu wurden ein Helligkeitswert sowie ein maximaler und minimaler Objektdurchmesser für die gewünschten Objekte definiert. Auf Basis dieser Parameter untersuchte die Software in der Folge jedes Bild des Films und markierte Objekte, die den vorgegebenen Parametern entsprachen. Idealerweise wären das nur die weißen Larven. In der Praxis fand DIAS noch weit mehr Objekte, bei denen es sich meist um Reflexionen auf der glatten Agar-Oberfläche handelt. Diese konnten allerdings später gelöscht werden.

Im zweiten Schritt der Videoauswertung wurden die Pfade der gefundenen Objekte berechnet. Dazu wurde in jedem Bild des Films jeweils das Zentrum der als Objekt erkannten Fläche berechnet. Dieser als Zentroid bezeichnete Punkt bildete die Basis aller späteren Berechnungen für Geschwindigkeit und Richtungsänderung. Auf Basis der Zentroide wurde in der Folge ein Pfad für jedes Objekt berechnet. Dazu wurden zunächst alle Objekte auf dem jeweiligen Bild des Films nummeriert. War der Abstand zweier Objekte auf aufeinanderfolgenden Bildern des Films kleiner als ein zuvor definierter Grenzwert, ging die Software davon aus, dass es sich um dasselbe Objekt handelte. So erhielten bewegte Objekte auf jedem Bild des Films dieselbe Nummer.

Die Berechnung der Richtungsänderung erfolgte zunächst, indem der Winkel der Linie zwischen zwei Zentroiden zum unteren Bildrand, der als x-Achse fungierte, bestimmt wurde. Durch Bildung der Differenz der Winkel zweier aufeinanderfolgender Linien wurde die Richtungsänderung berechnet. Dabei wurde immer der Betrag der Differenz ausgegeben, sodass nur positive Werte entstanden.

Das Ergebnis dieser Auswertungen konnte als Textdatei exportiert werden. Diese Datei enthielt neben den 600 Werten des gewählten Parameters auch die Objektbezeichnung und den Namen des Videos, das als Quelle verwendet wurde. So war es möglich jeden Datensatz wieder auf das beobachtete Tier zurückzuführen. Die so gewonnenen Daten wurden in der Folge statistisch ausgewertet.

2.2.4 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung der gewonnenen Daten wurde mit dem Programm Sigma Plot 11.0 durchgeführt. Dazu wurden zuerst die 600 Einzelwerte jedes Tieres importiert. Von diesen 600 Werten wurde der Median bestimmt. Dieser Wert wird im Folgenden als Richtungsänderungsrate bezeichnet. Die Richtungsänderungsrate wurde in der Folge als Einzelwert in die Auswertung aller Tiere des entsprechenden Genotyps oder der entsprechenden Vorbehandlung eingefügt. In der endgültigen Auswertung sind einzelne Tiere also durch den Median aller ihrer Richtungsänderungen im Beobachtungszeitraum repräsentiert.

Um die so generierten Datensätze zu vergleichen, wurde entsprechend der dafür vorgegebenen Bedingungen entweder der Students t-Test oder der Mann-Whitney Rank Sum Test verwendet. Wenn mehr als zwei zusammenhängende Datensätze verglichen werden sollten, wurde ein *One Way Analysis of Variance on Ranks (One Way ANOVA)* mit *Dunn's multiple comparison post hoc Test* durchgeführt. Tiere unterschiedlichen Genotyps wurden als unabhängige Populationen betrachtet und demnach immer paarweise gegeneinander getestet. Bei Variationen eines Parameters, z. B. der Konzentration eines Pharmakons, bei Tieren gleichen Genotyps wurde eine *One Way ANOVA* durchgeführt.

2.3 Fluoreszenz-Immunhistochemie

Tabelle 2 : Verwendete Primäre-Antikörper

Name	Antigen	Verdünnung	Wirt	Bezugsquelle
α-Fas2 1D4	Fasciclin2	1:10	Maus	DSHB
α-GFP	Green Flourescent Protein	1:500	Huhn	Millipore Corporation
α-Naz GP	Nazgul C-Terminus	1:250	Meerschweinchen	Benjamin Altenhein
α-Naz Rab	Nazgul C-Terminus	1:1000	Kaninchen	Benjamin Altenhein
α-Naz Rab afp	Nazgul C-Terminus	1:1000	Kaninchen	Benjamin Altenhein
α-Naz GP GST	Nazgul	1:1000	Meerschweinchen	Benjamin Altenhein
α-Pros	Prospero	1:10	Maus	Chris Q. Doe
α-Repo Rab	Reverse Polarity	1:1000	Kaninchen	Benjamin Altenhein
α-Repo GP	Reverse Polarity	1:1000	Mehrschweinchen	Benjamin Altenhein
α-Tyramin	Tyramin-glutaraldehyd-Protein	1:200	Kaninchen	Millipore Corporation

2.3.1 Fluoreszenzfärbung von Embryonen

Um Proteine im NS von Embryonen durch eine fluoreszierende Antikörperfärbung zu markieren, mussten die Tiere fixiert werden. Dazu wurden diese zunächst für zwei Minuten mit 10%iger Chlorbleichlauge behandelt. Danach wurden die Embryonen in das Fixativ (450 µl PEMS-Puffer; 600 µl Heptan; 70 µl 37%iges Formaldehyd) überführt und für ca. 22 min stark geschüttelt. In der Folge wurde die untere (wässrige) Phase abgezogen und durch Methanol ersetzt. Danach wurde für eine Minute auf dem Vortexer geschüttelt. Dieser Vorgang wurde dreimal wiederholt. Danach wurde auch die organische Phase mit abgezogen und dreimal mit 100%igem Ethanol gewaschen. Die so fixierten und dehydratisierten Embryonen konnten auf minus 20 °C bis zur weiteren Verwendung gelagert werden.

Um die Antikörperfärbung durchzuführen, wurden die Embryonen durch zweimaliges Waschen in PBT rehydriert. Dann wurden die Tiere in einer Lösung aus PBT und den gewünschten Antikörpern in der jeweils passenden Verdünnung über Nacht auf 4 °C inkubiert. Anschließend wurde die Antikörperlösung abgezogen und zur erneuten Verwendung auf 4 °C gelagert. Die Embryonen wurden dreimal mit PBT gewaschen und anschließend zwei Stunden auf RT mit den entsprechenden sekundären Antikörpern inkubiert. Sekundäre Antikörper wurden immer in einer 1:500-Verdünnung verwendet. Es wurden ausschließlich Sekundäantikörper der Firmen *Jackson Immunoresearch Laboratories* und *Life Technologies* verwendet. Abschließend wurden die Tiere zweimal in PBT und zweimal in PBS gewaschen und schließlich in 70%iges Glycerol überführt, wo sie bis zur Präparation gelagert werden konnten.

2.3.2 Fluoreszenzfärbung von larvalen Zentralnervensystemen

Um Fluoreszenzfärbungen larvaler ZNS durchzuführen, wurden die Tiere zunächst von anhaftendem Futter gereinigt. Danach wurden die Tiere in eisgekühlte Schälchen mit Silikonboden und PBS gegeben, in denen das ZNS präpariert wurde. Um die NS während Lösungswechseln besser erkennen zu können und so ein versehentliches Absaugen zu verhindern, wurden der Pharynx und die Mundwerkzeuge nicht entfernt. Meist wurden 15 NS in ein ebenfalls eisgekühltes Eppendorf-Reaktionsgefäß mit PBS überführt.

Um die präparierten NS zu fixieren, wurde das PBS durch PLP ersetzt und die Eppendorf-Reaktionsgefäße wurden ca. eine Stunde unter leichtem Schütteln bei RT inkubiert. Danach wurde das Fixativ abgezogen und durch 0,5 % PBT ersetzt. Es wurde dreimal mit 0,5 % PBT gewaschen. Anschließend wurde eine Lösung der gewünschten Antikörper in 0,5 % PBT auf die Präparate gegeben und über Nacht auf 4 °C inkubiert. Am nächsten Tag wurde die Antikörperlösung abgezogen und zur erneuten Verwendung auf 4 °C gelagert. Es wurde dreimal mit 0,5 % PBT gewaschen. Eine Lösung der sekundären Antikörper in 0,5 % PBT wurde bei RT auf die Präparate gegeben. Diese wurde nach zwei Stunden wieder entfernt und verworfen. Zum Abschluss der

Färbung wurden die NS jeweils zweimal mit 0,5 % PBT und PBS gewaschen und anschließend in 70%iges Glycerol überführt, wo sie bis zur Präparation gelagert werden konnten.

2.3.3 Nachweis von Tyramin im zentralen Nervensystem von L3-Larven

Um TA mittels einer Antikörperfärbung im Gewebe nachweisen zu können, musste dieses entgegen der sonstigen Vorgehensweise nicht mit Formaldehyd, sondern mit Glutaraldehyd fixiert werden. Bei diesem Verfahren macht man sich die Eigenschaft des Glutaraldehyds zunutze, primäre Amine mit Proteinen zu vernetzen. Die Produkte einer solchen Reaktion können in der Folge als Epitop für einen immunhistochemischen Nachweis dienen. Als Immunogen für den hier verwendeten Antikörper wurde p-Tyramin-glutaraldehyd-N-alpha-acetyl-L-lysin-N-methylamid verwendet.

Um TA im NS der Tiere nachzuweisen, wurden diese zunächst für eine Stunde in ein eisgekühltes mit Silikon gefülltes Präparierschälchen gegeben. Danach wurden die Tiere mit Minuziennadeln am vorderen und hinteren Körperende auf der Silikonoberfläche fixiert. Die Tiere wurden mit einer feinen Schere geöffnet und das NS wurde freigelegt. Dann wurde jedes Tier mit Fixativlösung (0,65 % (v/v) Glutaraldehyd in 0,1 M Natrium-Cacodylat-Puffer mit 1 % (w/v) Natriummetabisulfit (SMB)) überschichtet. So wurden die Tiere fünf Minuten belassen. Im Anschluss wurde das ZNS entfernt und in einem Eppendorf-Reaktionsgefäß, das ebenfalls das Fixativ enthielt, für weitere 45 Minuten bei RT fixiert. Nach der Fixierung wurden die NS viermal zehn Minuten in TrisHCl SMB (0,05 M TrisHCl 0,45 % (w/v) SMB) gewaschen, um das Fixativ möglichst vollständig zu entfernen. Dann wurden die NS für 30 Minuten in einer Natrium-Borhydridlösung (0,5 % (w/v) Natrium-Borhydrid in TrisHCl SMB) inkubiert. Dieser Schritt war notwendig, um die, durch den Glutaraldehyd erzeugte, Autofluoreszenz so weit wie möglich zu verringern. Außerdem wurden hier eventuell vorhandene Reste des Fixativs neutralisiert. In der Folge wurde viermal mit TrisHCl gespült, um das Borhydrid vollständig zu entfernen. Dann folgten zwei weitere Spülschritte mit TrisHCl SMB TX (TrisHCl SMB mit 0,3 % (v/v) Triton X-100). Zum Blockieren unspezifischer Antikörper-Bindestellen wurden die NS nun für 1,5 Std. in einer Lösung aus TrisHCl SMB TX und 10 % Kalbserum inkubiert. Für die nächsten zwei Tage wurden die Reaktionsgefäße mit den NS auf 4 °C unter leichtem Schütteln aufbewahrt. Die Antikörperlösung wurde entfernt und es wurde sechsmal mit TrisHCl SMB TX gespült. Die Inkubation mit entsprechenden sekundären Antikörpern erfolgte ebenfalls für zwei Tage auf 4 °C in einer Lösung aus TrisHCl SMB TX und 5 % Kalbserum. Danach wurde die Antikörperlösung entfernt und es wurde viermal zehn Minuten in TrisHCl SMB TX und zweimal zehn Minuten in TrisHCl SMB gewaschen. Abschließend wurde die TrisHCl-SMB-Lösung durch Vectashield ersetzt. So konnten die NS bis zur Präparation gelagert werden.

2.3.4 Nachweis von Tyramin in S2R+-Zellen

Um TA im Inneren der S2R+-Zellen nachzuweisen, wurde zunächst vorsichtig das Kulturmedium abgezogen und durch jeweils 250 µl PBS ersetzt. Um vorhandene Reste des sich im Kulturmedium befindlichen TA zu entfernen, wurde jede Kulturkammer dreimal mit 250 µl PBS gewaschen (die Länge aller Waschschriffe betrug fünf Minuten). Dabei wurden schnelle Bewegungen und starke Saugkräfte beim Pipettieren vermieden, um die Zellen nicht vom Boden der Kammer zu lösen. Die Zellen wurden anschließend in den Kulturkammern mit jeweils 250 µl einer 1%igen Glutaraldehydlösung in Cacodylatpuffer für 30 Minuten fixiert. Nachfolgend wurde jede Kammer dreimal mit TrisHCl SMB gespült. Anschließend wurde über Nacht in 1x BSA TrisHCl SMB TX inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Kammern mit TrisHCl SMB TX gewaschen.

Da die Glutaraldehyd-Fixierung starke Autofluoreszenz verursacht, was die spätere Detektion einer Fluoreszenzfärbung behindern würde, wurden zu 250 µl TrisHCl SMB TX jeweils 10 µl einer 1%igen Borhydridlösung gegeben und 30 Minuten bei RT im Abzug inkubiert. Borhydrid greift dabei Doppelbindungen an und reduziert so die Autofluoreszenz. Die Borhydridlösung wurde aus den Kammern entfernt und es wurde dreimal mit TrisHCl SMB TX gewaschen. Nach dem dritten Waschen wurde der Waschpuffer durch jeweils 100 µl der Färbelösung aus den beiden primären Antikörpern α -Tyramin (Kaninchen) 1:200 und α -GFP (Huhn) 1:500 in TrisHCl SMB TX ersetzt. Die Färbung wurde vier Tage bei 4 °C inkubiert. Nach Inkubation der primären Antikörper wurden diese durch fünfmaliges Waschen mit TrisHCl SMB TX entfernt und es wurden 100 µl einer Färbelösung der beiden sekundären AKs α -Kaninchen Alexa647 und α -Huhn Alexa488 jeweils 1:500 in TrisHCl SMB TX zugegeben. Die Färbung wurde über Nacht bei 4 °C inkubiert. Die sekundären AKs wurden durch dreimaliges Waschen mit TrisHCl SMB TX und zweimaliges Waschen in TrisHCl SMB entfernt. Das TrisHCl SMB TX wurde durch PBS ersetzt und die Zellen wurden am Laser-Scanning-Mikroskop (LSM) auf im Zytoplasma vorhandenes TA untersucht.

2.3.5 Dokumentation von Fluoreszenzfärbungen

Die Dokumentation von Fluoreszenzfärbungen erfolgte mit einem Leica SP2 und einem Leica SP5 Laser-Scan-Mikroskop. Dabei wurde der für das jeweilige Gerät vorhandene Rechner und die entsprechende Software der Firma Leica verwendet. Die Präparate wurden auf der z-Achse mit einer Schrittgröße von 0,5 µm bei embryonalen und 1,0 µm bei larvalen NS aufgenommen.

2.4 Molekularbiologische Methoden

2.4.1 Präparation genomischer DNA

Um genomische DNA aus adulten Tieren oder Larven zu gewinnen, wurden diese zunächst in ein 1,5 ml-Reaktionsgefäß überführt und für 30 Minuten auf $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ eingefroren. Zu den gefrorenen Tieren wurde im Anschluss 200 μl DNA Puffer A (100 mM TrisHCl; 100 mM EDTA; 100 mM NaCl; 0,5 % (v/v) SDS; pH 7,5) gegeben. Dann wurden die Tiere mit einem Plastikpistill zerkleinert, bis keine größeren Fragmente mehr sichtbar waren. Um die Zellen der Tiere zu lysieren, wurde das Reaktionsgefäß nach Zugabe weiterer 200 μl DNA Puffer A für 30 Minuten auf $65\text{ }^{\circ}\text{C}$ in einem Schüttler inkubiert. Danach wurden 800 μl DNA Puffer B (5 M Kaliumacetat und 6 M LiCl im Verhältnis 1:2,5) zugegeben und für zehn Minuten auf Eis inkubiert. Durch 15-minütiges Zentrifugieren bei 13000 U/min in einer Tischzentrifuge wurden Zellbestandteile und Proteine auf dem Boden des Reaktionsgefäßes konzentriert. Danach wurde 1 ml des klaren Überstands in ein neues 2 ml-Reaktionsgefäß überführt. Dabei wurde es vermieden, oben schwimmendes Fett mit in das neue Gefäß zu überführen. Nun wurden 600 μl Isopropanol zugegeben, um die gelöste DNA zu fällen. Durch 15-minütiges Zentrifugieren bei 13000 U/min wurde die DNA auf dem Boden des Gefäßes präzipitiert. Der Überstand wurde vollständig entfernt. Das DNA-Präzipitat wurde mit 100 μl 70%igem Ethanol gewaschen, um möglichst viel Salz zu entfernen. Nach weiteren fünf Minuten Zentrifugation wurde das 70%ige Ethanol wieder aus dem Gefäß entfernt und die DNA wurde für etwa zwei Stunden getrocknet. Abschließend wurde das DNA-Präzipitat in TE-Puffer (10 mM TrisHCl; 1 mM EDTA; pH 8.0) gelöst und bis zur weiteren Verwendung auf $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert.

2.4.2 Präparation von Plasmid-DNA

Die Präparation von Plasmid-DNA aus Übernachtskulturen wurde mit QIAprep® Spin Miniprep Kits der Firma Qiagen durchgeführt. Dabei wurde das vom Hersteller vorgegebene Protokoll verwendet.

Es wurden 1,5 ml der Übernachtskultur in ein Reaktionsgefäß überführt und durch kurzes Zentrifugieren pelletiert. Der Überstand wurde verworfen. Die Bakterien wurden in 250 μl P1-Puffer resuspendiert. Durch Zugabe von weiteren 250 μl P2-Puffer wurde die Lyse der Bakterien gestartet. Nach etwa fünf Minuten wurden 350 μl des Puffers N3 zugegeben, um die Lyse wieder zu stoppen. Die Reaktionsgefäße wurden zehn Minuten auf 17900 g zentrifugiert, um unlösliche Bestandteile zu pelletieren. Der Überstand wurde auf eine QIAprep® Spin Säule gegeben und 30 s abzentrifugiert. Die Säule wurde einmal mit 500 μl PB-Puffer und einmal mit 750 μl PE-Puffer gewaschen. Danach wurde eine Minute ohne Zugabe eines Puffers zentrifugiert, um die Säule von Resten der Waschpuffer zu reinigen. Die Säule wurde in ein frisches Reaktionsgefäß gestellt und es wurden 50 μl EB-Puffer aufgetragen, um die DNA zu eluieren. Nach einer Minute wurde der

Elutionspuffer durch Abzentrifugieren in das Reaktionsgefäß überführt. Die DNA-Lösung wurde bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert.

2.4.3 Präparation von total-RNA

Zur Präparation von total-RNA wurde ein RNeasy® Mini Kit der Firma Qiagen verwendet. Dabei wurde das vom Hersteller vorgegebene Protokoll verwendet.

Es wurden jeweils zehn Tiere, der zu testenden Stämme, in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt und in flüssigem Stickstoff eingefroren. Es wurden 300 µl des RLT-Puffers zugegeben. Dann wurden die Tiere mit einem RNase-freien Plastikpistill zerkleinert. Die Pistille wurden zuvor durch Inkubation in einer Lösung aus Diethylidcarbonat (DEPC) in Wasser und anschließendes Autoklavieren gereinigt, um eine Kontamination mit Ribonukleasen zu verhindern. Die Tiere wurden so weit zerkleinert, dass keine Gewebestücke mehr sichtbar waren. Dann wurden die unlöslichen Bestandteile der Suspension abzentrifugiert. 250 µl des klaren Überstands wurden in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Es wurden 250 µl 70%iges Ethanol zugegeben und durch mehrmaliges Auf- und Abpipettieren gemischt. Diese Mischung wurde auf eine der im Kit enthaltenen Säulen gegeben. Die Lösung wurde abzentrifugiert, wodurch DNA und RNA an die Membran der Säule binden. Um die DNA zu entfernen, wurde die Membran zunächst mit 350 µl RW1-Puffer gewaschen, dann wurden 80 µl einer DNase I-Lösung auf die Membran gegeben. Nach 15 Minuten bei RT wurde erneut mit 350 µl RW1-Puffer gewaschen. In der Folge wurde noch zweimal mit RPE-Puffer gewaschen und einmal eine Minute ohne vorherige Zugabe eines Puffers zentrifugiert. Die Säule wurde daraufhin in ein neues 1,5 ml-Reaktionsgefäß gestellt und die RNA wurde mit 30 µl RNase-freiem Wasser gelöst.

2.4.3 Polymerase-Kettenreaktion

Um bestimmte Bereiche einer DNA zu Amplifizieren, wurde die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) verwendet. Es wurden je nach Anforderung der Zielsetzung unterschiedliche PCR-Methoden verwendet.

2.4.3.1 Amplifikation kleiner DNA-Fragmente

Zur Amplifikation kleinerer DNA-Fragmente bis ca. 5 kb Länge aus genomischer DNA oder Plasmiden wurde die *Taq* DNA-Polymerase der Firma Qiagen verwendet. Es wurden die im Kit enthaltenen Puffer und Nucleotidlösungen verwendet.

Die PCR-Reaktionen wurden wie folgt angesetzt:

DNA-Matrize	10-120 ng
PCR-Puffer 5x	10 µl
dNTPs 10 mM	1 µl
<i>Fwd</i> -Primer 10 nM	1 µl
<i>Rev</i> -Primer 10 nM	1 µl
<i>Taq</i> Polymerase	0,2 µl (1 Unit)
dH ₂ O	auf 50 µl aufgefüllt

Typischerweise wurde ein Programm mit 35 Zyklen verwendet. Die PCR-Maschine wurde wie folgt programmiert:

1. 94 °C 2 min Initiale Denaturierung
2. 94 °C 10 s Denaturierung
3. 50-62 °C 30 s Annealing (Temperatur ist von den Primern abhängig)
4. 72 °C 30 s/kb Elongation
5. Die Schritte 2-4 werden 34-mal wiederholt
6. 94 °C 10 s Denaturierung
7. 50-62 °C 30 s Annealing
8. 72 °C 2 min Finale Elongation
9. 12 °C ∞ Ende

2.4.3.2 Amplifikation großer DNA-Fragment

Um große DNA-Fragmente aus genomischer-DNA zu amplifizieren wurde das Expand Long Range Kit der Firma Roche verwendet. Es wurden die im Kit enthaltenen Puffer und Nucleotidlösungen verwendet. Die PCR-Reaktionen wurden wie folgt angesetzt:

DNA-Matrize	120-300 ng
PCR-Puffer mit Mg ²⁺ 5x	10 µl
DMSO	1,5 µl
dNTPs 10 mM	2,5 µl
<i>Fwd</i> -Primer 10 nM	2 µl
<i>Rev</i> -Primer 10 nM	2 µl
Polymerase	0,5 µl (2,5 Units)
dH ₂ O	auf 50 µl aufgefüllt

Tabelle 3: Primer zur Amplifikation der P-Element-Insertion

Name	Sequenz
Fwd-Intron 3 DS1	5'-GGGCATGAAGCAATCCAGTTCCAG-3'
Rew-Intron 3 US4	5'-GCCAGGACCCACTCGGTT-3'

Es wurde ein sogenanntes *Expand* Programm verwendet. Die PCR-Maschine wurde wie folgt programmiert:

1. 92 °C 2 min Initiale Denaturierung
2. 92 °C 10 s Denaturierung
3. 50-62 °C 30 s Annealing (Temperatur ist von den Primern abhängig)
4. 68 °C 60 s/kb Elongation
5. Die Schritte 2-4 werden 10-mal wiederholt
6. 92 °C 10 s Denaturierung
7. 50-62 °C 30 s Annealing
8. 68 °C 60 s/kb Elongation
 + 20 s
9. Die Schritte 6-8 werden 25-mal wiederholt
10. 92 °C 10 s Denaturierung
11. 50-62 °C 30 s Annealing
12. 68 °C 7 min Finale Elongation
13. 12 °C ∞ Ende

2.4.3.3 Multiplex-PCR zur Überprüfung des VDRC RNAi-Konstrukt-Insertionsortes

Um zu überprüfen, ob der verwendete *naz*-RNAi-Stamm des Vienna *Drosophila* RNAi Center (VDRC) mehrere Insertionen des RNAi-Konstrukts trägt, wurden beide pKC43-Insertionsorte auf ihre Besetzung durch pKC26 hin überprüft. Es wurde das von Green *et al.* 2014 vorgeschlagene Multiplex-PCR-Verfahren verwendet. Dazu wurde die PCR-Reaktion mit einem *forward*- und zwei *reverse*-Primern angesetzt. Der *forward*-Primer lag im 5'-Bereich vor der zu testenden Insertionsstelle (*Genomic_F*) während die *reverse*-Primer innerhalb der inserierten Konstrukte lagen. Dabei lag ein *reverse*-Primer im 5'-Bereich des pKC26-Konstrukts (pKC26_R) und ein *reverse*-Primer im 3'-Bereich des pKC43-Konstrukts (pKC_43_R). Wenn kein pKC26-Konstrukt in pKC46 vorliegt, kann nur die Sequenz zwischen dem Primerpaar *Genomic_F* und pKC43_R, mit einer Länge von ca. 1050 bp, amplifiziert werden. Liegt eine pKC26-Insertion vor, wird die Sequenz zwischen dem Primerpaar *Genomic_F* und pKC26_R, mit einer Länge von 450 bp, amplifiziert. Die Amplifikation des wesentlich größeren Fragments zwischen *Genomic_F* und pKC43_R wird durch eine zu kurze Elongationszeit verhindert.

Zur Durchführung dieser PCR wurde ein KPAHIFI Kit der Firma Peqlab verwendet. Es wurden die im Kit enthaltenen Puffer und Nucleotidlösungen verwendet.

Die PCR-Reaktionen wurden wie folgt angesetzt:

DNA-Matrize	100 ng
Fidelity PCR-Puffer 5x	10 µl
dNTPs 10 mM	1 µl
<i>Genomic_F</i> -Primer 10 nM	1 µl
pKC43_R-Primer 10 nM	1 µl
pKC26_R-Primer 10 nM	1 µl
KPAHIFI-Polymerase	1 µl (1 Unit)
dH ₂ O	auf 50 µl aufgefüllt

Es wurde ein Programm mit 35 Zyklen verwendet. Abweichend von der in Green *et al.* (2014) vorgeschlagenen Methode wurde kein *touchdown* Programm verwendet, sondern für die Annealing-Temperatur ein vierstufiger Gradient programmiert. Die Temperaturabstände betragen jeweils 1 °C. Die PCR-Maschine wurde wie folgt programmiert:

1. 95 °C 2 min Initiale Denaturierung
2. 98 °C 15 s Denaturierung
3. 60-63 °C 15 s Annealing
4. 72 °C 50 s Elongation
5. Die Schritte 2-4 werden 34-mal wiederholt
6. 98 °C 15 s Denaturierung
7. 60-63 °C 15 s Annealing
8. 72 °C 2 min Finale Elongation
9. 12 °C ∞ Ende

Tabelle 4: Verwendete Primer Multiplex-PCR

Name	Sequenz
C_Genomic_F	5'-GCCCACTGTCAGCTCTCAAC-3'
NC_Genomic_F	5'-GCTGGCGAACTGTCAATCAC-3'
pKC43_R	5'-TCGCTCGTTGCAGAATAGTCC-3'
pKC26_R	5'-TGTAACGACGGCCAGT-3'

2.4.3.4 Reverse-Transkriptase-PCR auf *naz*-Mutanten

Um die mRNA der *naz*-Mutanten zu sequenzieren, wurde zunächst total-RNA aus Larven präpariert. Die RNA-Präparation wurde zur Synthese von *copy*DNA (cDNA) verwendet. Die cDNA-Synthese wurde mit einem Transcriptor High Fidelity cDNA Synthesis Sample Kit der Firma Roche durchgeführt. Es wurden die im Kit enthaltenen Puffer und Nucleotidlösungen verwendet. Die cDNA-Synthese wurde wie folgt angesetzt:

Total-RNA	10 µl
Anchored-oligo(dT) Primer (50 pmol/µl)	1,0 µl
PCR-H ₂ O	0,4 µl

Dieser Ansatz wurde für zehn Minuten auf 65 °C inkubiert. Danach wurde das Reaktionsgefäß sofort mit Eis gekühlt und es wurden die restlichen Komponenten der cDNA-Synthese zugegeben.

Reaktions-Puffer	4,0 µl
RNase-Inhibitor	0,5 µl
Nucleotid-Mix	2,0 µl
DTT	1,0 µl
Reverse-Transkriptase	1,1 µl

Der Reaktionsansatz wurde für 30 Minuten bei 65 °C inkubiert. Danach wurde die Temperatur für fünf Minuten auf 85 °C erhöht, um die Reverse-Transkriptase zu deaktivieren. Alle Inkubationen wurden in einer PCR-Maschine durchgeführt.

Um die gewünschte cDNA zu amplifizieren, wurden 5 µl der cDNA-Synthese in eine PCR eingesetzt. Hier wurde das bereits beschriebene Protokoll zur Amplifikation kleiner DNA-Fragmente (Kapitel 2.4.3.1) verwendet. Da die Ausbeute nach der ersten PCR meist sehr gering war, wurden 5 µl dieser Reaktion in eine weitere PCR eingesetzt. Hier wurden *nested*-Primer verwendet, um die Spezifität weiter zu erhöhen (die Bindestellen der Primer am Transkript sind in Abb. 8D vermerkt).

Tabelle 5: Verwendete Primer *naz*-RT-PCR

Name	Sequenz
<i>naz</i>-RT-PCR US1	5'-GGCAGGACCTAACGCGCACCC-3'
<i>naz</i>-RT-PCR US2	5'-GCATCCAAAGCATACACTCAAGG-3'
<i>naz</i>-RT-PCR DS1	5'-CGTTGCAGTTGGCAGTCTCCAAGG-3'
<i>naz</i>-RT-PCR DS2	5'-GTGCCAGGCATAAATCACTCC-3'

2.4.4 Agarose-Gelelektrophorese

Um die Größe von DNA-Fragmenten zu bestimmen, wurden Agarose-Gelelektrophoresen durchgeführt. Dazu wurden, abhängig von der erwarteten Größe der DNA-Fragmente, Agarose-Gele mit 0,5 %-1,0 % Agarosegehalt (w/v) verwendet. Die entsprechende Menge Agarose wurde in TAE-Puffer (0,1 M TRIS; 0,05 M Acetat; 0,25 mM EDTA; pH 8,0) gelöst und bis zum Sieden erhitzt. Danach wurden 20 µl einer Ethidiumbromid-Stammlösung (1 mg/ml) zugegeben. Beim Abkühlen polymerisiert die Agarose und bildet ein Gel. Dieses wurde in die Gelelektrophorese-Apparatur eingebracht und mit den zu testenden DNA-Lösungen und einem Größenmarker beladen. Durch Anlegen einer Spannung an die, in der Gelelektrophorese-Apparatur verbauten Elektroden, wandern die DNA-Moleküle in Richtung der Anode durch das Gel. Dabei bewegen sich kleinere Moleküle schneller durch das feinporige Agarosepolymer als große Moleküle. Nach ca. 45 min bei 90 V wurden die Gele aus der Apparatur entnommen und unter UV-Licht ausgewertet. Das in der Lösung enthaltende Ethidiumbromid dient dabei als Fluoreszenzfarbstoff. Da sich Ethidiumbromid an DNA anlagert, können Bereiche mit hoher DNA-Konzentration sichtbar gemacht werden.

2.4.5 Klonierungen von DNA-Fragmenten in Plasmide

Um DNA-Fragmente in Plasmide zu klonieren, wurde das geöffnete Plasmid im Verhältnis 1:3 mit dem Insert in ein Reaktionsgefäß gegeben. Anschließend wurden Ligationspuffer und die entsprechende Ligase hinzugefügt. Der Ansatz wurde mit ddH₂O auf 5 µl aufgefüllt und über Nacht auf 12 °C inkubiert. Am nächsten Tag wurden 2 µl dieser Reaktion zur Transformation chemisch-kompetenter DH5α-Zellen verwendet.

2.4.6 Transformation chemisch-kompetenter *E. coli*-Zellen

Um chemisch kompetente *E. coli*-Zellen zu transformieren, wurden die bei -80 °C gelagerten Zellen zunächst vorsichtig aufgetaut. Dazu wurden die Reaktionsgefäße auf Eis gehalten. Dann wurden zu 50 µl der Zellsuspension 2 µl der Vektorlösung gegeben und durch Rühren mit der Pipettenspitze vermischt. Die Zellen wurden für 30 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Zellen für 45 s in ein auf 45 °C aufgeheiztes Wasserbad gehalten und danach sofort zurück auf Eis gestellt. Nach kurzem Abkühlen, wurden 250 µl auf 37 °C erwärmtes SOC-Medium zugegeben und für 30 min auf 37 °C inkubiert. Danach wurden die Zellen auf ebenfalls auf 37 °C erwärmten LB-Agarplatten ausgestrichen, die ein dem Vektor entsprechendes Antibiotikum enthielten und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Vorhandene Kolonien wurden mit einer Pipettenspitze in Flüssigkultur (LB-Medium mit selektivem Antibiotikum) genommen und wiederum über Nacht bei 37 °C unter Schütteln inkubiert. Mit diesen Flüssigkulturen wurden in der Folge Plasmidpräparationen durchgeführt (siehe 2.4.2).

2.4.7 Herstellung des *Eaat1*-Expressionsvektors

Um einen *Eaat1*-Expressionsvektor zu erstellen, wurde das *Gateway*-System der Firma Invitrogen verwendet. Dazu wurde zunächst der EST-Klon RE20434 ausgestrichen und verbreitert. In der Folge wurde eine Plasmidpräparation durchgeführt. Die codierende Sequenz von *Eaat1* wurde mittels PCR aus dem zuvor gewonnenen Plasmid amplifiziert.

Ansatz:

Hifi-Puffer	5 µl
dNTPs	0,75 µl
<i>Fwd</i> -Primer	0,75 µl
<i>Rev</i> -Primer	0,75 µl
RE20434-Miniprep	0,5 µl
Kapa-Hifi- <i>Taq</i>	0,5 µl
dH ₂ O	11,75 µl
<hr/>	
Gesamtvolumen	25 µl

Tabelle 6: Verwendete Primer der *Eaat1*-Aplifikation

Name	Sequenz
Eaat1-Fwd	5'-CACCATGACGCGACCCAAAC-3'
Eaat1-Rev	5'-TCATTCCTTCATCTCGTGGCCA-3'

Die PCR wurde bei 58 °C, 61,5 °C und 62,5 °C durchgeführt, wobei alle verwendeten Temperaturen gute Ergebnisse lieferten. In der Folge wurde eine PCR-Aufreinigung für alle drei Ansätze durchgeführt. Die codierende *eaat1*-Sequenz wurde mittels Topo-Klonierung nach Anweisung und mit den Reagenzien des Herstellers Invitrogen in den Entry-Vektor pENTR kloniert.

Ansatz:

PCR-Aufreinigung	1 µl (24 ng)
Salt-Solution	0,5 µl
dH ₂ O	1 µl
Topo pENTR-Vektor	0,5 µl (10 ng)
<hr/>	
Gesamtvolumen	3 µl

Der Ansatz wurde fünf Minuten bei RT inkubiert. Anschließend wurden 2 µl des Ansatzes verwendet, um chemisch kompetente Top10-Zellen (Invitrogen) zu transformieren. Die Zellen wurden behandelt, wie bereits in 2.4.6 beschrieben. Vorhandene Klone wurden bei 37 °C in Übernacht-Kultur genommen und am nächsten Tag einer Plasmidpräparation unterzogen.

Um sicherzustellen, dass die eingebaute *eaat1*-Sequenz intakt und in der richtigen Orientierung vorlag, wurden die präparierten Klone sequenziert. Positive Klone wurden weiterverwendet.

Zur Durchführung der LR-Clonase-Reaktion, wurden jeweils 75 ng Entry-(pENTR) und Destination-Vektor zusammen mit 0,5 µl LR-Clonase in einem 5 µl-Ansatz zur Reaktion gebracht. Das fehlende Volumen wurde mit TE-Puffer (im Kit enthalten) aufgefüllt. Dieser Ansatz wurde 1,5 Std. bei 25 °C inkubiert. Anschließend wurde das Enzym durch Zugabe von 1 µl Protease K-Lösung (ebenfalls im Kit enthalten) und 10-minütiger Inkubation bei 37 °C deaktiviert.

In der Folge wurde 1 µl der LR-Clonase-Reaktion verwendet, um chemisch kompetente DH5α-Zellen zu transformieren. Diese wurden behandelt wie bereits in 2.4.6 beschrieben.

Um sicherzustellen, dass die eingebaute *eaat1*-Sequenz intakt und in der richtigen Orientierung vorliegt, wurden auch hier die präparierten Klone sequenziert. Positive Klone wurden weiterverwendet.

2.4.8 Zellkultur

Zur Expression des *Eaat1::Venus*-Konstruktes wurden S2R+ Zellen verwendet. Dabei handelt es sich um eine adhärenz Abwandlung der ursprünglich von Schneider (Schneider, 1972) isolierten embryonalen S2-Zelllinie (Yanagawa *et al.*, 1998). Die Zellen wurden bei 25 °C in einem Inkubator gehalten. Dazu wurden Zellkulturflaschen mit einem Arbeitsvolumen von 6 ml verwendet. Alle Arbeiten wurden unter einer Sterilbank durchgeführt. Die Zellen wurden zweimal pro Woche in frisches M3-Zellkulturmedium (Shield and Sang Standardmedium (Sigma S8398-1L) mit 10 % fötalem Kalbserum (Thermo Fisher Scientific, 16000-036) und 1 % Penicillin/ Streptomycin (Sigma, P4333)) umgesetzt. Dazu wurden sie mit einem Zellspatel von der Oberfläche der Zellkulturflasche gelöst und im Verhältnis 1:3 in neues Medium überführt. Das Medium wurde wie folgt hergestellt:

Shield and Sang M3-Medium

39,36 g	Shield and Sang Pulver
1 g	Hefeextrakt (Sigma Y-1000)
2,5 g	Bactopepton (Difco 211677)
0,5 g	KHCO ₃ auf pH 6,6 einstellen

Alle Bestandteile wurden in 1 L dH₂O gelöst und durch einen 0,2 µm Filter in sterile Flaschen filtriert. Ein 50 ml Aliquot serumfreies Medium wurde für Transfektionen aufbewahrt. Der Rest wurde mit hitzeinaktiviertem fötalem Kalbsserum (10 %) und Penicillin/Streptomycin (1 %) versetzt. Die Kulturmedien wurden bei 4 °C bis zur Verwendung gelagert.

2.4.8.1 Transfektion der S2R+-Zellen

Zur Transfektion der S2R+-Zellen wurde das Transfektionsreagenz Fugene der Firma promega verwendet. Dazu wurden die Zellen zunächst aus den großen Kulturkammern entnommen und in ein steriles Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt. Die Konzentration der Zellen wurde mithilfe einer Zählkammer bestimmt und die Suspension wurde so verdünnt, dass eine Endkonzentration von 0,5 Mio. Zellen pro ml in die Experimentalkammern überführt werden konnte. Dann wurden jeweils 250 µl der verdünnten Zellsuspension in jede der acht Kammern gegeben. In der Folge wurden die Zellen 24 Std. bei 25 °C inkubiert, um eine Adhäsion der Zellen an die Oberfläche der Kulturkammern zu ermöglichen. Nach Ablauf dieser Zeit, wurde das Kulturmedium durch 200 µl serumfreies Medium ersetzt und die Zellen wurden wieder für eine Std. bei 25 °C inkubiert. Anschließend wurden 50 µl der Transfektionslösung in jede Kammer gegeben. Die Transfektionslösung für eine Kammer wurde wie folgt angesetzt:

Fugene	2 µl
Expressionsvektor	125 ng
Actin5C-GAL4-Vektor	62,5 ng
Serum-freies Medium	Ansatz auf 50 µl auffüllen

Danach wurden die Zellen erneut für 24 Std. bei 25 °C inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit, wurden die Kammern mittels eines Fluoreszenz-Mikroskops auf Zellen mit Expression des Venus-Tags überprüft. Das Experiment wurde mit Kammern, die positive Zellen enthielten, fortgesetzt. Dazu wurde das Medium der jeweiligen Kammer durch serumhaltiges Kulturmedium ersetzt, dem eine der zu testenden TA-Konzentrationen (5 mM, 500 µM, 50 µM, 5 µM, 0,5 µM, 0,05 µM) beigemischt war. Außerdem wurden zwei Kontrollkammern mitgeführt, einer dieser Kammern wurde kein TA zugemischt. Die andere Kammer enthielt Medium mit 50 µM TA, jedoch wurden die Zellen dieser Kammer nicht transfiziert, indem der Transfektionslösung hier kein Fugene zugegeben wurde. Die Zellen wurden in der Folge erneut für 24 Std. auf 25 °C inkubiert, um den Zellen Zeit zur Aufnahme des TA zu geben. Nach Ablauf der 24 Std. wurden die Zellen wie bereits in 2.3.4 beschrieben gegen TA und Venus als Marker für Eaat1 gefärbt.

3 Ergebnisse

Ziel der Arbeit war es, Erkenntnisse über die Funktion des Naz-Proteins zu gewinnen. Dazu wurde zunächst die Expression des Proteins im embryonalen und larvalen ZNS wildtypischer Tiere analysiert. Um weitere Rückschlüsse auf die Funktion von Naz zu ermöglichen, wurde das Verhalten von Exzisionsmutanten eines, im dritten Intron des *naz*-Gens lokalisierten, P-Elements sowie der Ausgangsstamm dieser Mutagenese untersucht. Die Ergebnisse dieser Untersuchung wiesen auf einen gestörten TA-Metabolismus der untersuchten Mutanten hin. Da sich im Zuge der Experimente herausstellte, dass die untersuchten Mutanten mit großer Wahrscheinlichkeit eine zweite unbekannte Mutation aufweisen, wurden die Experimente mit zwei RNAi-Linien wiederholt. Auch hier konnte der, auf einen gestörten TA-Metabolismus hindeutende, Phänotyp gefunden werden. Um die Hypothese, dass Naz am TA-Abbau beteiligt ist, zu untermauern, wurde der TA-Rezeptor-Antagonist Yohimbin (YH) an die Tiere verfüttert, um eine pharmakologische Rettung des gefundenen Verhaltensphänotyps zu erreichen. Zudem wurde ein hypothetischer Abbauweg für TA formuliert und der Versuch unternommen, diese Hypothese durch einige Experimente zu untermauern.

3.1 Expression des Nazgul-Proteins

Naz wird schon seit längerem als Marker für LG (von Hilchen *et al.*, 2010; Stacey *et al.*, 2010) und den longitudinalen Glioblasten (Birkholz *et al.*, 2013) verwendet. Die Beschreibungen des Expressionsmusters beschränken sich allerdings auf wenige embryonale Stadien der Entwicklung. Um ein detaillierteres Bild des Expressionsmusters zu erhalten, wurde die Expression von Naz in Embryonalen- und Larvenstadien untersucht.

3.1.1 Expression des Nazgul-Proteins im wildtypischen embryonalen VNS

Die Expression des Naz-Proteins im Verlauf der Embryonalentwicklung, wurde mit Antikörperfärbungen untersucht. Dabei zeigte sich, dass Naz ab Stadium (St.) 14 nachweisbar ist (Abb. 1B & B'). Im St. 13 war keine Proteinexpression detektierbar (Abb. 1A). Ab St. 14 kann Naz in vier bis sieben LG pro HS des abdominalen NS detektiert werden.

In St. 15-Embryonen konnten im Vergleich zum St. 14 deutlich mehr Naz-positive Zellen nachgewiesen werden. Naz wird hier in neun LG exprimiert, die sich regelmäßig dorsal des Neuropils anordnen (Abb. 1C & D). Zusätzlich wurde Naz-Expression auch in vier bis fünf Glia ventral des Neuropils festgestellt (Abb. 1E). Bei diesen Zellen handelt es sich um drei *cell body* Glia (CBG) (Pfeilspitzen in Abb. 1E) sowie eine *subperineurial* Glia (SPG) (Dreiecke in Abb. 1E; Klassifizierung auf Basis der Position im VNS und der Nomenklatur aus Beckervordersandforth *et al.*, 2008). Dies war jedoch nur unter Verwendung eines affinitätsgereinigten

Kaninchenantikörpers (α -Naz rab afp) möglich. Im St. 15 konnte Naz-Expression im Median in 14 Glia des abdominalen VNS nachgewiesen werden.

Im St. 16 der Embryonalentwicklung konnten, wie bereits beschrieben (von Hilchen *et al.*, 2010), neun Naz-exprimierende Zellen pro HS detektiert werden (Abb. 1F & G). Dabei handelt es sich ausschließlich um LG, die sich dorsal des Neuropils befinden.

In St. 17-Embryonen wurde erneut eine Änderung des Naz-Expressionsmusters festgestellt. Hier konnten nur noch sechs Naz-exprimierende Glia pro HS festgestellt werden (Abb. 1H). Von diesen befinden sich fünf dorsal und jeweils eine ventral des Neuropils. Da alle diese Zellen ebenfalls den Transkriptionsfaktor *Pros* exprimieren, können sie dem A- & M-Cluster der LG zugeordnet werden (Beckervordersandforth *et al.*, 2008).

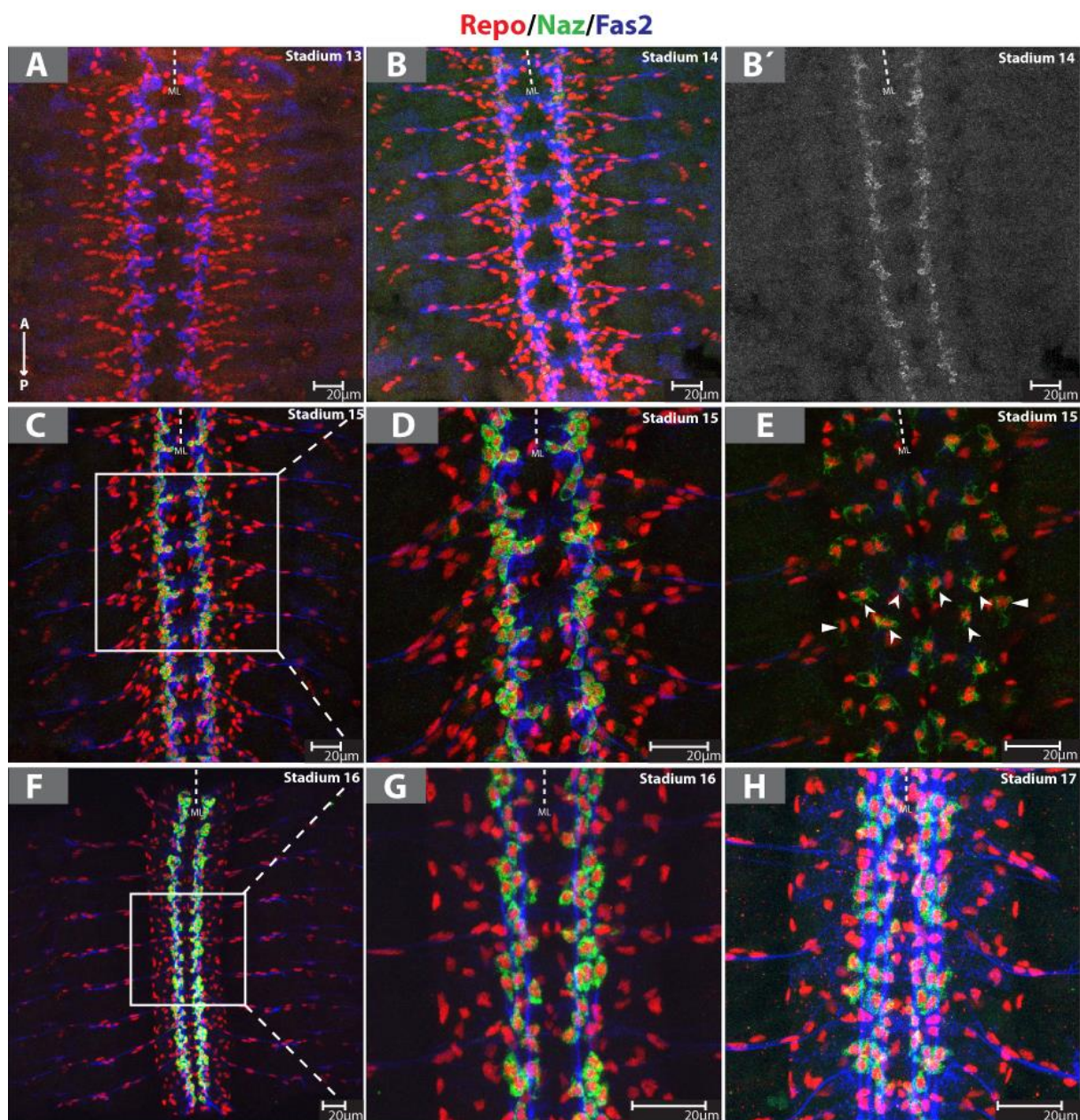


Abbildung 1: Nazgul-Expression im embryonalen VNS wildtypischer Tiere (Abbildungsunterschrift siehe nächste Seite)

Abbildung 1: Nazgul-Expression im embryonalen VNS wildtypischer Tiere

Antikörperfärbungen gegen Naz (grün), Repo (rot) als Gliazellmarker und Fasciclin 2 (blau) als Segment- und Neuropilmarker. Gezeigt werden Filetpräparate von Embryonen der Stadien 13-17. Alle Bilder sind Maximalprojektionen konfokaler LSM Bilderstapel. Anterior oben. ML: Mittellinie. Im Verlauf der Embryonalentwicklung kann Naz ab St. 14 immunhistochemisch nachgewiesen werden. In St. 13 konnte das Protein nicht detektiert werden. **A:** VNS eines St. 13-Embryos. **B:** VNS eines St. 14-Embryos. Hier ist bereits ein schwaches Signal des α -Naz-Antikörpers detektierbar. **B':** Naz-Kanal aus B. **C:** VNS eines St. 15-Embryos. Hier ist ein deutliches Signal des α -Naz-Antikörpers zu erkennen. Es wurden 14 Naz-positive Glia pro HS des abdominalen VNS gefunden. **D:** Vergrößerung von vier abdominalen Segmenten aus C. Besonders die neun dorsal des Neuropils liegenden LGs sind gut zu erkennen. **E:** Ventral des Neuropils gelegener Bereichs eines St. 15-Embryos. Hier liegen weitere vier Naz-positive Zellen pro HS des abdominalen VNS. Dabei handelt es sich um drei CBG und eine SPG pro HS. Pfeilspitzen markieren CBG, Dreiecke markieren SPG. **F:** VNS eines St. 16-Embryos. In diesem Stadium konnte nur in LGs Naz-Expression nachgewiesen werden. **G:** Vergrößerung von drei Segmenten aus F. **H:** Vergrößerte Darstellung von drei abdominalen Segmenten eines St. 17-Embryos. Die Zahl der Naz-positiven Zellen nimmt hier weiter auf sechs Zellen pro HS ab.

3.1.2 Expression des Nazgul-Proteins im wildtypischen larvalen VNS

Im VNS der Larve entspricht die Organisation der Naz-exprimierenden Glia im Wesentlichen der des St. 17-Embryos. Da keine Unterschiede zwischen Larven des ersten, zweiten und des dritten Larvenstadiums (L3) festgestellt werden konnten, wird das Naz-Expressionsmuster hier lediglich am Beispiel der L3 Larve beschrieben.

Im dritten Larvenstadium sind pro HS (ein HS wurde in Abb. 2A, E & I durch eine graue gestrichelte Linie hervorgehoben. Die diesem HS zugeordneten Glia sind durch Pfeile markiert.) des ventralen abdominalen NS sechs Naz-exprimierende Zellen vorhanden. Die Zellkörper dieser Zellen sind um das Neuropil angeordnet, senden jedoch auch Fortsätze in dieses hinein (Abb. 2E & F). In den meisten Fällen finden sich vier Naz-positive Zellen dorsal des Neuropils (Abb. 2A & B). Im medialen Bereich des VNS ist jeweils eine Zelle lateral des Neuropils zu finden (Abb. 2E & F). Ventral des Neuropils ist pro HS eine weitere Naz-positive Zelle vorhanden, die sich nah an der Mittellinie befindet (Abb. 2I & J). In seltenen Fällen wurden in thorakalen Segmenten an dieser Position zwei Zellen beobachtet (Abb. 2I, J & K) (Ito *et al.*, 1995). Naz-positive Zellen senden Zellfortsätze in das Neuropil (Abb. 2I'; die hier gezeigten Zellen sind in Abb. 2A, E, I & I' durch Pfeilspitzen markiert. Die weiße gestrichelte Linie markiert die Schnittebene der z-Projektion) und werden aufgrund ihrer Morphologie sowie molekularer und funktioneller Eigenschaften seit einiger Zeit als *Drosophila* Astrozyten oder Astrozyten-ähnliche Glia (ALG) bezeichnet (Awasaki *et al.*, 2008, Stork *et al.*, 2014, Peco *et al.*, 2016). Alle Naz-positiven Zellen des VNS exprimieren zudem den Transkriptionsfaktor Pros, was eine eindeutige Klassifizierung als ALGs zulässt (Peco *et al.*, 2016) (Abb. 2A, E, I & D, H, L).

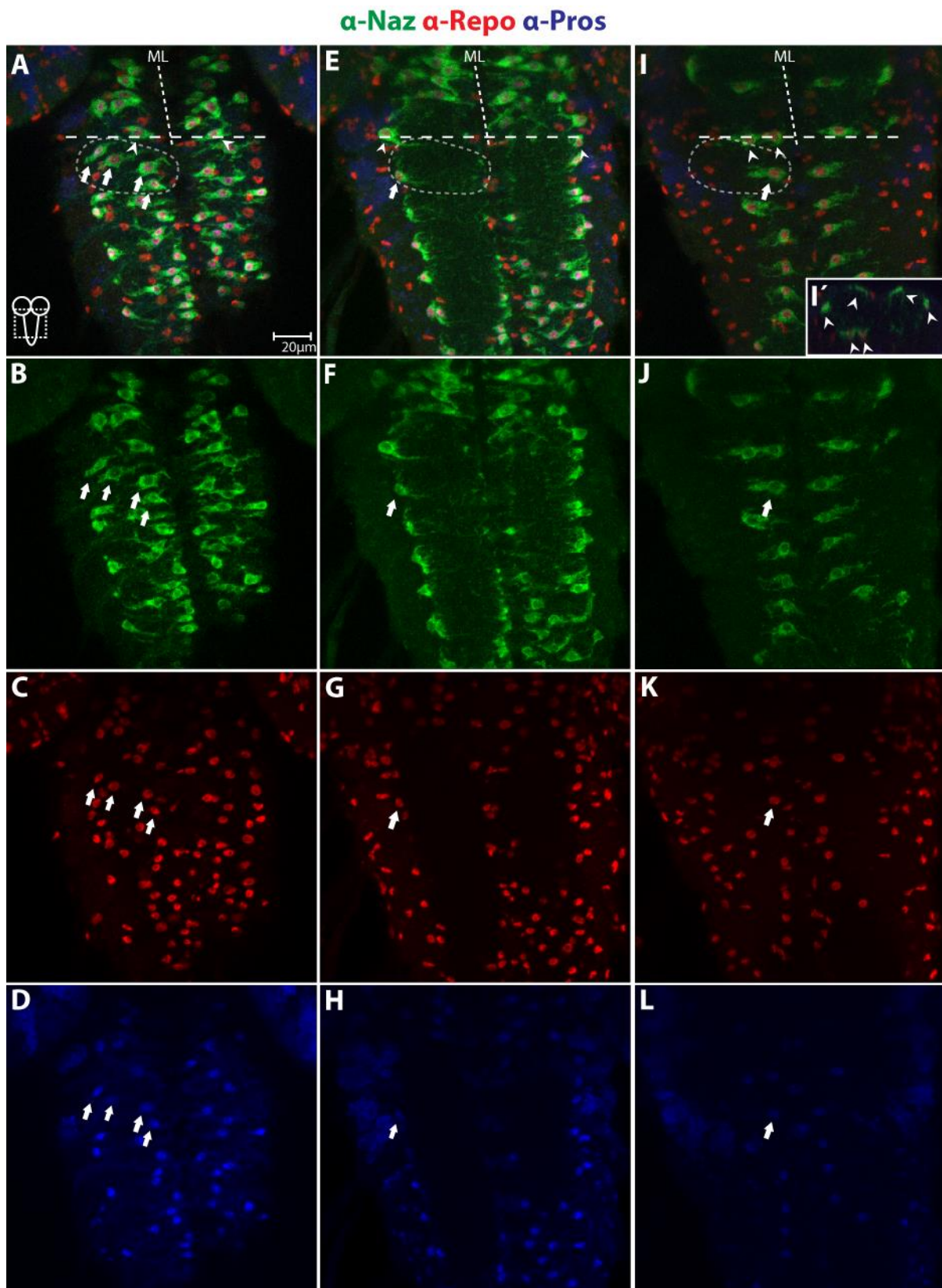


Abbildung 2: Nazgul-Expression im VNS wildtypischer Larven des dritten Larvenstadiums

(Bildunterschrift auf der nächsten Seite)

Abbildung 2: Nazgul-Expression im VNS wildtypischer Larven des dritten Larvenstadiums

Gezeigt sind Maximalprojektionen von Separationen des dorsalen (**A-D**), medialen (**E-H**) und ventralen (**I-L**) Bauchmarks. **A, E & I** sind Überlagerungen der Kanäle für Naz, Repo und Pros. Naz-positive Zellen eines HS sind mit Pfeilen markiert. Ein HS wurde durch eine graue gestrichelte Linie hervorgehoben **I'** zeigt eine z-Projektion entlang der geraden gestrichelten Linie in A, E & I. Hier ist zu erkennen, dass die Naz-positiven Zellen ihre Fortsätze ins Innere des Neuropils entsenden. Die in **I'** gezeigten Zellen sind in A, E & I mit Pfeilspitzen markiert. **B, F & J** zeigen Naz. **C, G & K** zeigen Repo. **D, H & L** zeigen Pros. Anterior oben. ML: Mittellinie.

3.1.3 Nazgul-Expression in den Gehirnhemisphären wildtypischer L3-Larven

Auch in den Hemisphären des Gehirns sind Naz-exprimierende Glia zu finden (Abb. 3). Hier können zwei Populationen Naz-exprimierender Glia unterschieden werden. Im Bereich des Zentralhirns befinden sich pro Hemisphäre ca. 22 Naz-positive neuropilassozierte Glia. Wie die im VNS gefundenen Zellen umschließen sie zentral gelegene Neuropilstrukturen und senden Fortsätze in diese aus (gerade Pfeile in Abb. 3B & Abb. 4). Außerdem wurden Naz-exprimierende Glia im optischen Lobus gefunden (geschwungener Pfeil in Abb. 3B & Abb. 5).

Alle Naz-positiven neuropilassozierten Glia des zentralen Gehirns exprimieren auch hier Pros (beispielhaft gezeigt in Abb. 4). Zudem besitzen sie, die für ALGs typischen, im Vergleich zu Neuronen und anderen Glia, deutlich größeren Kerne (Omoto *et al.*, 2015) (Abb. 4C). Die Fortsätze, die sie ins Neuropil entsenden, sind durch die zytoplasmatische Lokalisation von Naz deutlich zu erkennen (Abb. 4B). Aufgrund dieser Eigenschaften können die Naz-positiven Glia des Zentralhirns als primäre ALGs klassifiziert werden (Omoto *et al.*, 2015).

Wie bereits erwähnt, finden sich auch im sich entwickelnden optischen Lobus Glia, die Naz exprimieren (Abb. 5A, B & F, G). Sie sind am proximalen Rand der Medulla lokalisiert und besitzen im Vergleich zu den ALGs des Zentralhirns nur sehr kleine Kerne (Abb. 5C). Außerdem sind sie sehr dicht beieinander (Abb. 5C & H). In diesen Zellen konnte keine Expression von Pros festgestellt werden (Abb. 5E & I).

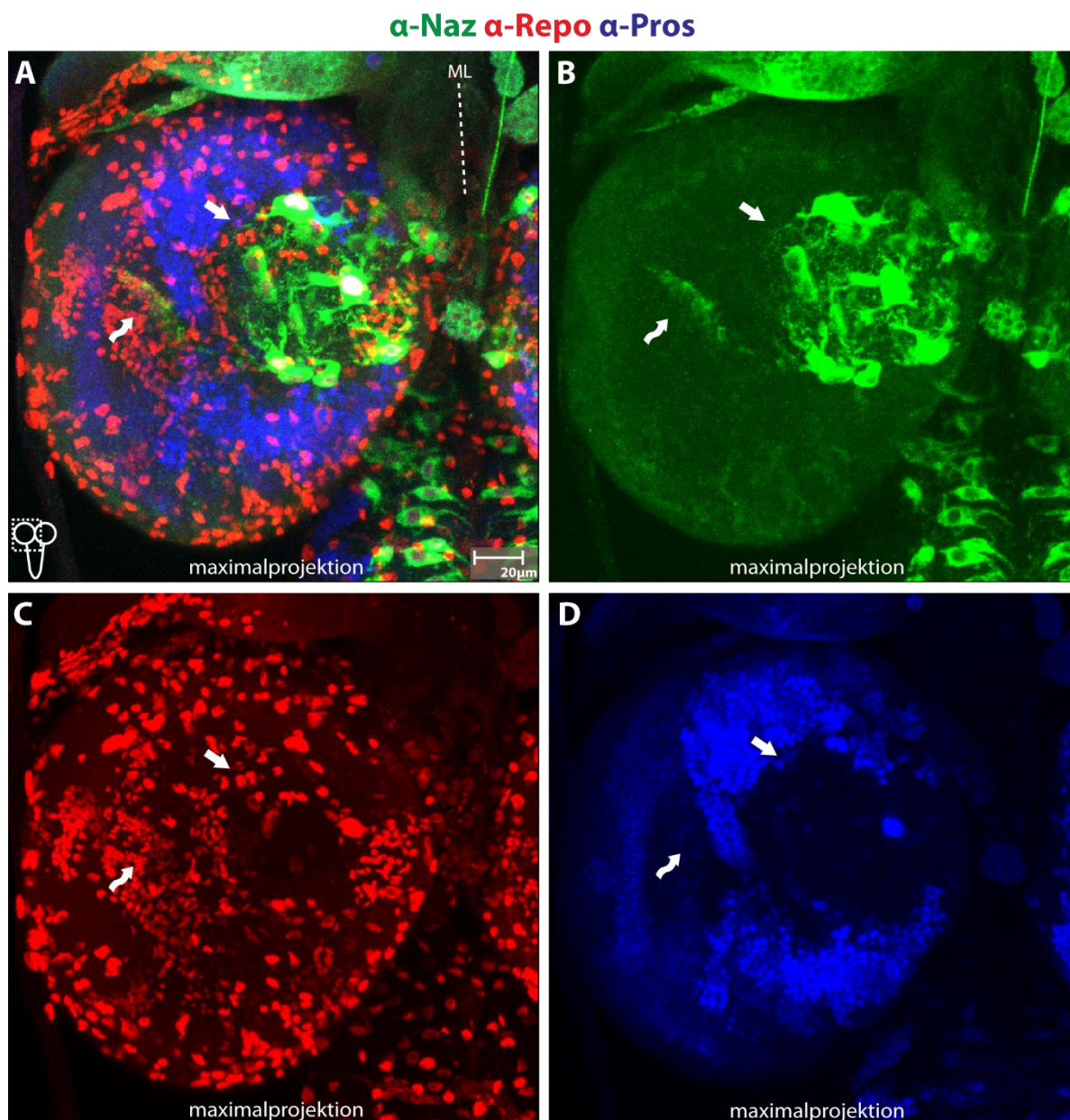


Abbildung 3: Nazgul-Expression in den Gehirnhemisphären wildtypischer L3-Larven

Gezeigt sind Maximalprojektionen konfokaler LSM-Bilderstapel einer Hemisphäre des Gehirns einer L3-Larve. Gefärbt wurde gegen Naz, Repo & Pros. Anterior oben. ML: Mittellinie. **A:** Überlagerung der Kanäle von Naz, Repo & Pros. **B:** Expression von Naz. Der gerade Pfeil markiert neuropilassozierte Glia des Zentralhirns. Der geschwungene Pfeil markiert Naz-exprimierende Zellen des optischen Lobus. **C:** AK-Färbung gegen Repo als Gliazellmarker. **D:** AK-Färbung gegen Pros.

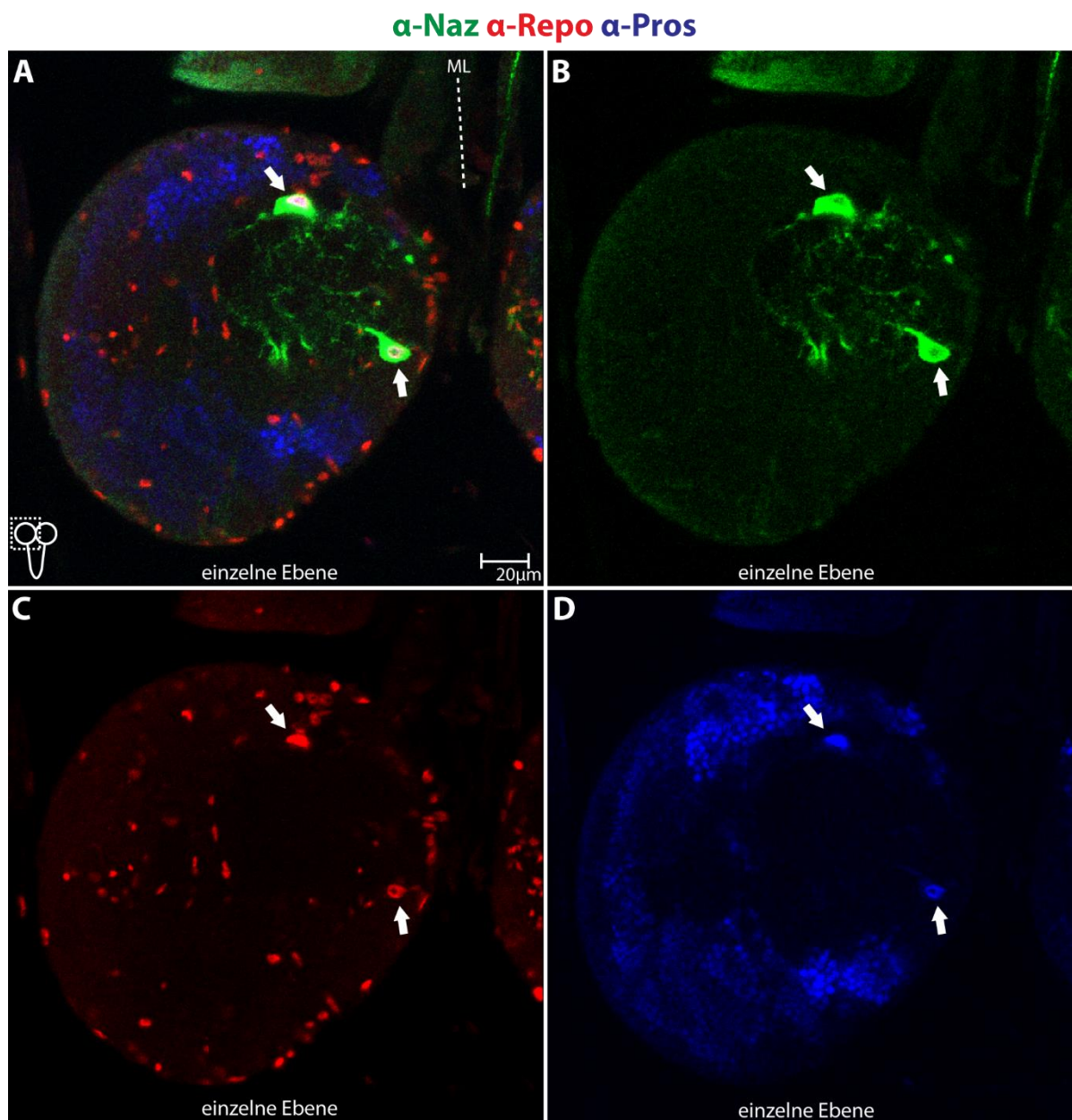


Abbildung 4: Nazgul-Expression in Neuropil-assoziierten Glia des Zentralhirns

Gezeigt ist eine einzelne Ebene eines LSM-Bilderstapels der in Abb.3 gezeigten Hemisphäre des Gehirns einer L3-Larve. Gefärbt wurde gegen Naz, Repo & Pros. Anterior oben. ML: Mittellinie. Die geraden Pfeile markieren Neuropil-assoziierte Glia des Zentralhirns. **A**: Überlagerung der Kanäle von Naz, Repo & Pros. **B**: Expression von Naz. **C**: AK Färbung gegen Repo als Gliazellmarker. **D**: AK Färbung gegen Pros.

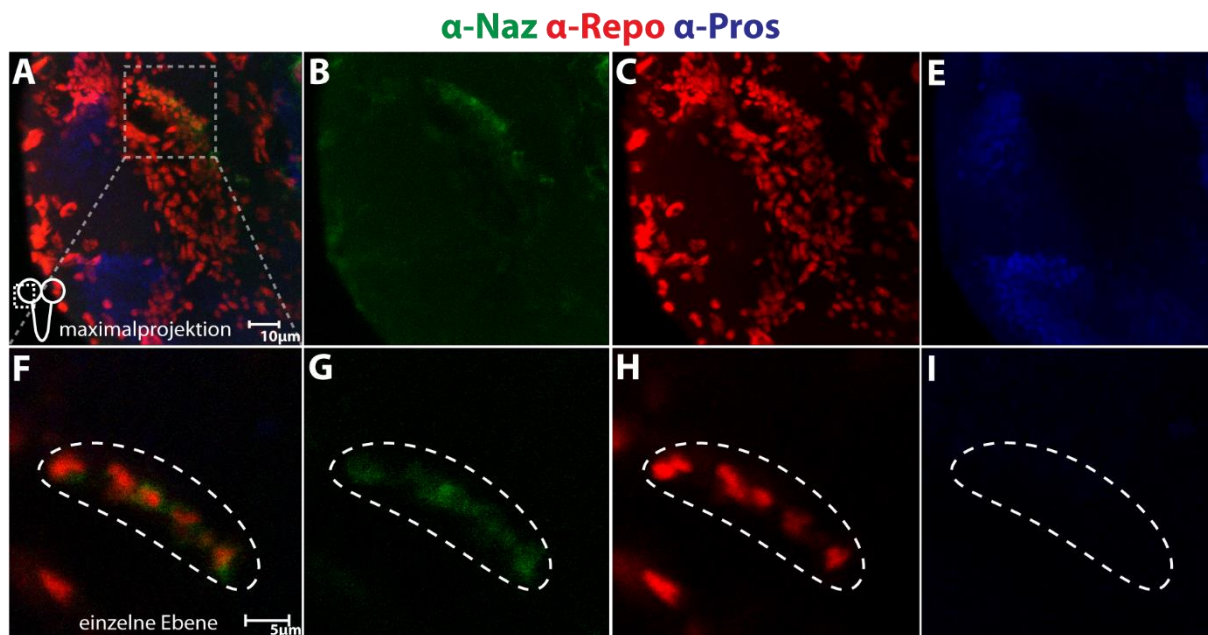


Abbildung 5: Nazgul-Expression im optischen Lobus wildtypischer L3-Larven

Naz-exprimierende Glia im optischen Lobus. Gezeigt sind Maximalprojektionen (A-E) und Vergrößerungen der Naz-exprimierenden Zellen als einzelne Ebenen (F-I). Im Gegensatz zu den neuropilassoziierter Glia des Zentralhirns und des VNS weisen die Naz-positiven Glia des optischen Lobus keine Pros-Expression auf. (E & I)

3.1.4 Nazgul wird auch in wenigen nicht-glialen Zellen exprimiert

Neben den Naz-exprimierenden Glia wurden auch einige Naz-positive Zellen gefunden, die keine Repo-Kernfärbung aufwiesen. Sowohl im Zentralhirn als auch in thorakalen und abdominalen Segmenten konnten einzelne nicht-Repo-positive Zellen gefunden werden. Im anterioren Bereich des Zentralhirns findet sich pro Lobus eine Naz-exprimierende Zelle ohne Repo-Expression (Abb. 6A). Im ventralen Bereich des VNS wurde jeweils eine Naz-positive Zelle in direkter Nachbarschaft zu den ventral des Neuropils gelegenen Naz-positiven Glia gefunden (Abb. 6B). In den thorakalen Segmenten T2 und T3 wurde pro HS jeweils eine Naz-positive Zelle ohne Repo-Expression gefunden (Abb. 6C & D). Diese konnten allerdings erst durch die neueren Antikörper α -Naz Rab afp und α -Naz GP GST sichtbar gemacht werden. Diese Zellen wurden nicht weitergehend klassifiziert.

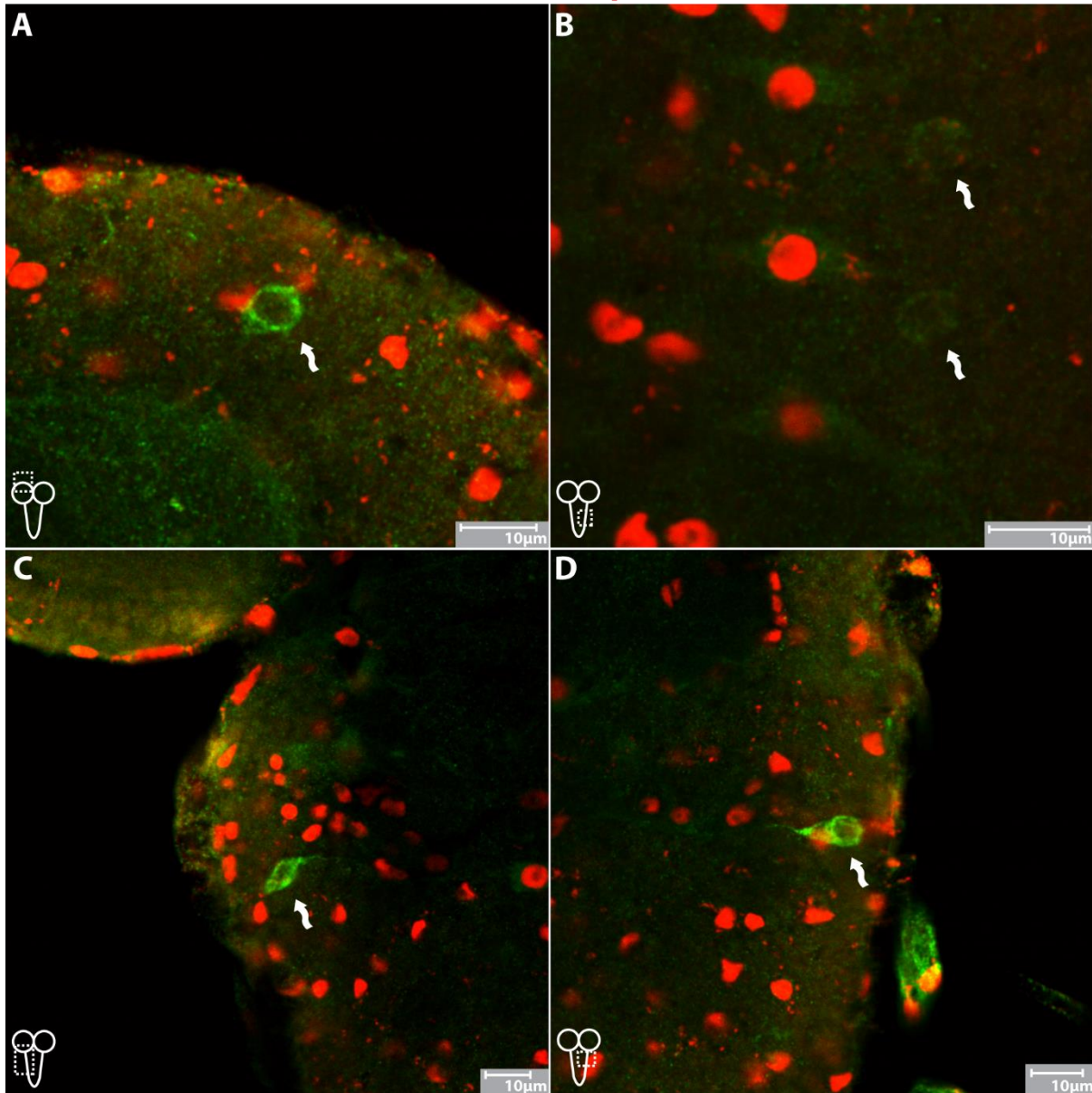
α -Naz α -Repo

Abbildung 6: Nazgul-Expression in Repo-negativen Zellen

Expression von Naz wurde auch in einigen Repo-negativen Zellen gefunden. Diese befanden sich im VNS und im Zentralhirn. Geschwungene Pfeile markieren die jeweiligen Zellen. **A:** Eine Naz-positive Zelle ohne Repo-Expression im Zentralhirn. **B:** Naz-positive Zelle ohne Repo-Expression in abdominalen HS des VNS. **C:** Naz-positive Zelle ohne Repo-Expression in einem HS des zweiten thorakalen Segments. **D:** Naz-positive Zelle ohne Repo-Expression in einem HS des dritten thorakalen Segments.

3.2 Untersuchung von *nazgul*-Exzisionsmutanten

Zu Beginn dieser Untersuchung standen drei, von Benjamin Altenhein generierte, Exzisionsmutanten zur Verfügung. Diese wurden durch unpräzise Exzision eines suppressor P-Elements (P{SUPor-P}), das im dritten Exon des *naz*-Lokus inseriert war, erzeugt. Die Mutagenese wurde in der Hoffnung durchgeführt, dass durch unpräzise Exzision des P-Elements ebenfalls flankierende Sequenzbereiche deletiert würden. Erfolgreiche Exzisionsereignisse wurden durch den Verlust der Expression des auf dem P-Element vorhandenen *mini-white* Gens sowie vorhandener Letalität selektiert. Resultat dieser Selektion waren drei pupal letale Linien, die den Versuchsansätzen entsprechend als *nazgul*^{Δ1-17}, *nazgul*^{Δ1-36} und *nazgul*^{Δ2-11} bezeichnet wurden.

3.2.1 Nazgul-Expression der *nazgul*-Exzisionsmutanten

Die drei zur Verfügung stehenden *naz*-Mutanten wurden mit Hilfe von AK-Färbungen auf ihre Naz-Expression hin untersucht. Dabei konnte in allen drei Stämmen Proteinexpression festgestellt werden. Die Stämme *nazgul*^{Δ1-17} und *nazgul*^{Δ2-11} zeigten im Vergleich zu wildtypischen Tieren keinen Unterschied des larvalen Naz-Expressionsmusters. Alle im WT vorhandenen Naz-positiven Zellen konnten auch hier detektiert werden. Dabei war das Protein im ZNS von Larven des Stammes *nazgul*^{Δ2-11} gut detektierbar (Abb. 7G-I). In Tieren des Stammes *nazgul*^{Δ1-17} wurde in den meisten Fällen nur ein schwaches Signal des Naz-Proteins detektiert (Abb. 7D-F). Zur Verdeutlichung des korrekten Expressionsmusters ist hier das Tier mit dem stärksten Signal dargestellt. Sowohl in *nazgul*^{Δ1-17} als auch in *nazgul*^{Δ2-11} entsprach die Anzahl der Naz-positiven Zellen der des Wildtyps (WT).

Der Stamm *nazgul*^{Δ1-36} hingegen zeigte nur eine sehr schwache Expression des Naz-Proteins. Diese konnte mit dem initial verfügbaren Antiserum α-Naz GP1 nicht detektiert werden. Erst nachdem die wesentlich besser funktionierenden Seren α-Naz rab afp und α-Naz GP GST zur Verfügung standen, konnte hier ebenfalls Naz-Expression nachgewiesen werden (Abb. 7A-C). Das Protein ist jedoch auch mit diesen Seren nur in manchen Zellen nachweisbar (gerader Pfeil in Abb. 7C). In den meisten Zellen konnte auch mit den verbesserten Seren keine Naz-Expression festgestellt werden. Interessanterweise scheinen die Naz-positiven Neurone nicht in Ihrer Naz-Expression beeinträchtigt zu sein (geschwungene Pfeile in Abb. 7C). Diese wurden in allen, mit den beiden potenten Antiseren gefärbten, Präparaten gefunden. In den Mutanten des Stammes *nazgul*^{Δ1-36} ist also zumindest in Glia eine stark verminderte Expression des Naz-Proteins zu verzeichnen.

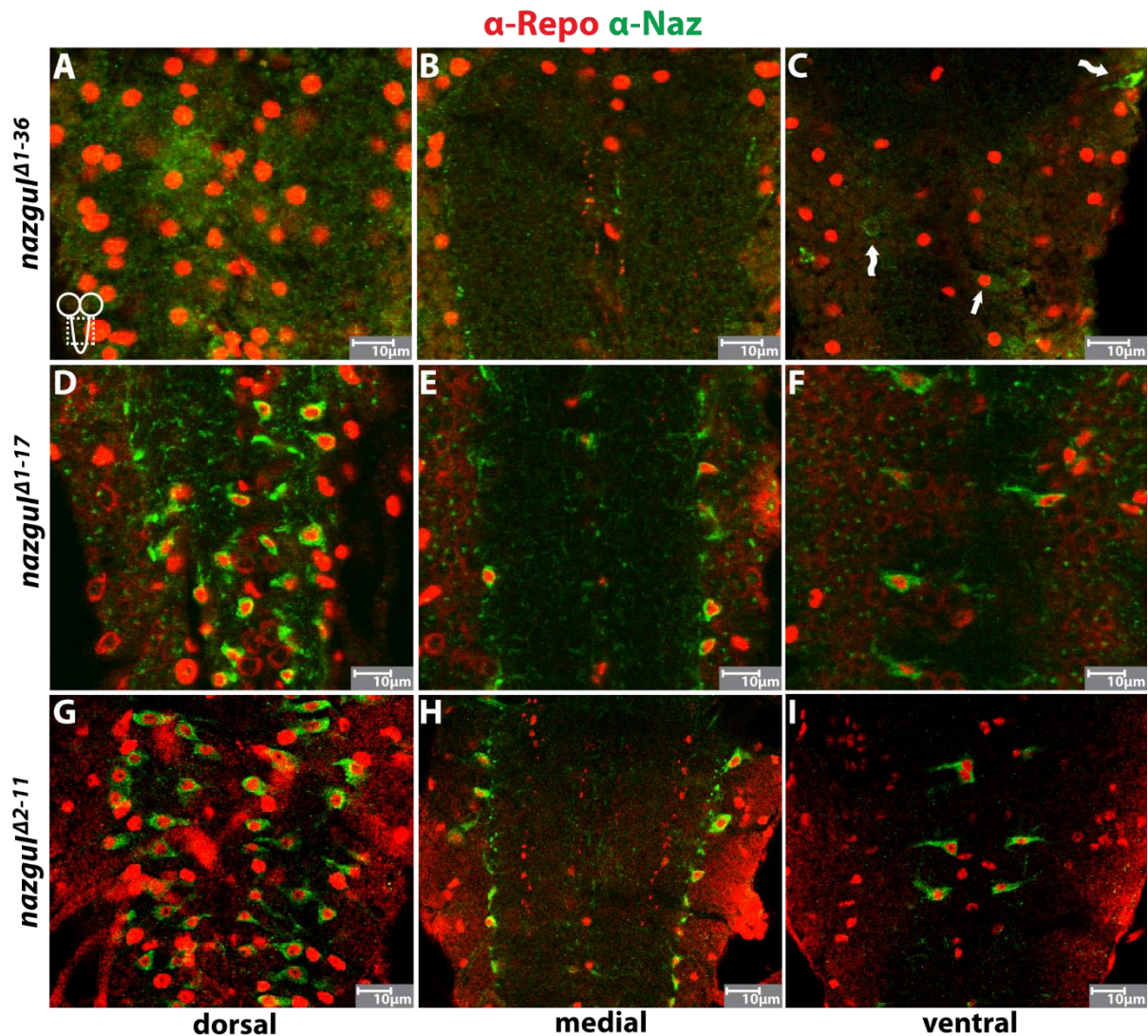


Abbildung 7: Expression des Nazgul Proteins im VNS der untersuchten Exzisionsmutanten

Expression des Naz-Proteins der drei untersuchten Mutanten *nazgul*^{Δ1-36}, *nazgul*^{Δ1-17} und *nazgul*^{Δ2-11}. Gefärbt wurde der Gliazellmarker Repo und Naz. Es wird jeweils der Bereich dorsal des Neuropils (A, D & G), der mediale Bereich des Neuropils (B, E & H) sowie der Bereich ventral des Neuropils (C, F & I) dargestellt. Alle Bilder sind Einzelebenen. **A-C**: Die Naz-Expression in *nazgul*^{Δ1-36} ist sehr schwach und kann nur in wenigen Glia des VNS nachgewiesen werden (Pfeil in C). Die Naz-positiven Neurone scheinen davon jedoch nicht betroffen (geschwungene Pfeile in C). Hier wurde das Antiserum Rab1 afp verwendet. **D-F**: Naz-Expression in *nazgul*^{Δ1-17}. Es konnten keine Unterschiede zur WT Expression festgestellt werden. Hier wurde das Antiserum α -Naz GP1 verwendet, daher sind die in *nazgul*^{Δ1-36} markierten Neurone nicht zu sehen. **G-I**: Naz-Expression in *nazgul*^{Δ2-11}. Es konnten keine Unterschiede zur WT-Expression festgestellt werden. Hier wurde ebenfalls das Antiserum GP1 verwendet.

3.2.2 Kartierung der *nazgul*-Exzisionsmutationen

Um ein genaueres Bild der erzeugten Mutationen innerhalb des *naz*-Gens zu erhalten, wurden die Exzisionsmutanten auf Änderungen des *naz*-Lokus hin untersucht. Dabei zeigte sich, dass bei den Mutanten Linien *nazgul*^{Δ1-17} und *nazgul*^{Δ1-36} immer noch Reste des P-Elements im dritten Intron des *naz*-Lokus vorhanden waren. Die Annahme, dass durch unpräzise Exzision des P-Elements ebenfalls flankierende Sequenzen deletiert würden, konnte bei diesen beiden Linien nicht bestätigt werden. Der Locus der P-Elementinsertion wurde, ausgehend von DNA-Präparationen wildtypischer, sowie einzelner Tiere der drei Exzisionsmutanten, mittels PCR amplifiziert. Hier ergab sich bei wildtypischen Tieren eine Produktlänge von 6 kb. Während für *nazgul*^{Δ2-11} ein PCR-Produkt derselben Länge erhalten wurde, waren die PCR-Produkte der Mutanten *nazgul*^{Δ1-17} und *nazgul*^{Δ1-36} deutlich länger. Die Mutante *nazgul*^{Δ1-17} ergab ein Fragment von ca. 8,5 kb. In *nazgul*^{Δ1-36} wurde ein Fragment von ca. 12 kb gefunden (Abb. 8A).

Um zu prüfen, ob es sich tatsächlich um Überreste der P-Elementsequenz handelt, wurden die PCR-Produkte aller drei Mutanten in Vektoren kloniert und ansequenziert. Sowohl in *nazgul*^{Δ1-17} als auch in *nazgul*^{Δ1-36} konnten Sequenzen des ursprünglichen suppressor-P-Elements nachgewiesen werden. Erstaunlicherweise waren in beiden Fällen Sequenzen beider Enden des P-Elements nachweisbar. Durch die Mobilisierung wurden also nur P-Element-interne Sequenzen deletiert (Abb. 8B)

Die Sequenzierung des Stammes *nazgul*^{Δ2-11} ergab eine kleine Deletion von 13 Basenpaaren an der Exzisionsposition. Hier wurden keine Überreste des P-Elements gefunden.

Um zu prüfen, ob die Veränderungen innerhalb des *naz*-Lokus einen Effekt auf die mRNA, zum Beispiel durch den Einbau von Teilen des zumindest noch teilweise vorhandenen *yellow* Gens haben, und damit zur Bildung eines nicht funktionalen Proteins führen, wurde der Versuch unternommen, die *naz*-mRNA der Mutanten zu sequenzieren. Dies konnte bei den Mutanten *nazgul*^{Δ1-17} und *nazgul*^{Δ2-11}, jedoch nicht bei *nazgul*^{Δ1-36} erreicht werden. Hier gelang es nicht eine cDNA herzustellen. Die mRNAs der beiden Mutanten *nazgul*^{Δ1-17} und *nazgul*^{Δ2-11} konnten sequenziert werden. Die Erwartung, größere durch verbleibende P-Elementsequenzen in *nazgul*^{Δ1-17} oder die Deletion in *nazgul*^{Δ2-11} verursachte Veränderungen vorzufinden, wurde jedoch nicht bestätigt.

Die mRNA der Mutante *nazgul*^{Δ2-11} wies im translatierten Bereich keine reproduzierbaren Abweichungen von der wildtypischen, in der Datenbank (*flybase.org*) hinterlegten, mRNA-Sequenz auf. In zwei unabhängigen Versuchen konnten einmal neun und einmal vier Punktmutationen festgestellt werden. Diese waren jedoch nicht identisch und werden daher als methodische Artefakte betrachtet (Abb. 8C & D).

Die mRNA der Mutante *nazgul*^{Δ1-17} zeigte drei Punktmutationen im Exon zwei. Angesichts des großen Abstands zum Insertionsort des P-Elements von ca. 4kb und der hohen Fehlerhäufigkeit in den *nazgul*^{Δ2-11}-Sequenzierungen, werden diese ebenfalls als methodische Artefakte betrachtet. In keinem Fall konnte eine Beeinträchtigung der Exonübergänge oder der Einbau ektopischer Sequenzen gezeigt werden (Abb. 8C & D). Die Sequenzierungen der mRNAs der Mutanten *nazgul*^{Δ2-11} und *nazgul*^{Δ1-17} wurde im Rahmen einer von mir betreuten Bachelorarbeit unter Mithilfe von Simone Lanzendörfer durchgeführt (Lanzendörfer, Bachelorarbeit, 2012).

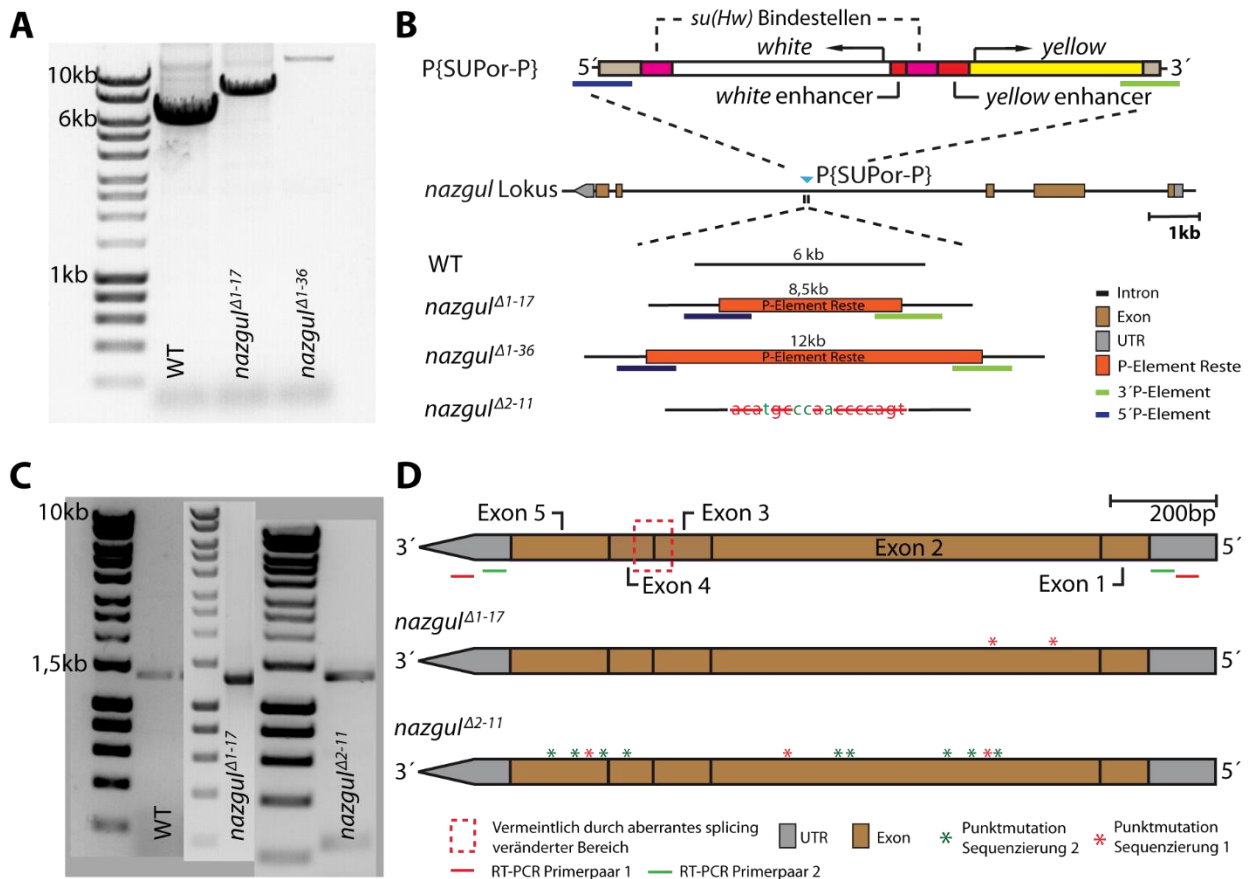


Abbildung 8: Molekulargenetische Untersuchung der *nazgul*-Mutanten

Die vorhandenen *naz*-Mutanten wurden auf Veränderungen des Genlokus sowie der mRNA hin untersucht. **A:** Ergebnis der Amplifikation des P-Element-Insertionsortes im dritten Intron des *naz*-Lokus für WT, *nazgul*^{Δ1-17} und *nazgul*^{Δ1-36}. Es konnten deutliche Größenunterschiede der PCR-Produkte festgestellt werden. **B:** Schematische Darstellung der Ergebnisse nach Sequenzierung der jeweiligen *naz*-Lozi. Oben: Struktur des mobilisierten P-Elements P{SUPor-P} in der vorgefundenen Orientierung zum *naz*-Lokus (Struktur des P-Elements verändert nach Rosemann et al., 1995). Mitte: Struktur des *naz*-Lokus. Das blaue Dreieck markiert den Insertionsort. Unten: Schematische Darstellung der in den einzelnen Mutanten vorgefundenen Zustände. Die sequenzierten Bereiche sind grün (3' Ende des P-Elements) und blau (5' Ende des P-Elements) unterstrichen. In *nazgul*^{Δ1-17} und *nazgul*^{Δ1-36} sind nach der Exzision unterschiedlich große Reste des P-Elements verblieben. In *nazgul*^{Δ2-11} fehlen die 13 rot markierten und durchgestrichenen Basen. **C:** Ergebnis der cDNA-Synthesen von WT, *nazgul*^{Δ1-17} und *nazgul*^{Δ2-11}. Es konnten keine Größenunterschiede gezeigt werden. **D:** Schematische Darstellung der *nazgul*-mRNA (oben) und der Ergebnisse der cDNA-Sequenzierungen. Es konnten keine Veränderungen der mRNA in Bezug auf aberrantes Splicing festgestellt werden.

3.2.3 Verhaltensversuche mit *nazgul*-Mutanten

Um erste Anhaltspunkte für die Funktion des Naz-Proteins zu erhalten, wurden mit den verfügbaren *naz*-Mutanten Verhaltensversuche durchgeführt. Es wurden drei homozygot pupal letale Linien einer P-Element-Exzisionsmutagenese, der Ausgangsstamm dieser Mutagenese, sowie transheterozygote der *nazgul*^{Δ1-36}-Mutante über einer *naz* einschließenden Defizienz untersucht.

3.2.4 Mutationen im *nazgul*-Lokus führen zu erhöhten Richtungsänderungsraten

Das Verhalten aller untersuchten *naz*-Mutanten zeigt deutliche Abweichungen von dem wildtypischer Tiere. Bei wildtypischen Tieren ist, unter den verwendeten Bedingungen, ein ausgeprägtes Explorationsverhalten zu beobachten. Dieses lässt sich in zwei Teile untergliedern. Die meiste Zeit verbringen die Tiere mit linearer Fortbewegung. Diese wird allerdings in regelmäßigen Abständen von kurzen Stopps unterbrochen, in denen die Tiere ihre Geschwindigkeit stark verringern und es zu größeren Drehungen des Kopfes kommt (Abb. 9A). Diese Stopps werden außerdem dazu genutzt, größere Richtungsänderungen durchzuführen, weshalb sie in der Fachliteratur auch als *stop turn* bezeichnet werden. So entsteht ein stereotypes Bewegungsmuster, in dem sich Phasen linearer Fortbewegung und Pausen mit größeren Richtungsänderungen abwechseln (Abb. 9A').

Bei *naz*-mutanten Tieren wurden starke Abweichungen von dem zuvor für Wildtypen beschriebenen Muster beobachtet. Die Tiere zeigten so gut wie keine, oder nur sehr kurze, Phasen linearer Fortbewegung. Dafür waren sie die meiste Zeit mit Drehungen des Kopfes beschäftigt (Abb. 9B'). Trotz konstanter Aktivität entfernten sich die mutanten Tiere nicht weit vom Ursprungsort. Im Vergleich zu wildtypischen Tieren waren deutlich mehr *stop turns* zu beobachten, die meist direkt aufeinander folgten (Abb. 9B).

Der statistische Vergleich von WT- und *nazgul*^{Δ1-36}-Tieren zeigte eine signifikante Erhöhung der Richtungsänderungsrate (Erläuterungen zur Berechnung in Kapitel 2.2.3 und 2.2.4) (Mann-Whitney Rank Sum Test (MWRST): $P < 0,001$) (Abb. 10A). Während wildtypische Tiere eine mediane Richtungsänderung von $2,744^\circ$ aufweisen, erreichen die *nazgul*^{Δ1-36}-Tiere einen deutlich höheren Wert von $6,723^\circ$ (Abb. 10A).

Die Analyse der Frequenzen, mit der bestimmte Richtungsänderungen auftreten ergab, dass Richtungsänderungen von 0° bis 10° wesentlich seltener auftreten (MWRST: $P < 0,001$) (Abb. 10B). Bis auf die zwei Gruppen 140° - 150° und 160° - 170° , für die kein signifikanter Unterschied zwischen WT und *nazgul*^{Δ1-36}-Tieren festgestellt werden konnte, traten Richtungsänderungen über 10° bei den *nazgul*^{Δ1-36}-Tieren immer signifikant häufiger auf als bei WT-Tieren (statistische Daten für diese Auswertung inklusive P-Werte sind in Tab. 8 im Anhang zu finden) (Abb. 10B).

Auch der Vergleich der Anzahl von *stop turns*, die in zwei Minuten ausgeführt wurden, liefert eine signifikante Erhöhung dieses Verhaltens bei *nazgul* ^{Δ 1-36}-Tieren (MWRST: $P < 0,001$). WT Tiere erreichen hier im Mittel einen Wert von 7,5 *stop turns* in zwei Minuten. Bei *nazgul* ^{Δ 1-36}-Tieren ist dieser Wert mit 16,5 *stop turns* in zwei Minuten mehr als doppelt so hoch (Abb. 10C).

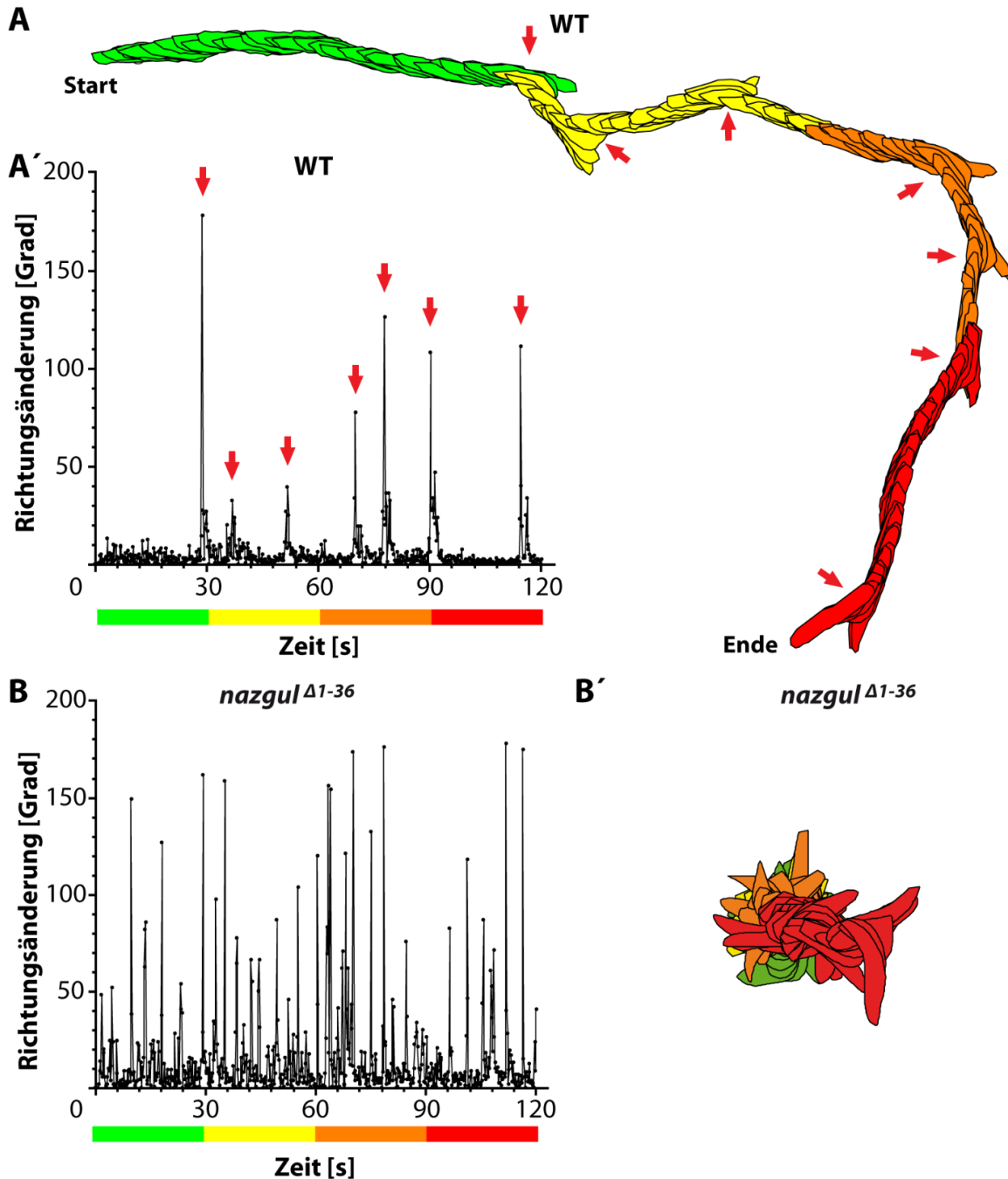


Abbildung 9: Bewegungsmuster von wildtypischen und *nazgul* ^{Δ 1-36}-mutanten Tieren

Vergleich der Pfade sowie der Richtungsänderungs-Zeit-Diagramme von WT- und *nazgul* ^{Δ 1-36}-Tieren. Dargestellt sind jeweils die Pfade der Tiere, die den mittleren Richtungsänderungswert des jeweiligen Genotyps repräsentieren. Die farbliche Unterlegung der Pfade dient der Abgrenzung von Zeitintervallen und ändert sich alle 30sek. **A:** Pfad einer WT-Larve. *Stop turns* sind mit roten Pfeilen markiert. **A':** Richtungsänderungs-Zeit-Diagramm einer WT-Larve. *Stop turns* sind mit roten Pfeilen markiert. **B:** Richtungsänderungs-Zeit-Diagramm einer *nazgul* ^{Δ 1-36}-Larve. **B':** Pfad einer *nazgul* ^{Δ 1-36}-Larve.

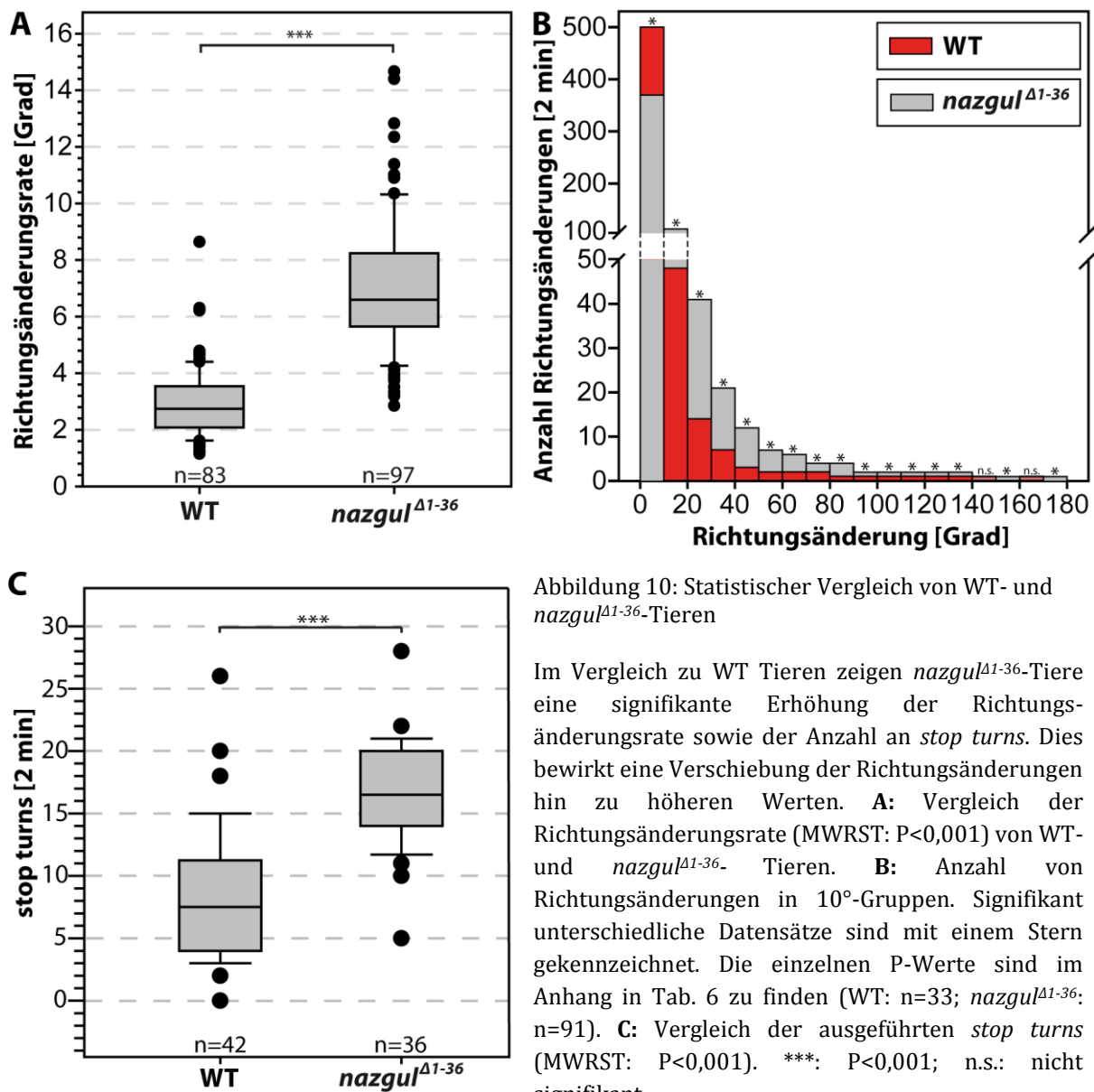


Abbildung 10: Statistischer Vergleich von WT- und *nazgul*^{Δ1-36}-Tieren

Im Vergleich zu WT Tieren zeigen *nazgul*^{Δ1-36}-Tiere eine signifikante Erhöhung der Richtungsänderungsrate sowie der Anzahl an *stop turns*. Dies bewirkt eine Verschiebung der Richtungsänderungen hin zu höheren Werten. **A:** Vergleich der Richtungsänderungsrate (MWRST: $P < 0,001$) von WT- und *nazgul*^{Δ1-36}-Tieren. **B:** Anzahl von Richtungsänderungen in 10°-Gruppen. Signifikant unterschiedliche Datensätze sind mit einem Stern gekennzeichnet. Die einzelnen P-Werte sind im Anhang in Tab. 6 zu finden (WT: $n = 33$; *nazgul*^{Δ1-36}: $n = 91$). **C:** Vergleich der ausgeführten *stop turns* (MWRST: $P < 0,001$). ***: $P < 0,001$; n.s.: nicht signifikant.

Neben der bereits beschriebenen *nazgul*^{Δ1-36}-Mutante, wurden noch drei weitere Stämme mit Mutationen im *naz*-Lokus untersucht. Dabei handelte es sich um die zwei Allele *nazgul*^{Δ1-17} und *nazgul*^{Δ2-11}. Diese wurden ebenfalls während der P-Element-Exzisionsmutagenese generiert, die auch die *nazgul*^{Δ1-36}-Mutante hervorbrachte. Außerdem wurde die P-Element-Insertion, die als Ausgangsstamm für diese Mutagenese verwendet wurde, untersucht. Diese Tiere tragen das unveränderte suppressor-P-Element im dritten Intron des *naz*-Gens (schematisch dargestellt in Kapitel 3.2.2 Abb. 8B). Die mutagene Wirkung des suppressor-P-Elements beruht auf zwei sogenannten *gypsy*-Elementen. Diese besitzen mehrere Bindestellen für den Transkriptionsfaktor *suppressor of Hairy wing* (*su(Hw)*). Eine Bindung des Transkriptionsfaktors an das *gypsy*-Element verhindert die erfolgreiche Initiation der Transkription an nahe gelegenen Promotoren. So können Gene in einer Entfernung von bis zu 80kb um das *gypsy*-Element reprimiert werden (Rosemann *et al.*, 1995).

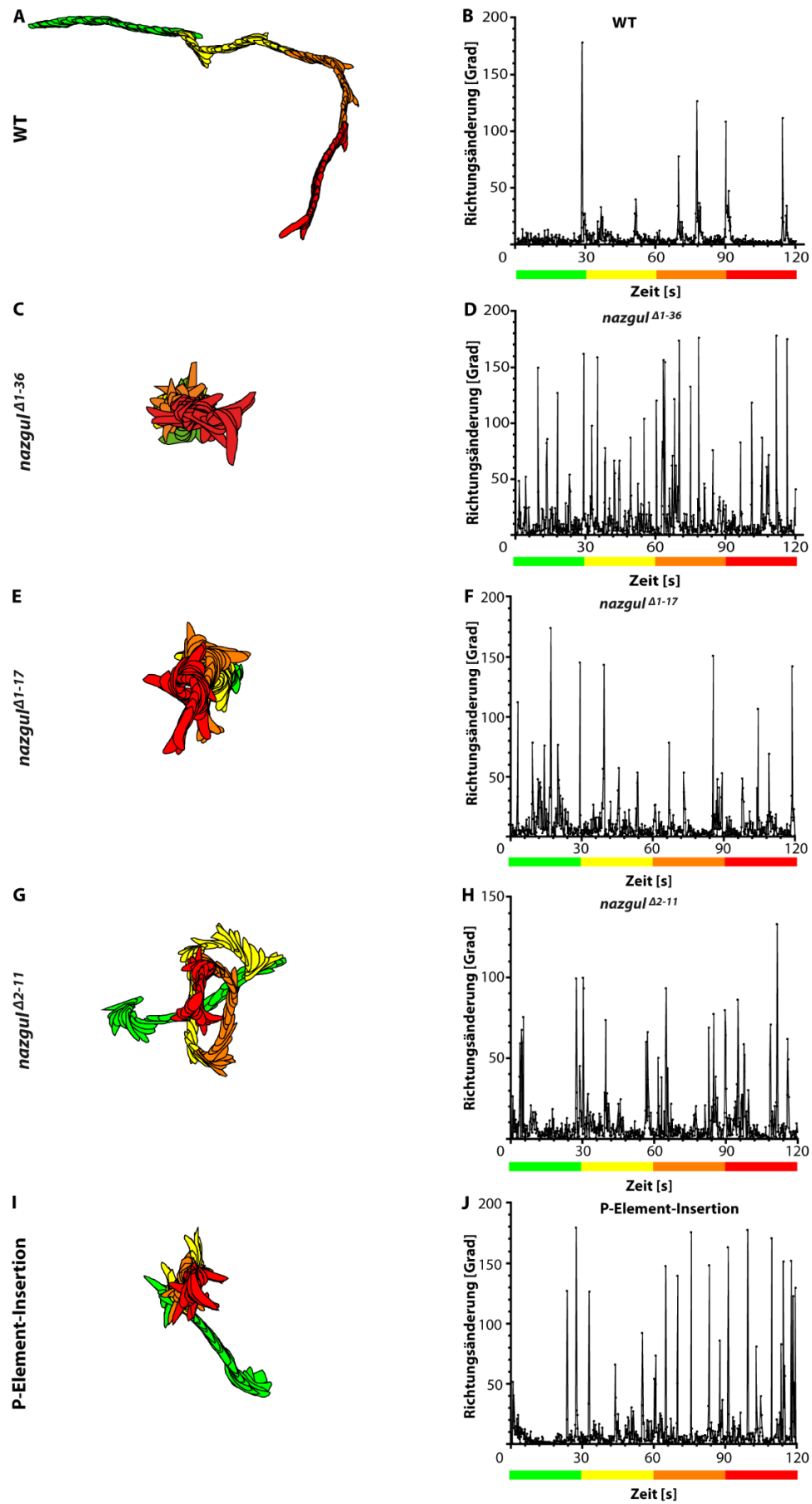


Abbildung 11: Pfadmorphologie der untersuchten *nazgul*-Mutanten (Beschriftung siehe nächste Seite)

Abbildung 11: Pfadmorphologie der untersuchten *nazgul*-Mutanten

Vergleich der Pfadmorphologien der untersuchten *naz*-Mutanten sowie der zugehörigen Richtungsänderungs-Zeit-Diagramme. Alle untersuchten Stämme zeigen Veränderungen des, von WT-Tieren ausgeführten, Bewegungsmusters. Dabei zeigten die Tiere des Stammes *nazgul*^{Δ1-36} die stärksten Veränderungen zum WT. Dargestellt sind jeweils die Pfade der Tiere, die der medianen Richtungsänderungsrate des jeweiligen Genotyps entsprechen. Die farbliche Unterlegung der Pfade dient der Abgrenzung von Zeitintervallen und ändert sich alle 30 s.

A: Pfad einer WT-Larve. **B:** Richtungsänderungs-Zeit-Diagramm einer WT-Larve. **C:** Pfad einer *nazgul*^{Δ1-36}-Larve. **D:** Richtungsänderungs-Zeit-Diagramm einer *nazgul*^{Δ1-36}-Larve. **E:** Pfad einer Larve des Stammes *nazgul*^{Δ1-17}. **F:** Richtungsänderungs-Zeit-Diagramm einer *nazgul*^{Δ1-17}-Larve. **G:** Pfad einer *nazgul*^{Δ2-11}-Larve. **H:** Richtungsänderungs-Zeit-Diagramm einer Larve des Stammes *nazgul*^{Δ2-11}. **I:** Pfad einer Larve der ursprünglichen P-Element-Insertion. **J:** Richtungsänderungs-Zeit-Diagramm einer Larve der P-Element-Insertion.

Auch die beiden untersuchten Allele *nazgul*^{Δ1-17}, *nazgul*^{Δ2-11} sowie die P-Element-Insertion, die als Ausgangsstamm zur Erzeugung der drei Mutanten *nazgul*^{Δ1-36}, *nazgul*^{Δ1-17} und *nazgul*^{Δ2-11} verwendet wurde, zeigten im Vergleich zum WT eine deutlich veränderte Pfadmorphologie. Auch hier sind die Phasen linearer Fortbewegung verkürzt und es kommt häufiger zu großen Richtungsänderungen. Der Phänotyp ist bei diesen drei Stämmen allerdings weniger stark ausgeprägt als bei den zuvor beschriebenen Tieren der *nazgul*^{Δ1-36}-Mutanten (Abb. 11).

Die statistische Auswertung der Richtungsänderungsraten ergab für alle untersuchten *naz*-Mutanten eine signifikante Erhöhung im Vergleich zum WT. Die Mutante *nazgul*^{Δ1-36} zeigt dabei den stärksten Phänotyp. Die Richtungsänderungsraten der anderen beiden Allele sowie der P-Element-Insertion bleiben auf einem signifikant niedrigeren Niveau (*nazgul*^{Δ1-36} vs. *nazgul*^{Δ1-17} MWRST: P<0,001; *nazgul*^{Δ1-36} vs. *nazgul*^{Δ2-11} MWRST: P<0,001; *nazgul*^{Δ1-36} vs. P-Element-Insertion MWRST: P<0,001). Der Vergleich der Stämme *nazgul*^{Δ1-17}, *nazgul*^{Δ2-11} und die P-Element-Insertion untereinander zeigte keinen statistisch signifikanten Unterschied der Richtungsänderungsraten (Abb. 12).

Interessanterweise waren die Richtungsänderungsraten von zwei der untersuchten Exzisionsmutanten deutlich niedriger, wenn sie auf Agarplatten getestet wurden, zu deren Herstellung Apfelsaft anstatt Wasser verwendet worden war. Während wildtypische Tiere hier keine signifikanten Veränderungen des Explorationsverhaltens zeigten, konnten bei den Mutanten *nazgul*^{Δ1-36} und *nazgul*^{Δ1-17} eine signifikant niedrigere Richtungsänderungsrate gemessen werden. Die Mutante *nazgul*^{Δ2-11} zeigte dagegen keine signifikante Veränderung der zuvor auf Wasseragar bestimmten Werte. Im Vergleich mit den auf Apfelsaftagar getesteten Wildtypen konnte für keine der drei auf Apfelsaftagar getesteten Exzisionsmutanten ein signifikanter Unterschied der Richtungsänderungsraten nachgewiesen werden (Abb. 29 im Anhang).

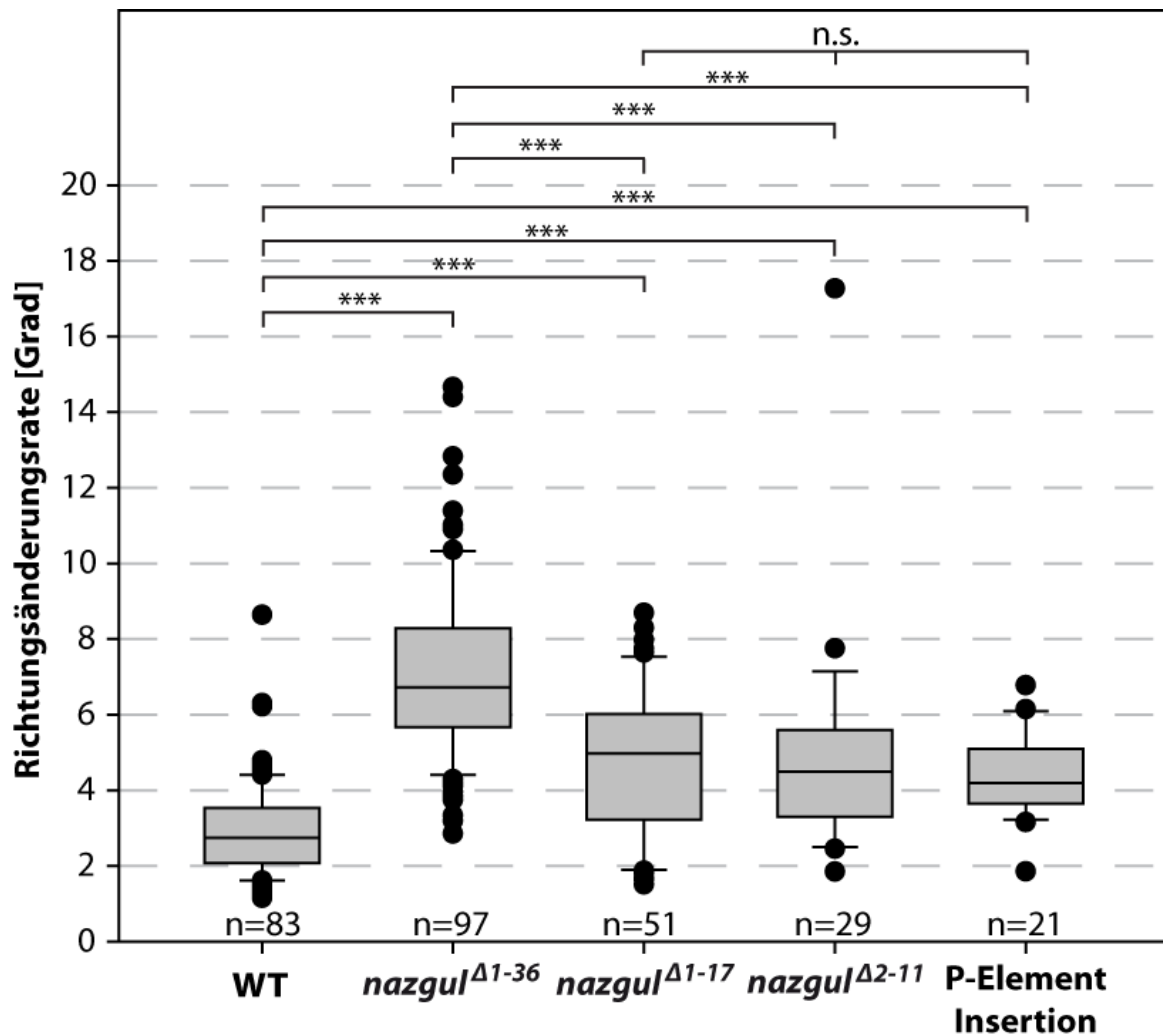


Abbildung 12: Richtungsänderungsraten der *nazgul*-Mutanten im Vergleich zum WT

Vergleich der Richtungsänderungsraten aller untersuchten *naz*-Mutanten. Im Vergleich zum WT konnte bei allen Stämmen eine signifikante Erhöhung der Richtungsänderungsraten nachgewiesen werden. Der MWRST der jeweiligen Mutante gegen den WT ergab in allen Fällen eine P -Wert $< 0,001$. Die Mutante *nazgul*^{Δ1-36} zeigte wiederum eine signifikant höhere Richtungsänderungsrate als die übrigen Stämme mit Mutationen im *naz*-Lokus (paarweiser Vergleich durch MWRST). Der Vergleich der Stämme *nazgul*^{Δ1-17}, *nazgul*^{Δ2-11} sowie der P-Element-Insertion, lieferte keine signifikanten Unterschiede der Richtungsänderungsraten (paarweiser Vergleich durch MWRST: *nazgul*^{Δ1-17} vs. *nazgul*^{Δ2-11} $P=0,689$; *nazgul*^{Δ1-17} vs. P-Element-Insertion $P=0,421$; *nazgul*^{Δ2-11} vs. P-Element-Insertion $P=0,637$)

3.2.5 Transheterozygote *nazgul*-Mutanten zeigen ein verändertes Explorationsverhalten

Um den Effekt der im dritten Intron des *naz*-Gens verbliebenen P-SUPor-P-Sequenzen abzusichern, wurde die *nazgul*^{Δ1-36}-Mutante in *trans* über die Defizienz Df(3R)EXEL6178 gestellt. Dabei handelt es sich um eine ca. 230kb große Deletion auf dem dritten Chromosom, die neben *naz* noch 46 weitere Gene umfasst. Diese Defizienz ist, wie die *nazgul*^{Δ1-36}-Mutanten, homozygot letal. Im transheterozygoten Zustand allerdings erhält man lebensfähige und fertile Tiere. Allein diese Tatsache lässt darauf schließen, dass die vorhandene Mutation in *nazgul*^{Δ1-36} nicht ursächlich für die beobachtete Letalität verantwortlich sein kann. Des Weiteren muss nach dieser Feststellung davon ausgegangen werden, dass zumindest in *nazgul*^{Δ1-36} eine weitere bisher unentdeckte Mutation auf dem dritten Chromosom vorliegt, die nicht im durch die Defizienz deletierten Bereich liegt. Da die beiden anderen untersuchten Allele ebenfalls homozygot letal waren, kann hier von der gleichen Situation ausgegangen werden. Da zum Zeitpunkt dieser Feststellung die beiden Stämme *nazgul*^{Δ1-17} und *nazgul*^{Δ2-11} nicht mehr vorlagen, konnten dafür keine experimentellen Belege erbracht werden.

Um abzusichern, dass die transheterozygoten Tiere kein wildtypisches Allel des *naz*-Gens tragen, wurde mittels PCR der Bereich des dritten Exons amplifiziert, in dem die Reste des in *nazgul*^{Δ1-36} mobilisierten P-Elements lokalisiert sind. Durch das verwendete, die Insertionsstelle flankierende, Primerpaar ergibt sich in wildtypischen Tieren ein ca. 2,5 kb großes DNA-Fragment. In *nazgul*^{Δ1-36} ist dieses mit ca. 10 kb deutlich länger. In den Transheterozygoten konnte nur das 10 kb große, aus *nazgul*^{Δ1-36} stammende Fragment, amplifiziert werden. Es ist daher davon auszugehen, dass kein wildtypisches Allel vorhanden war.

Auch die transheterozygoten Tiere zeigten ein verändertes Explorationsverhalten (Abb. 13A & B). Wie bei den zuvor beschriebenen Mutanten konnte hier eine, im Vergleich zum WT, erhöhte Richtungsänderungsrate beobachtet werden (Abb. 13C, MWRST: $P < 0,001$). Der Phänotyp ist allerdings mit einer medianen Richtungsänderungsrate von $3,689^\circ$ deutlich schwächer als der homozygoter *nazgul*^{Δ1-36}-Mutanten (Abb. 13C, MWRST: $P < 0,001$). Im Vergleich mit homozygoten *nazgul*^{Δ1-17}-Tieren ist die Richtungsänderungsrate der transheterozygoten ebenfalls signifikant erniedrigt (Abb. 13D, MWRST: $P = 0,015$). Auch zu den Richtungsänderungsraten des Stammes *nazgul*^{Δ2-11} konnte ein signifikanter Unterschied festgestellt werden (Abb. 13D, MWRST: $P = 0,037$).

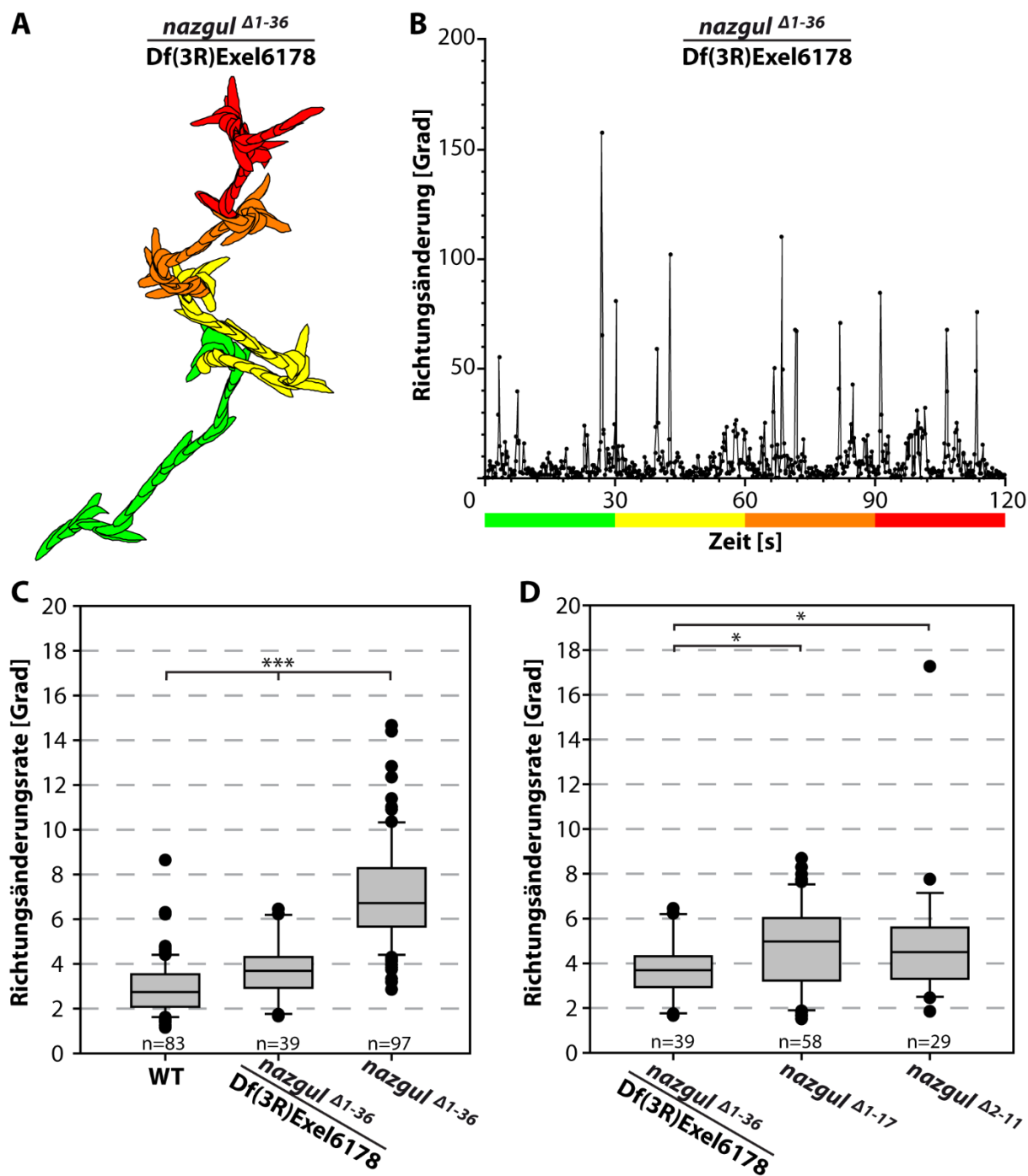


Abbildung 13: Transheterozygoten *nazgul*-Mutanten zeigen einen verminderten Phänotyp

Auch die untersuchten Transheterozygoten der Defizienz Df(3R)Exel6178 über *nazgul*^{Δ1-36} zeigen ein verändertes Explorationsverhalten. Die Veränderung ist allerdings deutlich geringer als bei homozygoten *nazgul*^{Δ1-36}-Tieren. Im Vergleich zu den anderen untersuchten Exzisionsmutanten fällt der Unterschied geringer aus. **A:** Pfad des Tieres, das dem Median aller untersuchten transheterozygoten Tiere entspricht. **B:** Richtungsänderungs-Zeit-Diagramm des in A gezeigten Pfades. **C:** Vergleich der Richtungsänderungsraten von WT-, transheterozygoten und *nazgul*^{Δ1-36}-Tieren. **D:** Vergleich der Transheterozygoten mit den beiden Exzisionsmutanten *nazgul*^{Δ1-17} und *nazgul*^{Δ2-11}. Hier konnte nur für *nazgul*^{Δ1-17} ein signifikanter Unterschied der Richtungsänderungsraten festgestellt werden. *: P<0,05; ***, P<0,001.

3.3 *nazgul*-RNAi-Versuche

Da die Entdeckung einer potentiellen zweiten letalen Mutation in den untersuchten *naz*-Mutanten die Vermutung zuließ, dass die *naz*-Mutationen nicht ursächlich für die beobachteten Phänotypen verantwortlich sein könnten, wurden zur Absicherung der, mit den *naz*-mutanten Tieren, gewonnenen Ergebnisse *naz*-RNAi-Experimente durchgeführt. Dazu wurde ein RNAi-Stamm der KK-RNAi-Kollektion des Vienna *Drosophila* RNAi Center (VDRC) sowie ein Stamm der TRiP-Kollektion des *Drosophila* RNAi Screening Center der Harvard Medical School verwendet. Diese ermöglichen es, mit Hilfe des UAS-GAL4-Systems, die *messenger RNA* (*mRNA*) des Naz-Proteins gezielt abzubauen, was zumindest zu einer verringerten Konzentration des Proteins in den betroffenen Zellen führt. In beiden Fällen wurde die Treiberlinie *dicer; repo-GAL4* verwendet. Diese ermöglicht eine Expression in allen Glia und somit auch alle Glia mit endogener Naz-Expression. Die beiden verwendeten RNAi-Konstrukte greifen die *naz*-mRNA im Bereich des zweiten Exons an. Damit ist sichergestellt, dass beide Isoformen vom Effekt der RNAi betroffen sind.

Mit beiden RNAi-Linien konnte eine signifikant erhöhte Richtungsänderungsrate induziert werden (Abb. 14). Wie bei den untersuchten *naz*-Mutanten wurden viele große Richtungsänderungen auf engem Raum beobachtet (Abb. 14A & C). Phasen geradliniger Fortbewegung waren auch hier selten und kurz (Abb. 14B & D). Der Median der Richtungsänderungsraten lag bei der verwendete TRiP-RNAi-Linie mit $4,577^\circ$ etwas höher als bei der VDRC-Linie, die $3,931^\circ$ erreichte (Abb. 15). Es konnte jedoch kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den Richtungsänderungsraten beider RNAi-Stämme festgestellt werden (Abb. 15 MWRST: $P=0,298$). Die Richtungsänderungsrate war sowohl gegenüber WT-Tieren als auch im Vergleich zu Tieren der mit *white*-Mutanten verkreuzten Treiberlinie (*dicer; repo-GAL4*) sowie Tieren der mit *white*-Mutanten verkreuzten RNAi-Linien signifikant erhöht. Der Vergleich der heterozygoten Kontrollgruppen zeigte keinen signifikanten Unterschied der Richtungsänderungsraten (Abb. 15: *naz*-RNAi (TRiP) vs. *dicer; repo-GAL4* Kontrolle MWRST: $P<0,001$; *naz*-RNAi (TRiP) vs. *naz*-RNAi (TRiP) Kontrolle MWRST: $P<0,001$; *naz*-RNAi (TRiP) vs. WT MWRST: $P<0,001$; *dicer; repo-GAL4* Kontrolle vs. WT MWRST: $P<0,001$; *naz*-RNAi (TRiP) Kontrolle vs. WT MWRST: $P<0,001$; *dicer; repo-GAL4* Kontrolle vs. *naz*-RNAi (TRiP) Kontrolle MWRST: $P=0,809$; Abb. 15: *naz*-RNAi (VDRC) vs. *dicer; repo-GAL4* Kontrolle MWRST: $P<0,001$; *naz*-RNAi (VDRC) vs. *naz*-RNAi (VDRC) Kontrolle MWRST: $P<0,001$; *naz*-RNAi (VDRC) vs. WT MWRST: $P<0,001$; *dicer; repo-GAL4* Kontrolle vs. WT MWRST: $P<0,001$; *naz*-RNAi (VDRC) Kontrolle vs. WT MWRST: $P<0,001$; *dicer; repo-GAL4* Kontrolle vs. *naz*-RNAi (VDRC) Kontrolle MWRST: $P=0,632$).

Die durch RNAi induzierten Phänotypen waren deutlich schwächer als der Phänotyp von Tieren der *nazgul*⁴¹⁻³⁶-Mutante (Abb. 15). Im Gegensatz zu den untersuchten Mutanten, die allesamt pupale Letalität aufwiesen, sind *naz*-RNAi-Tiere bis in die Imago lebensfähig.

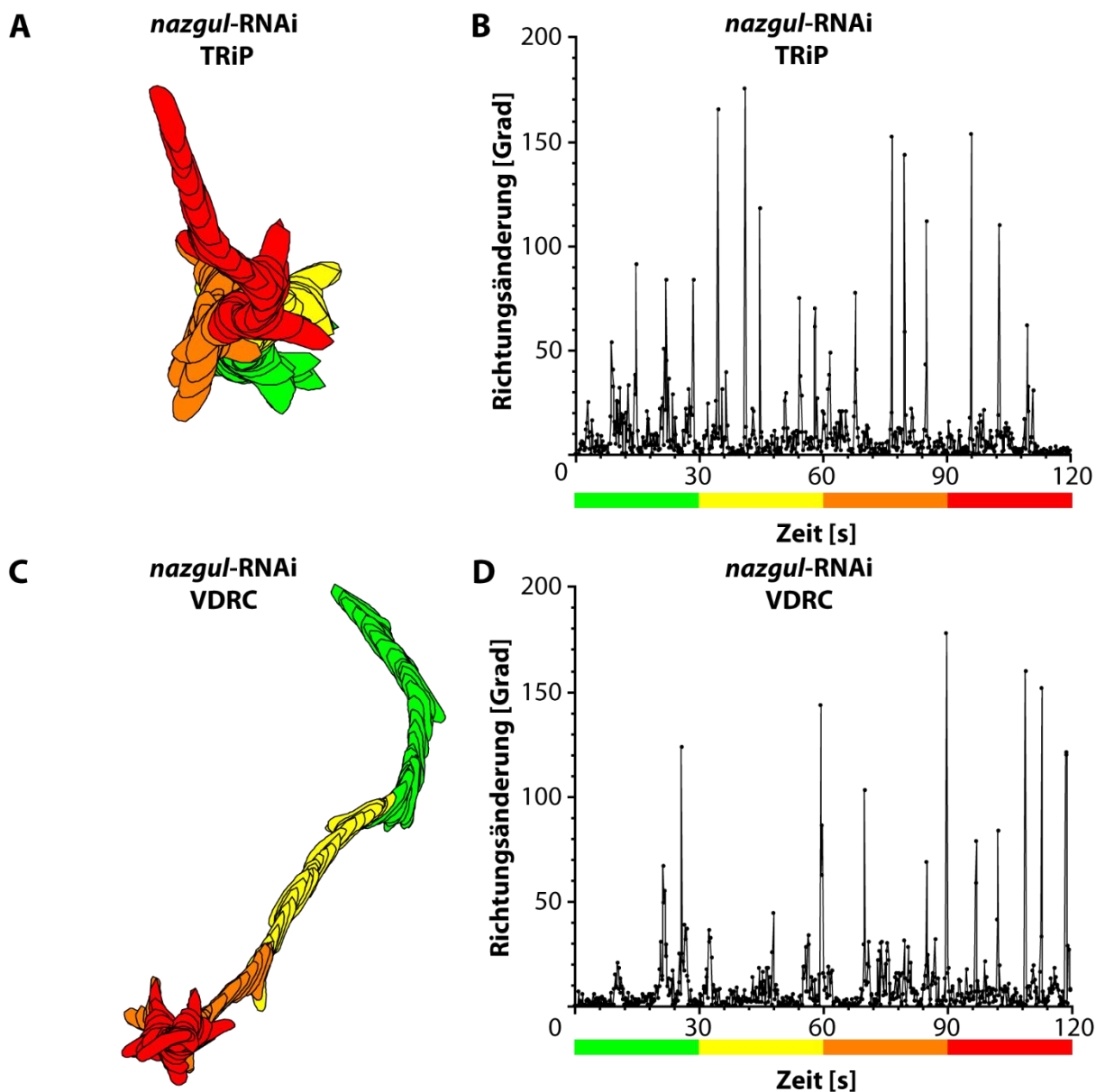


Abbildung 14: Verhalten von *nazgul*-RNAi-Tieren

Pfadbeispiele und Richtungsänderungs-Zeit-Diagramme von Tieren mit glaspezifisch getriebener *naz*-RNAi. Gezeigt sind jeweils die Tiere, die den Median aller untersuchten Tiere des entsprechenden Genotyps repräsentieren. **A:** Pfad einer Larve mit glaspezifischer Expression des *naz*-RNAi-Konstrukts der TRiP-Kollektion **B:** Richtungsänderungs-Zeit-Diagramm des in A gezeigten Pfades. **C:** Pfad einer Larve mit glaspezifischer Expression des *naz*-RNAi-Konstrukts der VDRC-Kollektion. **D:** Richtungsänderungs-Zeit-Diagramm des in C gezeigten Pfades.

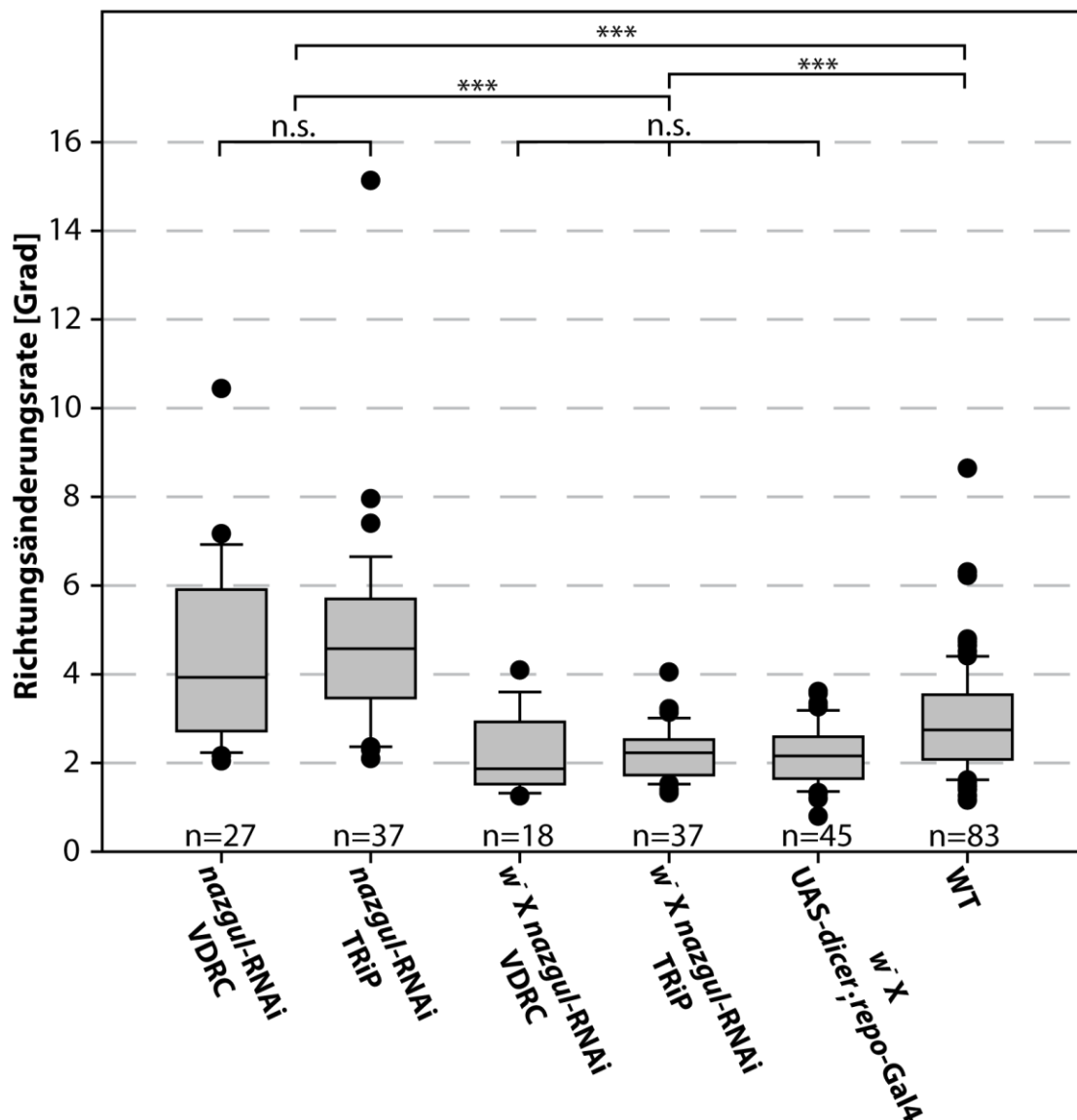


Abbildung 15: Statistische Auswertung der *nazgul*-RNAi-Versuche

Statistische Auswertung der während des *naz*-RNAi-Experiments gewonnenen Daten. Vergleich der Richtungsänderungsraten der *naz*-RNAi-Tiere (VDRC und TRiP) mit den heterozygoten Kontrollen des Treibers und des UAS-Konstrukts sowie WT-Tiere des Stammes Oregon R. Die Richtungsänderungsraten der *naz*-RNAi-Tiere sind im Vergleich zu heterozygoten Kontrollen des Treibers und des UAS-Konstrukts sowie WT-Tieren des Stammes Oregon R signifikant erhöht. ***: $P < 0,001$; n.s.: nicht signifikant

3.3.2 Überprüfung des KK-RNAi-Konstrukt-Insertionsortes

Nach dem Bekanntwerden der Tatsache, dass einige Stämme der KK-RNAi-Kollektion des VDRC einen durch den Insertionsort des RNAi-Konstrukt bedingten dominanten Phänotyp zeigen (Green *et al.*, 2014), habe ich den Insertionsort des RNAi-Konstrukts des hier verwendete Stamms überprüft. Den Autoren zufolge, trägt der zur Erstellung der KK-RNAi-Kollektion verwendete Ausgangsstamm nicht, wie angenommen, einen, sondern zwei mögliche Insertionsorte für das RNAi-Konstrukt. Beide befinden sich auf dem zweiten Chromosom. Einer dieser beiden Insertionsorte liegt allerdings in der 5'-untranslatierten Region (UTR) des Gens *tiptop* und induziert verschiedene Phänotypen, wenn er besetzt ist. Die zweite, zuvor unbekannte Insertionsstelle liegt an der Position 2L:9437482 und befindet sich nicht innerhalb einer transkribierten Sequenz. Zur Überprüfung der beiden Insertionsorte wurde das von Green *et al.* vorgeschlagene Multiplex-PCR-Protokoll verwendet. Dieses ergab, dass der besagte Insertionsort im 5'-UTR von *tiptop* des hier verwendeten Stamms, nicht besetzt ist (Abb. 16).

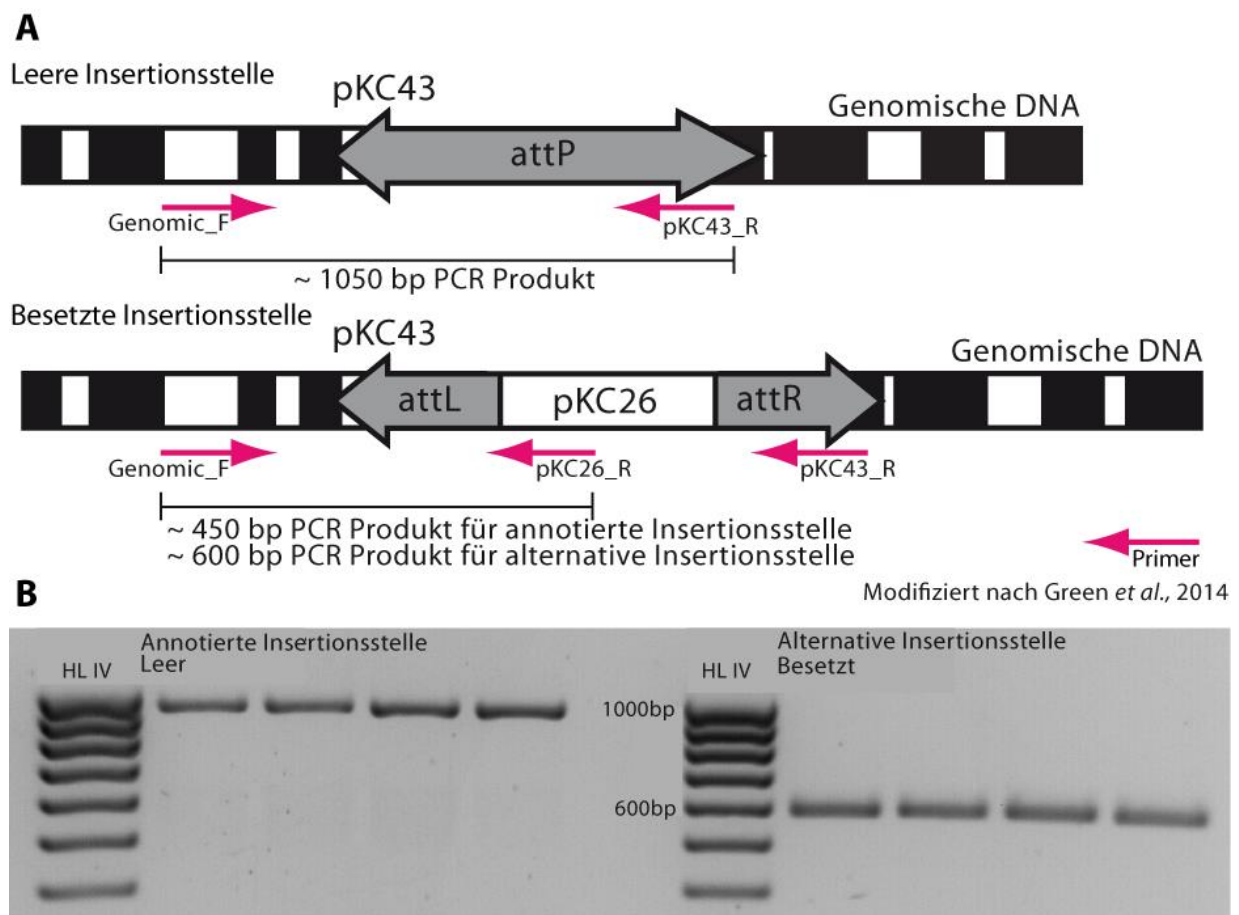


Abbildung 16: Insertionspunkt-Überprüfung des VDRC-KK-RNAi-Konstrukts

A: Schematische Darstellung der Multiplex-PCR und der erwarteten Fragmentgrößen für leere und besetzte Insertionsstellen. **B:** Ergebnis der Gelelektrophorese nach Durchführung der Multiplex-PCR (HL IV: Hyperladder IV)

3.4 Nazgul ist am Tyramin-Metabolismus beteiligt

Die bisher gezeigten Ergebnisse legen den Schluss nahe, dass Naz eine wichtige Rolle für die Ausführung des normalen Explorationsverhaltens der Larve spielt. Eine Aussage über die genaue Funktion des Proteins und den Grund für die beobachtete Abweichung vom normalen Verhaltensmuster kann auf Basis dieser Daten allerdings nicht getroffen werden.

Der folgende Abschnitt beschäftigt sich mit möglichen Ursachen für die beobachteten Abweichungen vom normalen Verhaltensmuster. Es wurden verschiedene Experimente durchgeführt, um eine von uns aufgestellte Hypothese zur Funktion des Naz-Proteins als Teil des TA-Metabolismus im NS zu überprüfen und zu untermauern.

Um Anhaltspunkte für die Funktion des Naz-Proteins zu erhalten, wurde zunächst nach bekannten Mutanten mit vergleichbaren Phänotypen gesucht. Dabei zeigte sich, dass Larven einer *Tβh*-Mutante einen sehr ähnlichen Lokomotionsphänotyp aufweisen. *Tβh* ist an der OA-Synthese beteiligt und katalysiert die Umwandlung von TA in OA. Ein Funktionsverlust der *Tβh* führt zu erhöhten TA- und erniedrigten OA-Spiegeln im NS der betroffenen Tiere. Durch *Tβh*-Mutation hervorgerufene Verhaltensänderungen konnten durch Fütterung von OA oder des TA-Rezeptor-Antagonisten YH gerettet werden (Saraswati *et al.*, 2004; Fox *et al.*, 2006). In *Tβh*-Mutanten scheint also der erhöhte TA-Spiegel für die beobachteten Verhaltensänderungen verantwortlich zu sein.

Im NS der Larve ist die Synthese von TA und OA nur in tyraminergen und octopaminergen Neuronen zu finden. Im VNS bilden diese einen ventromedialen Cluster pro Neuromer, der aus drei (A2-A8) bis fünf (T1-A1) Zellen besteht (Selcho *et al.*, 2012). Eine Beteiligung von Naz an der Synthese dieser Substanzen ist somit eher unwahrscheinlich, da in den TA-bildenden Zellen keine Naz-Expression stattfindet. Naz könnte aber durchaus am Abbau des TA beteiligt sein. In *Drosophila* gibt es bisher keine gesicherten Erkenntnisse über den TA-Katabolismus. Bislang ist weder ein spezifischer TA-Transporter noch ein enzymatischer Abbauweg für diese Substanz bekannt.

Die folgenden Experimente wurden auf Basis der Hypothese durchgeführt, dass TA unter Beteiligung von Naz abgebaut und der beobachtete Phänotyp der *naz*-Mutanten somit durch einen erhöhten TA-Spiegel verursacht wird. Dazu wurde der folgende hypothetische TA-Abbauweg postuliert.

Der erste Schritt des hier vorgeschlagenen Abbauwegs ist die Aufnahme des TA in die Naz-exprimierenden ALGs durch einen Transmembrantransporter. Als zweiten Schritt ist eine oxidative Desaminierung durch eine Monoaminoxidase (MAO) denkbar. Diese würde das TA in p-Hydroxyphenyl-Acetaldehyd umwandeln, welches dann im nächsten Schritt durch Naz zu p-Hydroxyphenyl-Essigsäure umgesetzt werden könnte.

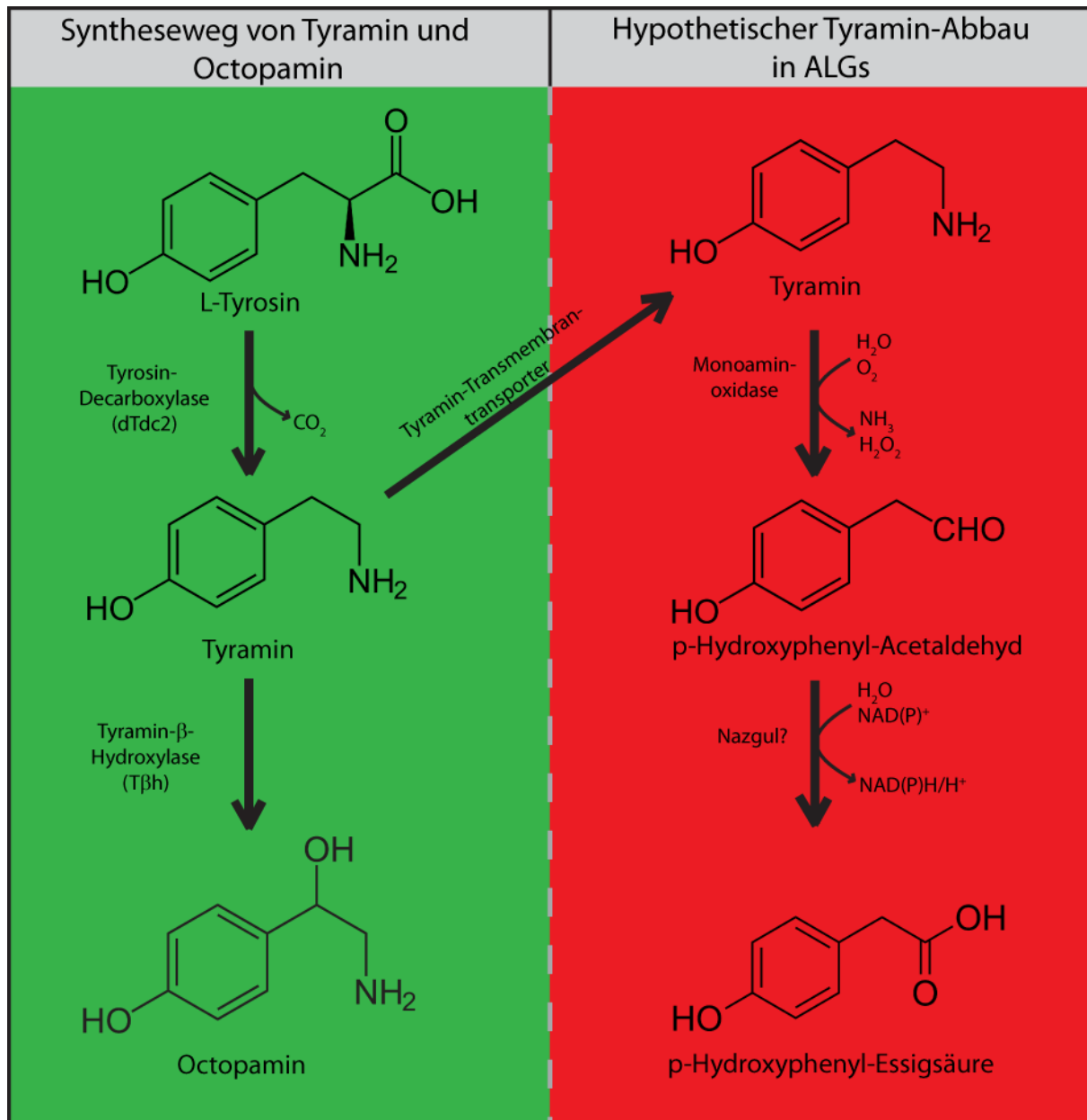


Abbildung 17: Hypothetischer Tyramin-Abbauweg

TA und OA werden in Neuronen des ZNS aus L-Tyrosin unter Beteiligung der Enzyme dTdc2 und TβH gebildet (links grün unterlegt). Rechts: Hypothetischer in ALGs lokalisierter Abbauweg des TA unter Beteiligung einer MAO und Naz über p-Hydroxyphenyl-Acetaldehyd und p-Hydroxyphenyl-Essigsäure (rot unterlegt).

3.4.1 Astrozyten ähnliche Glia sind Tyramin-positiv

Um zu prüfen, ob der postulierte TA-Abbau in ALGs überhaupt möglich ist, wurden ZNS von WT- und *nazgul^{Δ1-36}*-Tieren gegen TA gefärbt. In WT NS konnten dabei neben den bereits beschriebenen VUM-Clustern im VNS (Abb. 18F) auch die bereits als TA-immunoreaktiv beschriebenen *dorso-lateral paired neurons* gefunden werden (geschwungener Pfeil in Abb. 18D & E) (Nagaya et al., 2002).

Neben stark positiven Neuronen wurden weitere nur schwach positive Zellen beobachtet (Abb. 18A-D mit geraden Pfeilen markiert). Diese sowohl im VNS als auch in den Gehirnloben vorhandenen Zellen weisen die charakteristische Morphologie von Glia auf. Auch die Lage im Gehirn und VNS passt zu *naz*-exprimierenden Zellen.

Nach diesen vielversprechenden Ergebnissen wurde die Färbung in *nazgul^{Δ1-36}* wiederholt. Um Klarheit zu erhalten, ob es sich bei den schwach TA-positiven Zellen wirklich um *Naz*-exprimierende ALGs handelt, wurde ebenfalls der Gliazellmarker Repo und der in allen *Naz*-positiven Zellen zu findende Transkriptionsfaktor Pros gefärbt (Abb. 19). Alle schwach TA-positiven Zellen exprimieren diese beiden Marker, sodass davon ausgegangen werden kann, dass es sich hier tatsächlich um *Naz*-exprimierende ALGs handelt.

Leider gelang es nicht, diese Dreifachfärbung auch im WT zu wiederholen. Der immunhistochemische Nachweis von Tyramin ist ein schwieriges Unterfangen, da das Epitop des α -Tyramin-Antikörpers erst während der Fixierung erzeugt wird. Zudem erzeugt das dafür notwendige Fixativ starke Autofluoreszenz, die nur mit Hilfe aggressiver Reduktionsmittel vermindert werden kann.

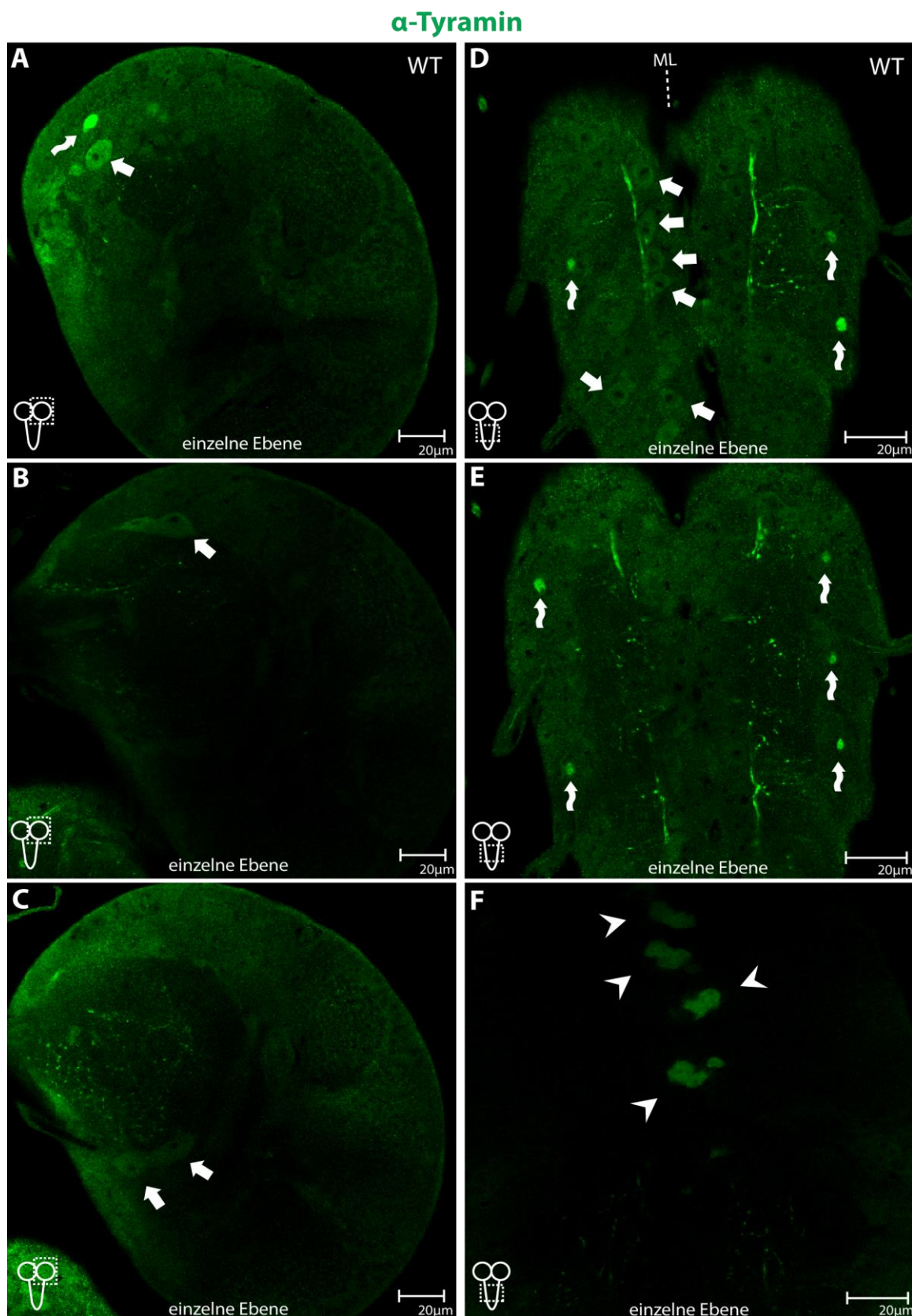


Abbildung 18: Tyramin-positive Zellen im wildtypischen ZNS

AK-Färbung gegen TA im ZNS eines WT-Tieres. Neben Clustern von VUM-Neuronen (Pfeilspitzen in **F**) können ebenfalls TA-positive Glia in Gehirn (Pfeile in **A**, **B** & **C**) und VNS (Pfeile in **D**) nachgewiesen werden. Im dorsalen Bereich des VNS wurden bisher nicht als tyraminerg beschriebene Neurone gefunden (geschwungene Pfeile in **D** & **E**)

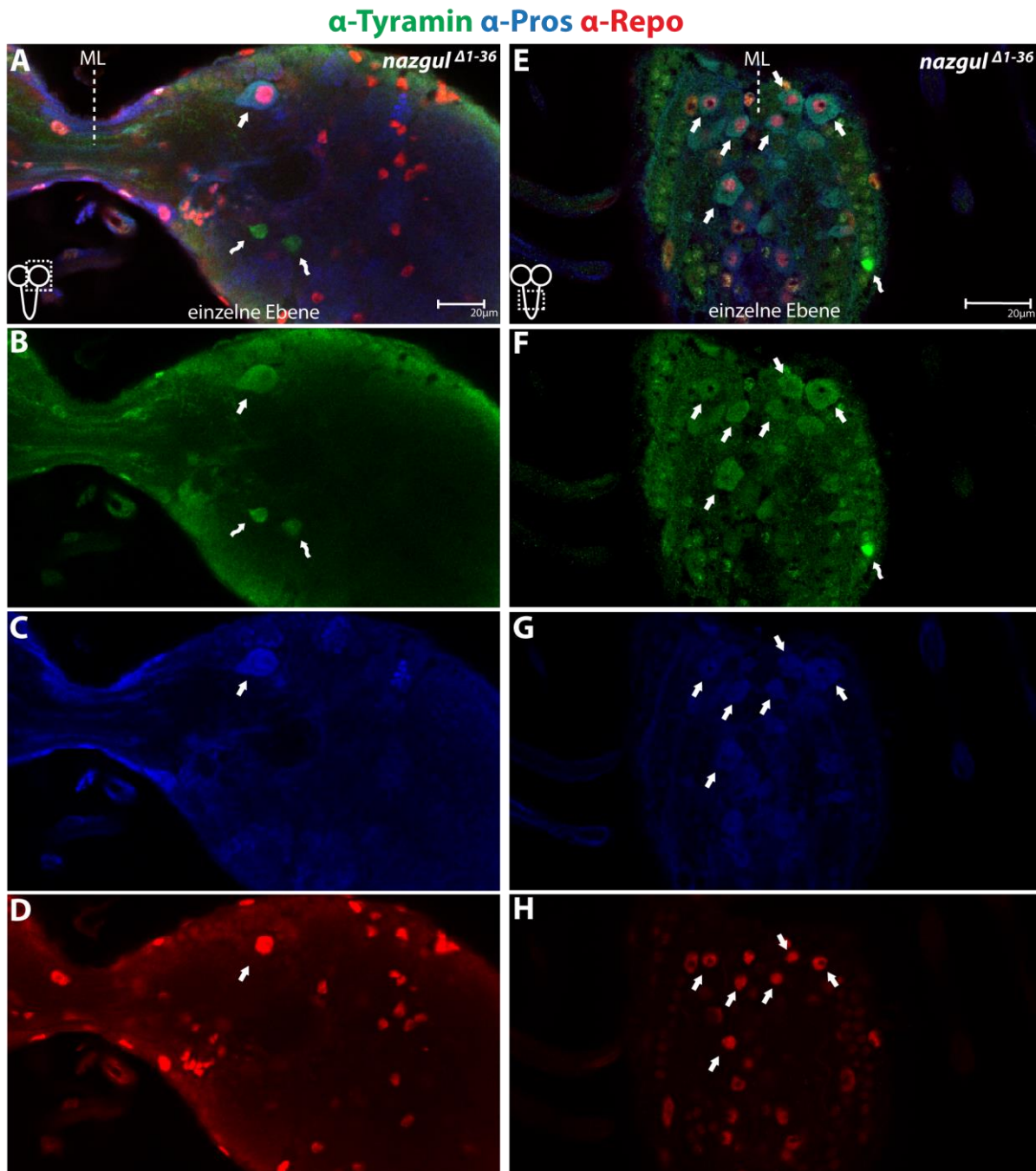


Abbildung 19: Astrozyten ähnliche Glia sind Tyramin-positiv

In *nazgul^{Δ1-36}*-Mutanten können sowohl im VNS als auch in den Hirnloben TA-positive Glia nachgewiesen werden. Neben TA wurden Repo als Gliazellmarker und Pros als Marker für Naz-exprimierende ALGs gefärbt. Gezeigt werden einzelne Ebenen eines LSM-Stapels. **A-D**: LSM-Aufnahme des Zentralhirns. Der gerade Pfeil markiert eine der TA-positiven ALGs. Die geschwungenen Pfeile markieren TA-positive Neurone. **E-H**: LSM-Aufnahme des VNS. Die geraden Pfeile markieren einige TA-positive ALGs. **A & E**: Überlagerung der Kanäle für TA, Repo und Pros. **B & F**: Färbung gegen TA. **C & G**: Färbung gegen Pros. **D & H**: Färbung gegen Repo.

3.5 Pharmakologische Eingriffe in den Tyramin-Metabolismus

Eine weitere Möglichkeit zur Überprüfung der hier aufgestellten Hypothese ist es, durch Fütterung verschiedener Pharmaka, in den vorgeschlagenen TA-Abbau einzugreifen. Dazu wurden verschieden Substanzen verwendet. Es wurde der Versuch unternommen, den vermeintlich erhöhten TA-Spiegel durch Fütterung eines TA-Rezeptor-Antagonisten zu maskieren und somit den Phänotyp zu retten. Des Weiteren wurde versucht, durch Fütterung von TA eine Erhöhung der Richtungsänderungsraten zu induzieren. Um Hinweise für die Beteiligung einer MAO am TA-Abbau zu erhalten, wurde ein MAO-Inhibitor verfüttert. Für den Fall, dass tatsächlich eine MAO am TA-Abbau beteiligt ist, sollte die Inhibition dieses Enzyms ebenfalls zu einer Erhöhung des TA-Spiegels führen. Der erhöhte TA-Spiegel sollte dann erhöhte Richtungsänderungsraten induzieren.

3.5.1 Yohimbin rettet das veränderte Explorationsverhalten von *nazgul*-RNAi-Tieren und Exzisionsmutanten

Um den Effekt eines erhöhten TA-Spiegels zu unterdrücken, wurde der TA-Rezeptor-Antagonist YH verwendet. Dieser wurde bereits mehrfach erfolgreich zur Unterdrückung TA-induzierter Verhaltensänderungen eingesetzt (Saraswati *et al.*, 2004, Brembs *et al.*, 2007). Falls der beobachtete Phänotyp durch einen erhöhten TA-Spiegel verursacht wird, sollte sich dieser durch Fütterung von YH retten lassen.

Zur Untersuchung des Effekts von YH auf den Verhaltensphänotyp Naz-defizienter Tiere wurde die Substanz zunächst in unterschiedlichen Konzentrationen an WT-Tiere verfüttert. Dabei zeigte sich, dass bereits eine Konzentration von 0,5 mg/ml im Futter ausreicht, um signifikante Erhöhungen der Richtungsänderungsrate auszulösen (Kruskal-Wallis One Way ANOVA on Ranks: $P=0,001$). Konzentrationen von 1 mg/ml, 1,5 mg/ml und 3 mg/ml verursachten im Vergleich zu 0,5 mg/ml keine weitere signifikante Erhöhung der Richtungsänderungsrate (Abb.20).

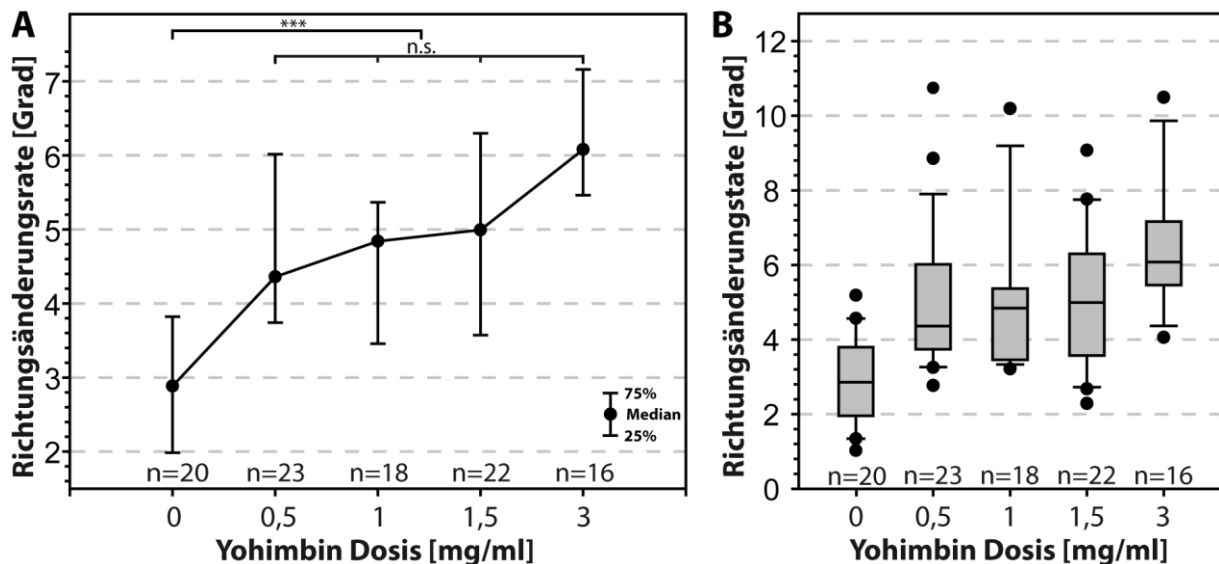


Abbildung 20: Yohimbin erhöht die Richtungsänderungsrate wildtypischer Tiere

YH wurde in unterschiedlichen Konzentrationen an WT-Tiere verfüttert. Bereits bei einer YH-Konzentration von 0,5 mg/ml im Futter der Tiere konnte eine signifikante Erhöhung der Richtungsänderungsraten festgestellt werden (Kruskal-Wallis One Way ANOVA on Ranks: $P=0,001$). **A:** Richtungsänderung gegen YH-Dosis. Steigende YH-Dosen führten zu keiner statistisch nachweisbaren Erhöhung der Richtungsänderungsraten (Dunn's post hoc Test). Dargestellt sind die Mediane der getesteten Gruppen sowie die 25 %- und 75 %-Perzentile. **B:** Darstellung aller Daten der getesteten Gruppen. ***: $P<0,001$; n.s.: nicht signifikant

Im Gegensatz zu den für WT-Tiere erhaltenen Daten bewirkt YH bei Tieren, die ein *naz*-RNAi-Konstrukt in Glia exprimierten, den gegenteiligen Effekt. Für den Fall, dass verminderte *Naz*-Expression zu einem erhöhten TA-Spiegel führt, sollte dieser durch YH maskiert werden. Das Verhalten der Tiere müsste sich nach Applikation des Pharmakons also dem WT-Verhaltensmuster annähern. Diese Annahme konnte bestätigt werden (Abb.21).

Die Tiere wurden über Nacht auf Futterbrei gesetzt, der 0,5 mg/ml YH enthielt und anschließend getestet. Tatsächlich konnte eine deutliche Reduktion des Phänotyps festgestellt werden. Die behandelten Tiere zeigten wieder längere Phasen linearer Fortbewegung. Große Richtungsänderungen kamen nur noch selten vor (Abb. 21C & D). Der Vergleich unbehandelter Tiere aus der für die YH-Applikation bestimmten Kreuzung mit zuvor getesteten Tieren des gleichen Genotyps, zeigte keinen statistischen Unterschied (Abb. 22B; MWRST: $P=0,696$). Deshalb wurden diese Daten für den nachfolgenden Vergleich mit den mit YH behandelten Tieren zusammengefasst. Behandlung der *naz*-RNAi-Tiere mit YH führte zu einer signifikant niedrigeren Richtungsänderungsrate (Abb. 22A; MWRST: $P=0,009$).

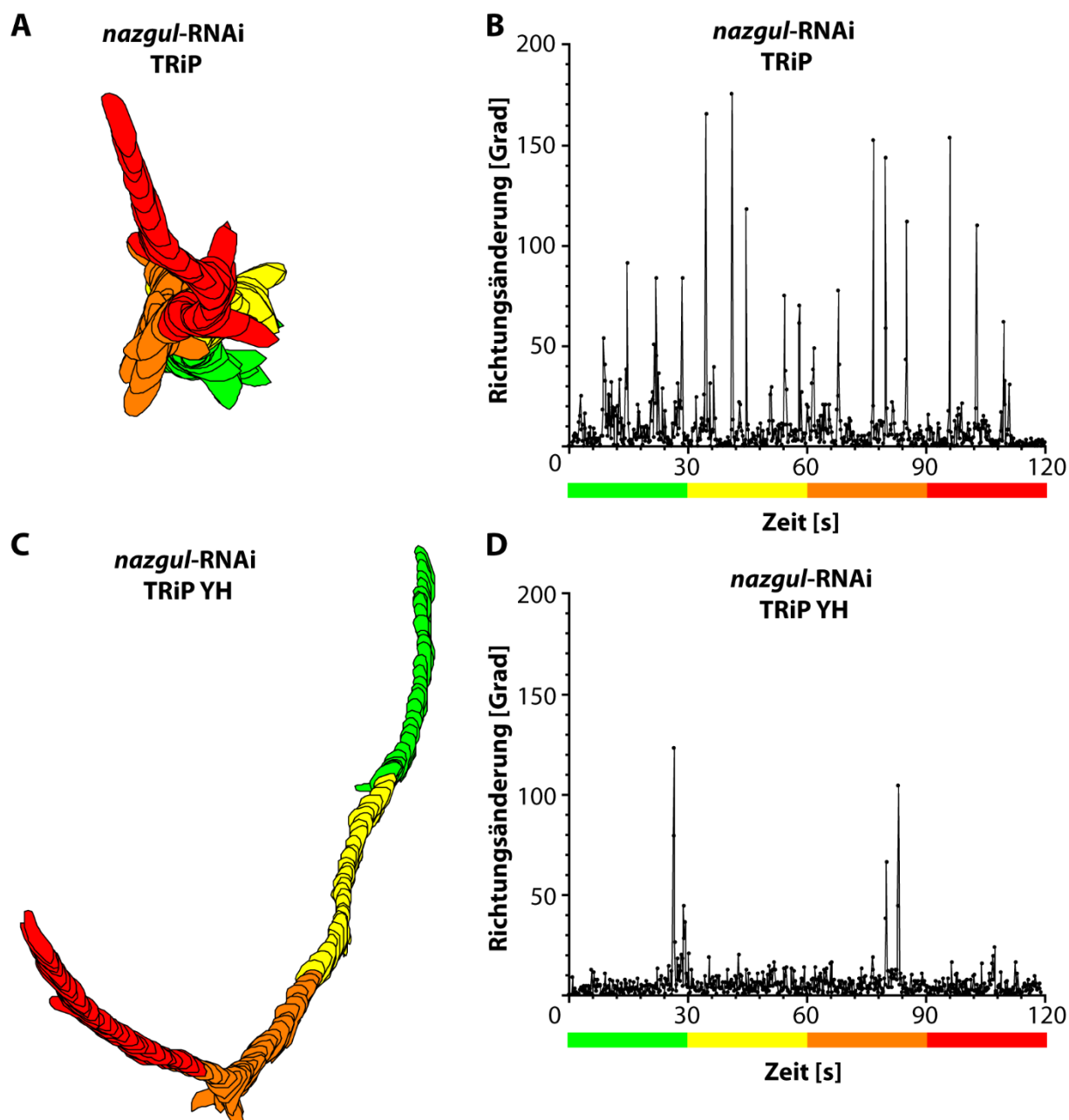


Abbildung 21: Yohimbin unterdrückt den Verhaltensphänotyp der *nazgul*-RNAi

Vergleich der Pfade von *nazgul*-RNAi-Tieren ohne YH und nach Applikation von YH mit einer Konzentration von 0,5 mg/ml im Futterbrei. Der Phänotyp der unbehandelten Tiere wird durch die Applikation von YH effektiv unterdrückt. Große Richtungsänderungen kommen nur selten vor (vergleiche B & D). Dargestellt sind jeweils die Tiere, die dem Median der Testgruppe entsprechen. **A:** Pfad einer unbehandelten Larve **B:** Richtungsänderungs-Zeit-Diagramm des Tieres aus A. **C:** Pfad einer mit YH behandelten Larve **D:** Richtungsänderungs-Zeit-Diagramm des Tieres aus C.

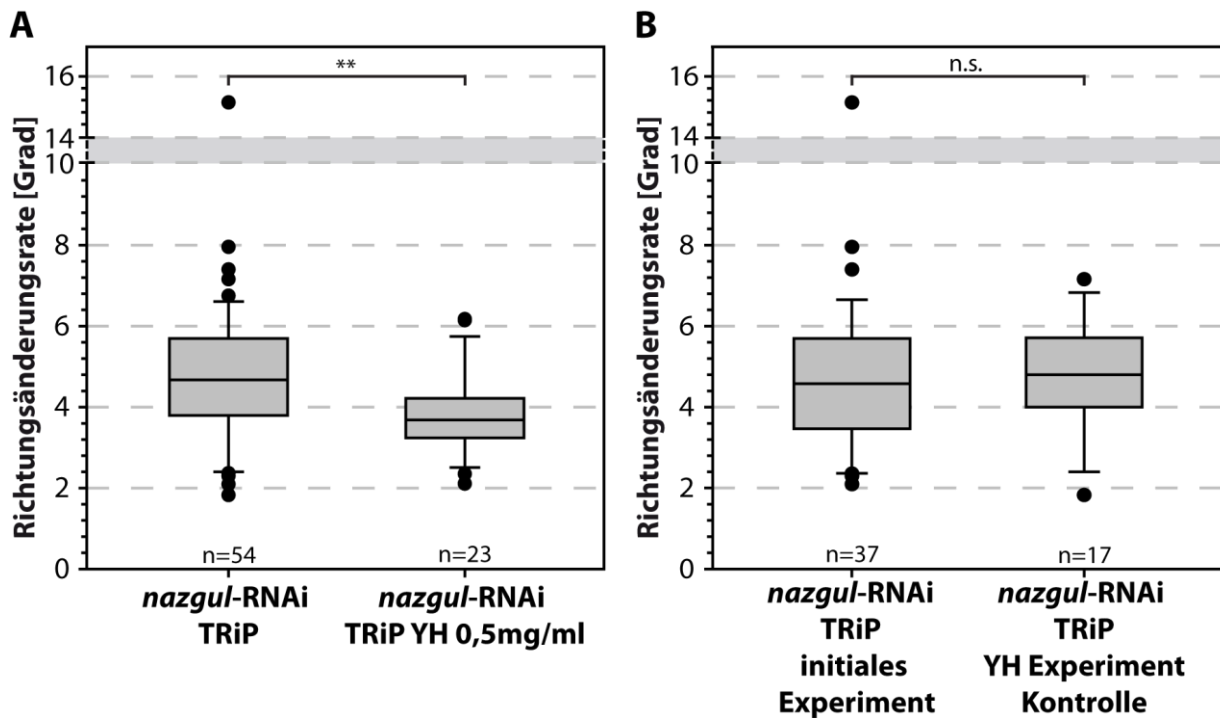


Abbildung 22: Statistische Auswertung des Yohimbin-Verhaltensversuchs

A: Die mit YH behandelten *naz*-RNAi-Tiere zeigen eine deutlich niedrigere Richtungsänderungsrate als unbehandelte Tiere desselben Genotyps (MWRST: $P=0,009$). **B:** Ein Vergleich zu unbehandelten, für das YH-Experiment verwendeter Tiere, ergab keine signifikante Abweichung gegenüber Daten des initialen *naz*-RNAi-Experiments (MWRST: $P=0,696$).

Die *nazgul*⁴¹⁻³⁶-Mutante wurde ebenfalls mit YH getestet. Auch bei diesen Tieren konnte eine starke Reduktion des Verhaltensphänotyps festgestellt werden. Im Gegensatz zu unbehandelten Tieren fanden sich bei mit YH behandelten Individuen auch wieder länger Phasen linearer Fortbewegung (Abb. 23A'). Dementsprechend sank die Richtungsänderungsrate stark ab (Abb. 23C; MWRST: $P<0,001$). Auch die Anzahl der *stop turns* war bei den getesteten Individuen signifikant niedriger als bei unbehandelten Tieren (Abb. 23D; MWRST: $P<0,001$).

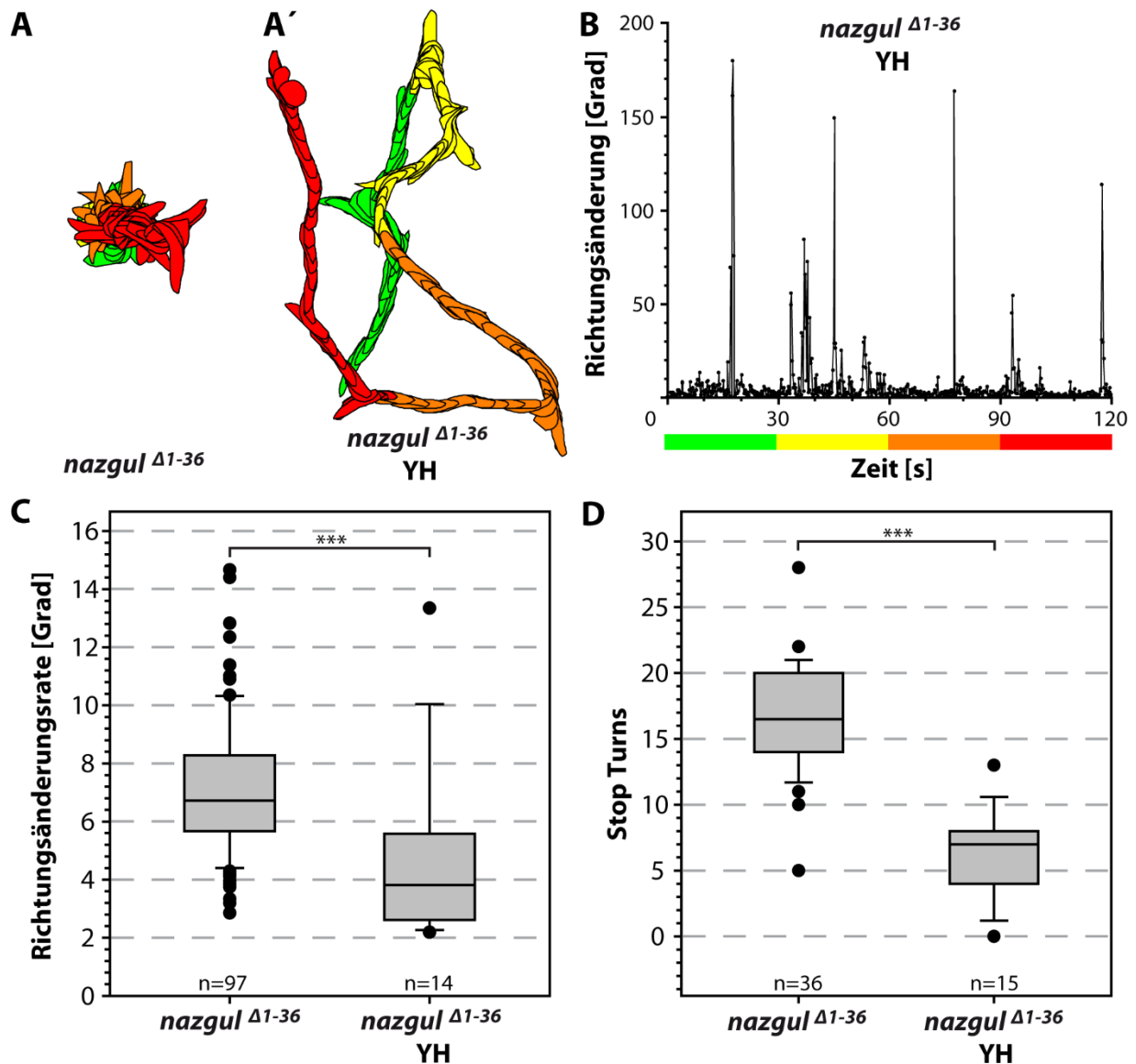


Abbildung 23: Yohimbine rettet den Phänotyp der *nazgul* ^{$\Delta 1-36$} -Mutante

Vergleich von *nazgul* ^{$\Delta 1-36$} -Mutanten mit und ohne YH-Applikation. Applikation von YH führt zu einer deutlichen Reduktion des Verhaltensphänotyps. Es können wieder längere Phasen linearer Fortbewegung beobachtet werden. Große Richtungsänderungen kommen nur noch selten vor. Die dargestellten Pfade entsprechen dem Median der Testpopulation. ***: $P < 0,001$. **A**: Pfad einer *nazgul* ^{$\Delta 1-36$} -Larve ohne Applikation von YH. **A'**: Pfad einer *nazgul* ^{$\Delta 1-36$} -Larve nach Applikation von YH (0,5 mg/ml). **B**: Richtungsänderungs-Zeit-Diagramm des Tieres aus **A'**. **C**: Vergleich der Richtungsänderungsraten mit und ohne YH-Applikation. Die Richtungsänderungsrate sinkt durch Applikation von YH stark ab (MWRST: $P < 0,001$). **D**: Vergleich der ausgeführten *stop turns* in zwei Minuten. Die Anzahl der *stop turns* sinkt durch Applikation von YH stark ab (MWRST: $P < 0,001$).

3.5.2 Fütterung von Tyramin kann erhöhte Richtungsänderungsraten verursachen

Der bei *naz*-Mutanten beobachtete Phänotyp konnte auch durch Fütterung von TA an WT Tiere ausgelöst werden. Hier wurden zunächst Eier WT Tiere auf TA-haltiges Medium überführt und konnten sich dort entwickeln. Es wurden Konzentrationen von 4 mg/ml, 10 mg/ml und 50 mg/ml verwendet. Die Konzentration von 50 mg/ml stellte sich als letal heraus. Hier konnten keine Tiere gefunden werden, die das Larvenstadium erreichten. Die beiden niedrigeren Konzentrationen führten nicht zu Letalität, sodass hier L3-Larven auf ihr Verhalten hin untersucht werden konnten. In beiden Fällen konnte eine signifikante Erhöhung der Richtungsänderungsrate beobachtet werden. Interessanterweise setzten die wiederholten *stop turns* meist erst nach etwa 30 Sekunden ein. Davor bewegten sich die Tiere geradeaus (Abb. 24A & B). Sobald jedoch ein *stop turn* ausgeführt wurde, verfielen die Tiere in das bereits bei *naz*-Mutanten und *naz*-RNAi-Tieren beobachtete Bewegungsmuster wiederholter *stop turns*. So als ob die Tiere nicht mehr in der Lage wären, das Bewegungsmuster „*stop turn*“ nach einmaliger Initiation wieder zu beenden.

Bereits die niedrigste getestete TA-Konzentration von 4 mg/ml reichte aus, um die Richtungsänderungsrate im Vergleich zu unbehandelten Tieren signifikant zu erhöhen (Abb. 24C; Student's t-test: $P=0,01$). Der Vergleich mit *naz*-RNAi-Tieren der VDRC-Kollektion zeigte keinen signifikanten Unterschied der Richtungsänderungsraten (Abb. 24D; MWRST: $P=0,855$). Für diese Vergleiche muss die Einschränkung geltend gemacht werden, dass die Kontrollpopulation nur für zwei Stunden auf dem, für die TA-Applikation verwendeten, Instantmedium gehalten wurde. Es kann daher nicht ausgeschlossen werden, dass durch eine längere Verweildauer auf diesem Medium Änderungen des Explorationsverhaltens verursacht werden könnten. Der Vergleich der Richtungsänderungsraten WT-Tiere, die auf Standardmedium und solchen, die für zwei Stunden auf Instantmedium gehalten wurden, ergab keinen signifikanten Unterschied (MWRST: $P=0,594$). Es wird daher davon ausgegangen, dass bei WT-Tieren keine Verhaltensänderungen durch das Instantmedium verursacht werden.

Tiere, die sich auf Medium mit 10 mg/ml TA entwickelten, zeigten eine etwas geringere Richtungsänderungsrate von $3,486^\circ$ als die zuvor bei 4 mg/ml TA getesteten Individuen, deren mediane Richtungsänderungsrate $3,817^\circ$ betrug. Die Richtungsänderungsrate der Tiere, die sich auf 10 mg/ml TA entwickelt hatten, war jedoch nicht signifikant niedriger (MWRST: $P=0,787$). Es kann also davon ausgegangen werden, dass die erhöhte TA-Konzentration keine weitere Verstärkung des Phänotyps verursacht.

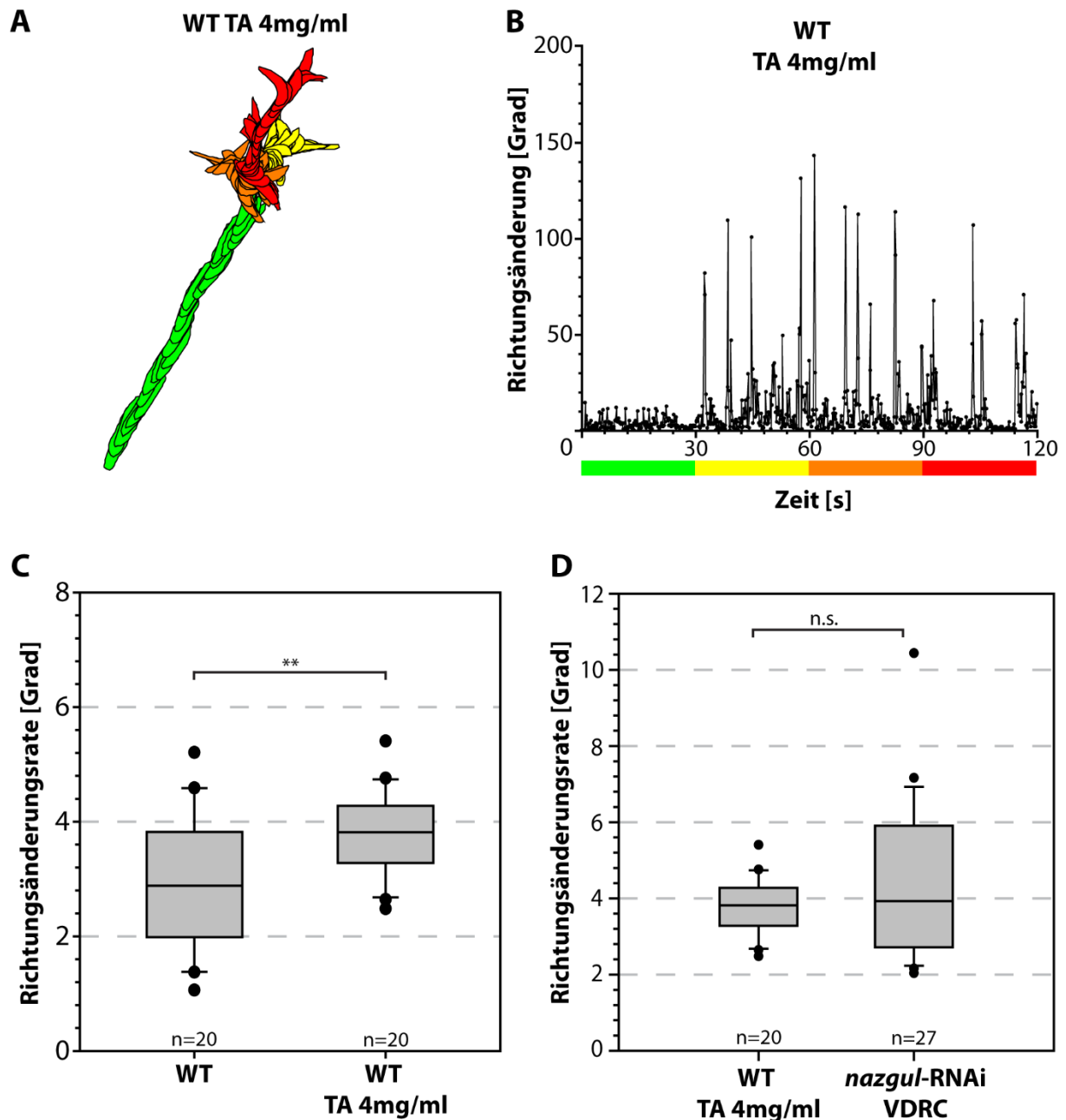


Abbildung 24: Fütterung von Tyramin erhöht die Richtungsänderungsrate

Der bereits bei *naz*-Mutanten und *naz*-RNAi Tieren beobachtete Phänotyp konnte auch durch Fütterung von TA ausgelöst werden. Dargestellt ist eines der beiden Tiere, die den Median der Testpopulation bilden. Es wurde das Tier mit der höheren Richtungsänderungsrate ausgewählt. **A**: Pfad einer WT-Larve, die sich auf einem Medium mit 4 mg/ml TA entwickelte. **B**: Richtungsänderungs-Zeit-Diagramm des Tieres aus A. **C**: Vergleich der Richtungsänderungsraten wildtypischer Tiere ohne TA im Medium und Tieren, die sich auf Medium mit 4 mg/ml TA entwickelten. Die Richtungsänderungsrate der, dem TA ausgesetzten Tiere ist signifikant erhöht (Student's t-Test: $P=0,01$). **D**: Vergleich der Richtungsänderungsraten TA-behandelter Tiere mit *naz*-RNAi-Tieren der VDRC-Kollektion. Es konnte kein signifikanter Unterschied der Richtungsänderungsraten festgestellt werden (MWRST: $P=0,855$). **: $P<0,01$; n.s.: nicht signifikant.

3.5.3 Tranylcypromin kann erhöhte Richtungsänderungsraten verursachen

Um Hinweise für die Beteiligung einer MAO am TA-Abbau zu erhalten, wurde der unspezifische MAO-Inhibitor *trans*-2-Phenylcyclopropylamin verwendet. Diese auch unter dem Namen Tranylcypromin (TC) bekannte Substanz ist ein irreversibler Inhibitor für MAOs. Im Falle eines TA-Abbaus unter Beteiligung einer MAO sollte durch deren Blockade ebenfalls ein erhöhter TA-Spiegel induziert werden, der wiederum zu einer erhöhten Richtungsänderungsrate führen müsste. Zur Überprüfung dieser Hypothese wurden WT-Tiere zwei Stunden auf Futtermedium gesetzt, das unterschiedliche Konzentrationen des MAO-Inhibitors TC enthielt. Das Medium enthielt jeweils 0,1 mg/ml, 0,5 mg/ml, 1 mg/ml und 2 mg/ml des MAO-Inhibitors. Die geringste Konzentration von 0,1 mg/ml des MAO-Inhibitors führte zu keiner signifikant erhöhten Richtungsänderungsrate der behandelten Tiere. Bei 0,5 mg/ml konnte eine signifikante Erhöhung der Richtungsänderungsrate gemessen werden. Interessanterweise führte eine weitere Erhöhung der TC-Konzentration auf 1 mg/ml und 2 mg/ml nicht, wie vermutet, zu weiter steigenden Richtungsänderungsraten. Für diese beiden Konzentrationen konnte kein signifikanter Unterschied zur unbehandelten Kontrolle festgestellt werden (Abb. 25A; Kruskal-Wallis One Way ANOVA on Ranks Dunn's Multiple Comparison: $P=0,014$, 0,1 mg/ml TC=n.s., 0,5 mg/ml TC=signifikant, 1 mg/ml TC=n.s., 2 mg/ml TC=n.s.). Die Richtungsänderungsrate der mit 0,5 mg/ml TC behandelten Tiere zeigte keinen signifikanten Unterschied zu *naz*-RNAi-Tieren der VDRC-Kollektion (Abb. 25B). Auch hier muss die Einschränkung geltend gemacht werden, dass die Tiere des *naz*-RNAi-Experiments vor dem Versuch nicht für zwei Stunden auf Instantmedium gehalten wurden. Da es sich bei den mit TC behandelten Tieren um WT-Tiere handelt, und für diese keine Verhaltensänderung nach zweistündigem Verweilen auf Instantmedium festgestellt werden konnte (Vergleich der Richtungsänderungsraten von Tieren, die zwei Stunden auf Instantmedium gehalten wurden und Tieren, die nur auf Standard Medium gehalten wurde: MWRST: $P=0,594$), wird dieser Vergleich hier als zulässig erachtet.

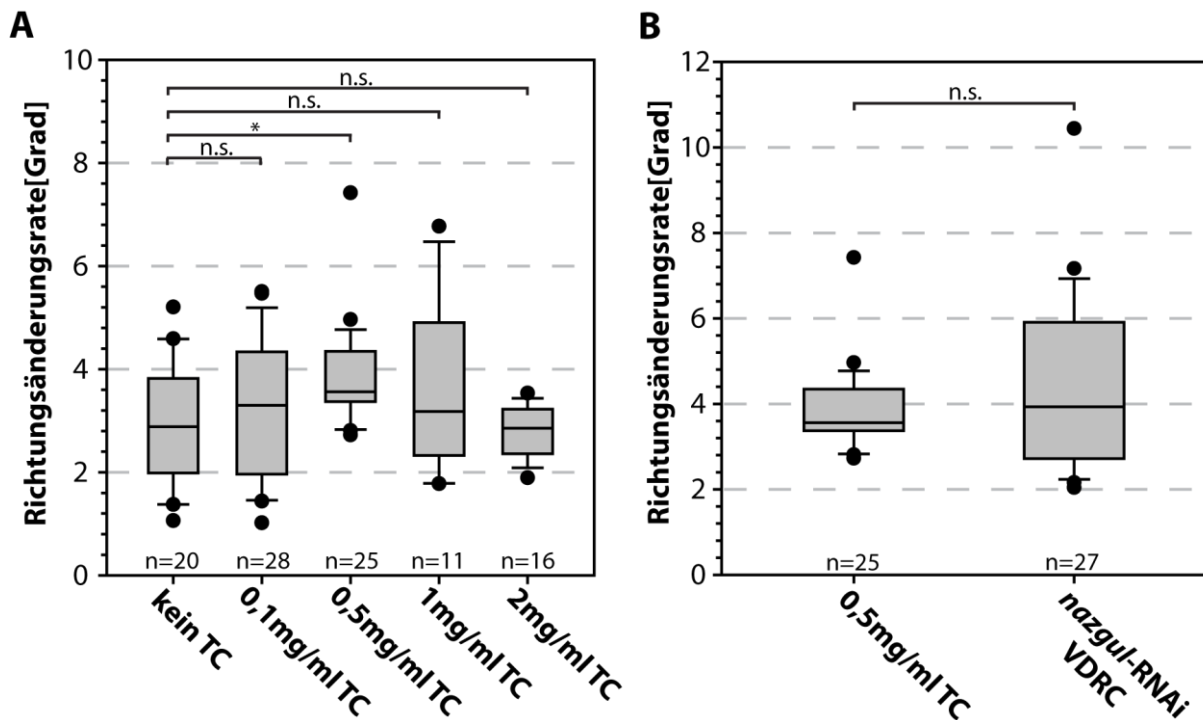


Abbildung 25: Tranylcypromin kann erhöhte Richtungsänderungsraten verursachen

Durch Fütterung von TC konnte eine mit dem Phänotyp der *naz*-RNAi vergleichbare Erhöhung der Richtungsänderungsrate induziert werden. Diese trat allerdings nur bei einer TC-Konzentration im Futtermedium von 0,5 mg/ml auf. Sowohl die niedrigere als auch die beiden höheren getesteten TC-Konzentrationen konnten keine signifikante Änderung der Richtungsänderungsraten hervorrufen **A**: Richtungsänderungsraten bei verschiedenen TC-Konzentrationen. **B**: Vergleich der Richtungsänderungsraten von WT, mit 0,5 mg/ml TC behandelten Tieren und Tieren des *naz*-RNAi-Experiments. *: $P < 0,05$; n.s.: nicht signifikant.

3.6 RNAi-Screen zur Identifizierung potentieller Tyramin-Transporter

Um TA in ALGs abbauen zu können, muss dieser Stoff zunächst von den Zellen aufgenommen werden. Dafür sollte ein Transporter existieren, der die Aufnahme in die Glia sicherstellt. In *Trichoplusia ni* (Aschgraue Höckereule), einem Schmetterling, konnte bereits ein Transporter mit hoher Affinität für OA und TA identifiziert werden (Malutan *et al.*, 2002). In der Folge wurden Orthologe dieses Transporters auch in einer Reihe anderer Insekten und Arthropoden identifiziert. In *Drosophila* konnte jedoch kein Ortholog dieses Transporters gefunden werden (Donly & Caveney 2005).

Dem hier durchgeführten Screen lag die Annahme zugrunde, dass ein erfolgreicher *knock-down* des TA-Transporters zu einer erhöhten TA-Konzentration im extrazellulären Raum führen würde. Diese sollte wiederum den bereits bekannten Verhaltensphänotyp der *naz*-Mutanten induzieren. Ein so induzierter Phänotyp sollte in der Folge durch den TA-Rezeptor-Antagonisten YH unterdrückbar sein.

Um eine möglichst spezifische Expression der Kandidaten-RNAi-Konstrukte in ALGs zu gewährleisten, wurden diese mit der Treiberlinie *Eaat1*-GAL4 exprimiert. In larvalen Stadien ist die Expression von *Eaat1* fast ausschließlich in Naz-positiven Glia zu finden (Stacey *et al.*, 2010). Die Auswahl der Kandidaten erfolgte auf Basis von *Gene Ontology Terms* (GO-Terms) der Datenbank *Flybase.org*. Hier wurde nach Proteinen gesucht, die mit dem GO-Term „neurotransmitter transporter activity“ sowie „L-amino acid transmembrane transporter activity“ klassifiziert waren. Diese wurden mit Daten eines Microarray-Screens für Gcm-Abhängige Gene verglichen (Altenhein *et al.*, 2006). Kandidaten die keine Gcm-abhängige Regulation zeigten, wurden aussortiert.

Die verbleibenden fünf Kandidaten (Tab.5) wurden nach dem zuvor beschriebenen Schema getestet.

Tabelle 7: Kandidaten des Tyramin-Transporter-RNAi-Screens

Kandidat	GO-Term
<i>Eaat1</i> (CG3747)	<i>L-glutamate transmembrane transporter activity</i>
<i>Eaat2</i> (CG3159)	<i>L-aspartate transmembrane transporter activity</i>
CG5549	<i>neurotransmitter transporter activity</i>
CG7708	<i>amino acid transmembrane transporter activity</i>
<i>Hoepel2</i> (CG15624)	<i>L-tyrosine transmembrane transporter activity</i>

Die Untersuchung von RNAi-Tieren der fünf Kandidaten erbrachte nur im Fall von *Eaat1* eine signifikante Abweichung vom Verhalten WT-Tiere. Alle anderen Kandidaten zeigten ein als wildtypisch einzustufendes Verhaltensmuster (Abb. 26A).

Tiere mit *Eaat1*-GAL4 getriebener *Eaat1*-RNAi zeigten einen deutlichen Phänotyp. Sie waren sehr langsam und führten viele Schwingbewegungen des Kopfes aus (Abb. 26A). Im Vergleich zum WT war eine starke Erhöhung der Richtungsänderungsraten zu beobachten (Abb. 26B; MWRST: $P < 0,001$). Auch im Vergleich zu den mit *white*-Mutanten verkreuzten heterozygoten Kontrolltieren ist die Richtungsänderungsrate der *Eaat1*-GAL4 getriebenen *Eaat1*-RNAi stark erhöht. Die Richtungsänderungsrate der heterozygoten Treiberlinie lag mit einem Median von $2,057^\circ$ sogar deutlich unter dem für WT-Tiere gemessenen Wert von $2,744^\circ$ (MWRST: $P < 0,001$; WT: $n=83$; *Eaat1*-GAL4 Kontrolle: $n=21$). Tiere der mit *white*-Mutanten verkreuzten *Eaat1*-RNAi-Linie zeigten im Vergleich mit WT-Tieren keine Abweichung der Richtungsänderungsrate (Median= $2,418^\circ$ MWRST: $P=0,214$; *Eaat1*-RNAi (VDRC) $n=19$). Interessanterweise ergab der Vergleich der *Eaat1*-GAL4 getriebenen *Eaat1*-RNAi mit *nazgul*^{A1-36}-Mutanten keinen signifikanten Unterschied der Richtungsänderungsraten (Abb. 26B; MWRST: $P=0,504$).

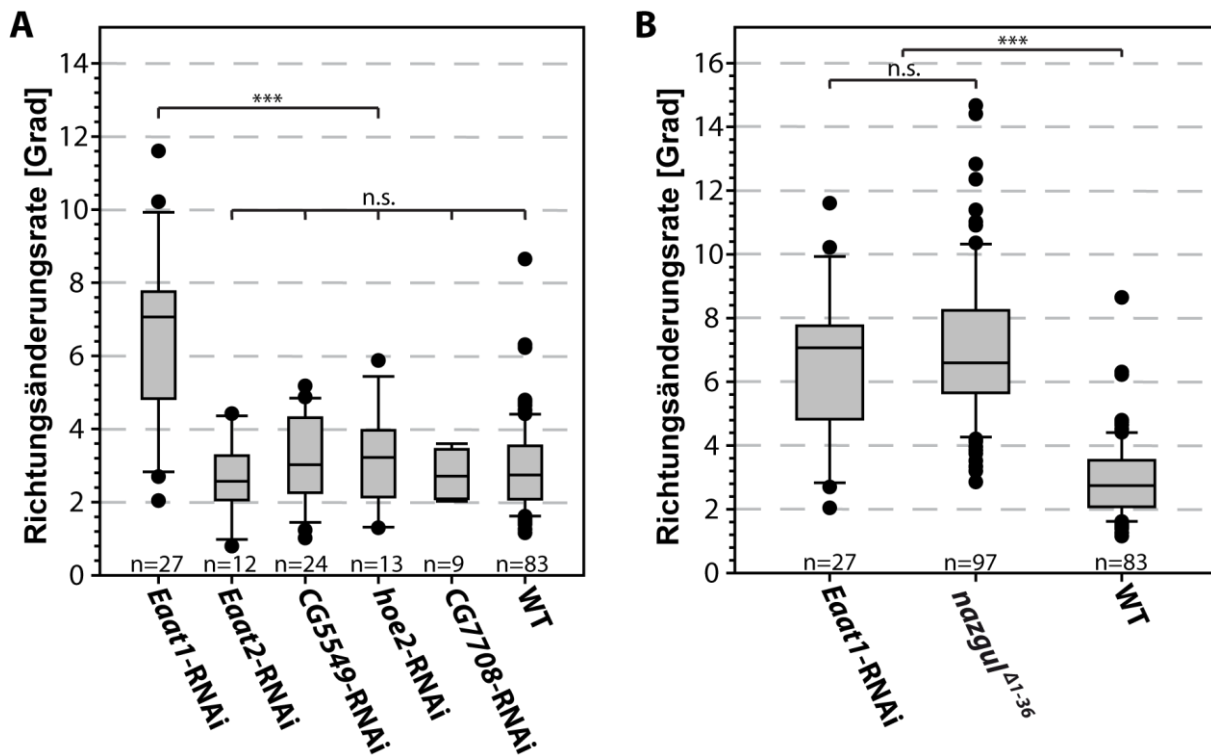


Abbildung 26: Ergebnisse des Tyramin-Transporter-RNAi-Screens

Vergleich der Richtungsänderungsraten der während des TA-Transporter-RNAi-Screens getesteten Kandidaten. Es konnte nur bei *Eaat1-RNAi*-Tieren eine signifikante Abweichung der Richtungsänderungsraten beobachtet werden (MWRST: $P < 0,001$). Der Vergleich mit *nazgul^{Δ1-36}*-Mutanten ergab keinen signifikanten Unterschied (MWRST: $P = 0,504$). ***: $P < 0,001$; n.s.: nicht signifikant. **A**: Richtungsänderungsraten der während des Screens untersuchten Kandidaten im Vergleich zu WT-Tieren **B**: Vergleich der Richtungsänderungsraten des *Eaat1-knock-down* mit *nazgul^{Δ1-36}*-Mutanten und WT-Tieren.

Die starke Erhöhung der Richtungsänderungsrate muss hier allerdings mit einer gewissen Skepsis betrachtet werden. Das verwendete Auswertesystem DIAS neigt aufgrund seiner pixelbasierten Arbeitsweise bei Objekten, die sich sehr langsam bewegen, dazu, unrealistisch hohe Richtungsänderungen auszugeben. Da die Richtungsänderung auf Basis des Zentroids, also eines Bildpunkts berechnet wird, die als Objekt erkannte Fläche und damit deren Zentrum aber von Bild zu Bild leicht variieren kann, kann es selbst bei stehenden Objekten zur Ausgabe sehr großer Richtungsänderungen kommen. Wenn sich das Zentrum der als Objekt erkannten Fläche beispielsweise um einen Bildpunkt nach rechts verschiebt, wird dies von DIAS als eine Richtungsänderung von 90° interpretiert. Deswegen wurde für die Auswertung der *Eaat1-RNAi* zusätzlich zur Richtungsänderungsrate die Anzahl der *stop turns* bestimmt. Dies erfolgte durch bildweise Durchsicht der gespeicherten Filme und manuelle Zählung der *stop turns* für jedes einzelne Tier.

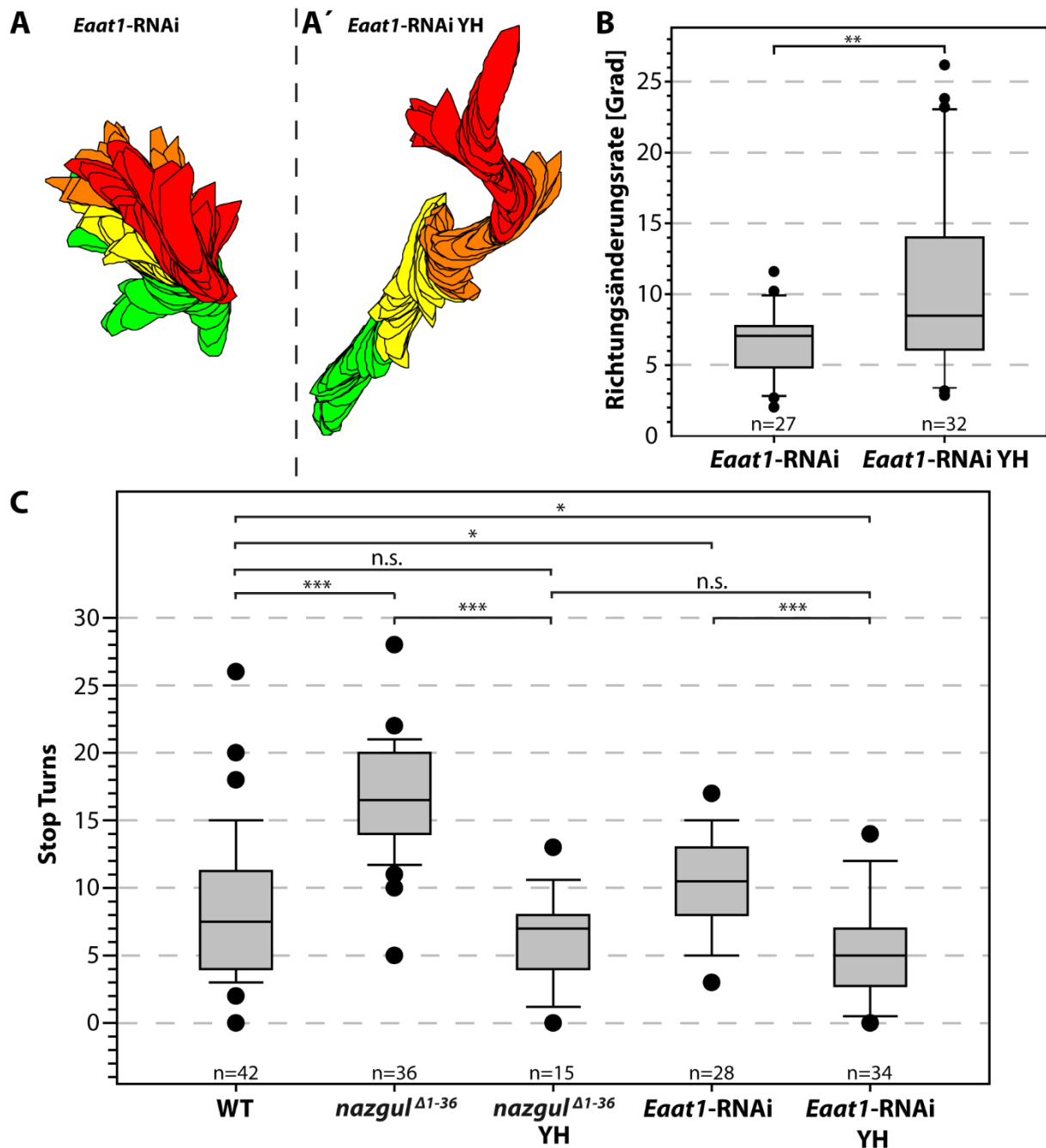


Abbildung 27: Der *Eaat1*-RNAi-Phänotyp ist durch Applikation von Yohimbin unterdrückbar

Tiere mit funktioneller *Eaat1*-RNAi zeigten einen deutlichen Phänotyp. Sie bewegten sich nur sehr langsam und führten mehr *stop turns* aus als die WT-Kontrollen. Dies konnte zum Teil durch Applikation von YH gerettet werden. Die Tiere waren zwar immer noch sehr langsam, zeigten aber deutlich weniger *stop turns*. Die im Vergleich zu unbehandelten Tieren stark erhöhte Richtungsänderungsrate kommt hier durch technische Limitierungen des Auswertsystems zustande und wird daher als nicht aussagekräftig betrachtet. *: $P < 0,05$, **: $P < 0,01$, ***: $P < 0,001$; n.s.: nicht signifikant. **A**: Vergleich der Pfade eines behandelten und eines unbehandelten Tieres. Es wurden jeweils die Pfade abgebildet, die dem Median der Gesamtpopulation entsprechen. **B**: Vergleich der Richtungsänderungsraten von unbehandelten und behandelten Tieren. **C**: Vergleich der Anzahl ausgeführter *stop turns* in zwei Minuten von WT, unbehandelten und behandelten *nazgul*^{Δ1-36}-Mutanten sowie unbehandelten und behandelten *Eaat1*-RNAi-Tieren.

Die Betrachtung der *stop turns* der *Eaat1*-RNAi-Tiere lieferte erwartungsgemäß einen weniger drastischen Phänotyp. Während *nazgul*^{Δ1-36}-Mutanten im Median 16,5 *stop turns* in zwei Minuten ausführten, wurden bei *Eaat1*-RNAi-Tieren im selben Zeitraum nur 10,5 *stop turns* gemessen (Abb. 27C; Student t-Test: P<0,001). Dieser Wert liegt allerdings immer noch signifikant über der für WT-Tiere bestimmten Anzahl an *stop turns*, die im Beobachtungszeitraum im Median 7,5-mal dieses Bewegungsmuster zeigten (Abb. 27C; MWRST: P=0,012).

Aufgrund der im Vergleich zum WT erhöhten Anzahl an *stop turns* wurden ebenfalls Tiere der *Eaat1*-RNAi mit YH behandelt. Die behandelten Tiere waren immer noch sehr langsam, zeigten im Vergleich zu unbehandelten Tieren aber eine deutliche Reduktion der Anzahl an *stop turns* (Abb. 27C; Student t-Test: P<0,001). Auch die Betrachtung der Pfade zeigte wieder deutliche Phasen linearer Fortbewegung (Abb. 27A & A'). Im Gegensatz dazu war die Richtungsänderungsrate der mit YH behandelten Tiere deutlich größer als die unbehauelter Tiere (Abb. 27B; MWRST: P=0,004). Dies erscheint bei vergleichender Betrachtung der Pfade behauelter und unbehauelter Tiere (Abb. 27A & A') als wenig realistisch und ist mit großer Sicherheit den bereits beschriebenen technischen Limitierungen des Auswertprogramms geschuldet.

Der TA-Transporter-RNAi-Screen wurde im Rahmen einer von mir betreuten Bachelorarbeit unter Mithilfe von Aytül Dadak durchgeführt (Dadak Bachelorarbeit, 2013).

3.6.1 Versuchter Nachweis des Tyramin-Transports durch *Eaat1*

Nach den vielversprechenden Ergebnissen des *Eaat1*-RNAi-Experiments wurde der Versuch unternommen den TA-Transport durch *Eaat1* mittels ektopischer Expression von *Eaat1* in Zellkultur und anschließender AK-Färbung gegen TA direkt nachzuweisen. Dazu wurde die proteinkodierende Sequenz des *Eaat1*-Proteins in den Expressionsvektor pTVW kloniert. Dieser enthält neben einem über GAL4-induzierbaren Promotor auch eine an die Sequenz des Zielproteins angeschlossene Sequenz des fluoreszenten-Proteins Venus. Da kein Antikörper gegen *Eaat1* zur Verfügung stand, sollte die Expression des *Eaat1*::Venus-Fusionsproteins über das Venus-Protein nachgewiesen werden. Dieses kann mit gegen GFP gerichteten Antikörpern gefärbt werden.

Zur Expression wurden S2R⁺-Zellen verwendet. Diese wurden mit einem Gemisch des UAS-*Eaat1*::Venus-Expressionsvektors und eines *Actin5C*-GAL4-Vektors transfiziert. In der Folge wurde dem Kulturmedium sechs verschiedene Konzentrationen zwischen 5 mM und 50 nM TA zugegeben. Als Negativkontrolle wurde einem Ansatz nicht transfizierter Zellen 50 μM TA zugesetzt. Als weitere Negativkontrolle wurde einem Ansatz transfizierter Zellen lediglich dieselbe Menge des als Lösungsmittel verwendeten Wassers ohne TA zugegeben.

In allen transfizierten Ansätzen konnten Venus-positive Zellen nachgewiesen werden (Abb. 28). Leider lassen die Ergebnisse dieses Versuchs keine Rückschlüsse zum TA-Transport durch *Eaat1*

zu, da in allen Ansätzen sowohl Venus-positive als auch Venus-negative Zellen eine positive TA-Färbung aufwiesen. Zudem enthielten beide Negativkontrollen TA positive Zellen (Abb. 28G & H).

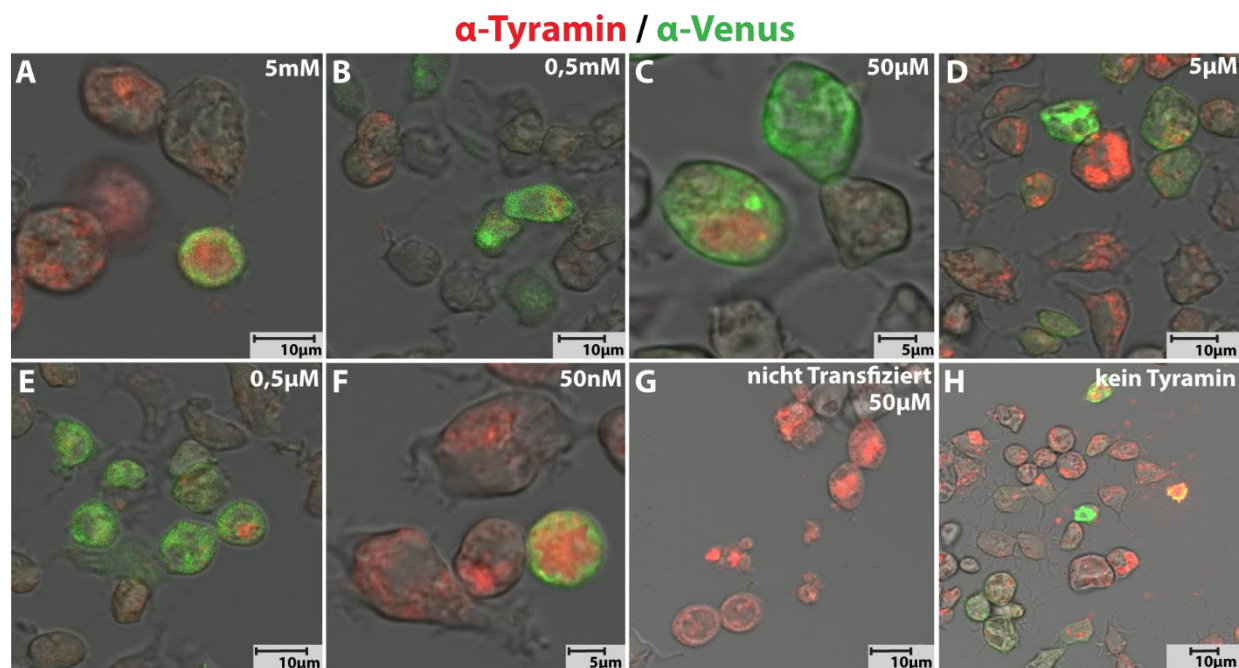


Abbildung 28: Versuchter Nachweis des Tyramin-Transports durch Eaat1

LSM-Aufnahmen der Eaat1-exprimierenden Zellen, die mit unterschiedlichen TA-Konzentrationen versetzt wurden. Die Zellen wurden gegen TA (rot) und Venus (grün) gefärbt. Neben den Eaat1-exprimierenden Zellen konnten immer auch TA-positive Zellen gefunden werden, die keine Eaat1-Expression zeigten. Dies war auch in beiden Negativkontrollen der Fall.

4 Diskussion

In dieser Arbeit wurden Untersuchungen angestellt, um eine funktionelle Charakterisierung des *Drosophila* Gens *naz* zu ermöglichen. Die dabei erzielten Ergebnisse führten zu der Hypothese, dass Naz am TA-Stoffwechsel des ZNS beteiligt ist. TA wird hier von ALGs aufgenommen und unter Beteiligung von Naz abgebaut. Die durchgeführten Untersuchungen an ALG-spezifischen Neurotransmitter-Transporter-*knock-down*-Tieren liefern erste Hinweise, dass die TA-Aufnahme durch den Transmembran-Transporter *Eaat1* geleistet wird, der bisher ausschließlich als Glutamat-Transporter charakterisiert wurde (Besson *et al.*, 1999, Besson *et al.*, 2000).

4.1 Mutationen im *nazgul*-Lokus führen zu Verhaltensphänotypen

Die drei, in dieser Arbeit untersuchten, *naz*-Exzisionsmutanten zeigten alle im Vergleich zum WT erhöhte Richtungsänderungsraten sowie pupale Letalität. Bei Tieren des Stammes *nazgul*^{Δ1-36} wurde dabei ein deutlich stärkerer Verhaltensphänotyp als bei Tieren der Stämme *nazgul*^{Δ1-17} und *nazgul*^{Δ2-11} festgestellt, die keinen signifikanten Unterschied zueinander aufweisen. Diese Beobachtungen sind nicht ohne Weiteres mit den, bei der Sequenzierung der *naz*-Lozi vorgefundenen Verhältnissen in Einklang zu bringen. Einerseits scheint die Stärke der Verhaltensänderung nicht direkt mit der Größe der P-Element-Reste zu korrelieren. In diesem Fall müsste die Mutante *nazgul*^{Δ1-17} einen stärkeren Verhaltensphänotyp aufweisen als die Mutante *nazgul*^{Δ2-11}. Zudem zeigt der Ausgangsstamm der Exzisionsmutagenese ebenfalls erhöhte aber nicht von *nazgul*^{Δ1-17} und *nazgul*^{Δ2-11} unterscheidbare Richtungsänderungsraten. Andererseits scheint es durchaus einen Zusammenhang zwischen der Größe der verbliebenen P-Elementinsertion und Expression des Naz-Proteins zu geben. Dieser Umstand könnte durch eventuell noch vorhandene Bestandteile des *gypsy*-Elements, das zur Konstruktion des mobilisierten P-Element verwendet wurde, erklärt werden (Roseman *et al.*, 1995). Das *gypsy*-Element gilt als potenter Repressor von 5'-gelegenen Enhancern (Peifer & Bender, 1986). Wären diese Sequenzen in *nazgul*^{Δ1-36} noch vorhanden, in *nazgul*^{Δ1-17} und *nazgul*^{Δ2-11} jedoch nicht mehr, würde dies die gefundenen Unterschiede in der Protein-Expression erklären. Um diese Hypothese zu belegen, liegen jedoch nicht genug Daten vor, da die jeweiligen P-Elementreste nicht vollständig sequenziert wurden. Auch die Hypothese: Die verminderte Naz-Expression der P-Element-Exzisionsmutanten sei auf fehlerhaftes *splicing* zurückzuführen, konnte nicht bestätigt werden. Die untersuchten mRNAs der Mutanten *nazgul*^{Δ1-17} und *nazgul*^{Δ2-11} wiesen keine *splicing*-Fehler auf. In diesem Kontext stellte sich die Frage, wodurch die bei allen drei Exzisionsmutanten vorgefundene Letalität ausgelöst wird. Leider konnten, die für ein *rescue*-Experiment benötigten Fliegenstämme nicht hergestellt werden. Alle Versuche die Mutante *nazgul*^{Δ1-36} mit entsprechenden Gal4- oder UAS-Konstrukten zu kombinieren scheiterten. Deshalb wurden

Transheterozygote der Mutante *nazgul*^{Δ1-36} und der, den *nazgul*-Lokus überspannenden, Defizienz Df(3R)EXEL6178 untersucht. Aus der Tatsache, dass diese Transheterozygoten keine Letalität zeigten, kann geschlossen werden, dass zumindest in *nazgul*^{Δ1-36} eine weitere Mutation vorliegen muss, die für die beobachtete Letalität verantwortlich ist. Außerdem scheint diese zweite Mutation den Verhaltensphänotyp deutlich zu verstärken, da die Transheterozygoten zwar eine zum WT signifikante Erhöhung der Richtungsänderungsrate aufwiesen, diese jedoch deutlich unter den für homozygote Tiere des Stammes *nazgul*^{Δ1-36} gemessenen Werten blieb. Da alle drei untersuchten Exzisionsmutanten pupale Letalität zeigten, kann davon ausgegangen werden, dass sie alle von dieser zweiten Mutation betroffen waren. Diese Schlussfolgerung wird auch von der Tatsache unterstützt, dass bei keinem der beiden *naz*-RNAi-Experimenten pupale Letalität beobachtet wurde. Dennoch zeigen gerade die RNAi-Experimente sowie die Transheterozygoten das Störungen der *naz*-Expression zu Verhaltensphänotypen führen. Für weitere Untersuchungen erscheint es dennoch ratsam, mit spezifischeren Methoden wie dem CRISPR/Cas9 System (Cong *et al.*, 2013; Gratz *et al.*, 2013), genetisch einwandfreie *naz*-Mutanten herzustellen.

4.2 Die beobachteten Verhaltensphänotypen sind auf gliaspezifischen Funktionsverlust von Nazgul in ALGs zurückzuführen

Im Laufe der Untersuchungen konnten sowohl bei den untersuchten *naz*-Exzisionsmutanten als auch bei dem, für die Exzisionsmutagenese verwendeten Ausgangsstamm, Veränderungen des Explorationsverhaltens festgestellt werden. Die untersuchten Stämme wiesen im Vergleich zu WT-Tieren allesamt erhöhte Richtungsänderungsraten sowie vermehrt auftretende *stop turns* auf. Die bei *naz*-Mutanten beobachteten Phänotypen konnten ebenso durch den Einsatz gliaspezifischer *naz*-RNAi erzeugt werden. Diese Ergebnisse lassen den Schluss zu, dass die beobachteten Verhaltensänderungen gliaspezifische Phänotypen darstellen. Diese Schlussfolgerung wird durch die Tatsache untermauert, dass die beschriebenen *Naz*-exprimierenden Neurone im VNS von *nazgul*^{Δ1-36}-Tieren, die nur über eine sehr schwache *Naz*-Expression verfügen, weiterhin nachweisbar waren. Die beobachteten Phänotypen sind daher auf fehlende oder verminderte *Naz*-Funktion in ALGs zurückzuführen.

Im embryonalen ZNS wird *Naz* hauptsächlich in LGs exprimiert. Bis ins St. 16 ist *Naz* in allen neun LGs nachweisbar. Im St. 15 der Embryonalentwicklung sind zusätzlich drei CBG sowie eine SPG *Naz*-positiv. Allerdings konnte lediglich im St. 15 *Naz*-Expression in diesen Zellen nachgewiesen werden. Ab St. 17 ist *Naz* nur noch in den sechs Pros-positiven LG des A- & M-Cluster zu finden. In diesen Zellen bleibt die *Naz*-Expression auch im larvalen VNS erhalten. Die verbliebenen sechs *Naz*-positiven Glia können aufgrund ihrer Pros-Expression, eindeutig als ALGs klassifiziert werden. Wie vor Kurzem gezeigt werden konnte, ist Pros, der für die Annahme des ALG-Schicksals kritische Transkriptionsfaktor (Peco *et al.*, 2016).

Die Zellkörper der ALGs sind um das Neuropil angeordnet, senden jedoch Zellfortsätze ins Innere des Neuropils, wo sie mit den dort lokalisierten Axonen und Synapsen interagieren und vielfältige Funktionen übernehmen (Awasaki *et al.*, 2008; Doherty *et al.*, 2009; Stork *et al.*, 2014). Es konnte bereits gezeigt werden, dass ALGs an der Aufrechterhaltung der Neurotransmitter-Homöostase und am Neurotransmitter-Metabolismus beteiligt sind: Der durch RNAi induzierte Verlust des in ALGs exprimierten Glutamat-Transporters Eaat1 (Besson *et al.*, 2000) führt im adulten ZNS von *Drosophila* zu Neuropil-Degeneration und verkürzter Lebensdauer der Tiere, was von Rival *et al.* auf oxidativen Stress zurückgeführt wird (Rival *et al.*, 2004). Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass der Verlust von Eaat1 zu Störungen des larvalen Lokomotionsverhaltens führt (Stacey *et al.*, 2010). Betroffene Tiere zeigten hier deutlich langsamere und nur selten vollständige peristaltische Kontraktionswellen. Neben Eaat1 werden in ALGs ebenfalls am Neurotransmitter-Metabolismus beteiligte Enzyme wie die, am Glutamat-Stoffwechsel beteiligte, GS2 sowie die β -Alanyl-Dopamin-Synthetase Ebony (Freeman *et al.*, 2003; Kato *et al.*, 2011), die am Dopamin-Stoffwechsel beteiligt ist (Richardt *et al.*, 2003), exprimiert. Es wäre also nicht verwunderlich, wenn sich diese Zellen ebenfalls am TA-Stoffwechsel beteiligen würden.

Eine Voraussetzung für die Beteiligung der ALGs am TA-Stoffwechsel ist, dass TA in diesen Zellen vorhanden ist. Um zu testen, ob TA in ALGs nachweisbar ist, wurden Antikörperfärbungen gegen TA durchgeführt. Der dazu verwendete Antikörper wurde bereits mehrfach erfolgreich zum immunhistochemischen Nachweis von TA in fixiertem *Drosophila*-Gewebe eingesetzt (Busch *et al.*, 2009; Selcho *et al.*, 2012; Selcho *et al.*, 2014). Die genannten Arbeiten konzentrierten sich allerdings auf neuronale Komponenten des NS. TA-positive Glia wurden bisher nicht beschrieben. Tatsächlich konnten im ZNS WT-L3-Larven schwach TA-positive Zellen nachgewiesen werden, die ihrer Morphologie und Position im ZNS nach, ALGs darstellen könnten. Die Wiederholung der TA-Färbung am NS von *nazgul*^{Δ1-36}-Tieren zusammen mit einer Repo- und Pros-Färbung brachte die Gewissheit, dass es sich bei diesen Zellen um ALGs handelt. Die Tatsache, dass im WT nur sehr schwache TA-Signale detektiert werden konnten, ist in Hinblick auf einen, in ALGs stattfindenden, TA-Abbau nicht verwunderlich.

4.3 Nazgul ist am Tyramin-Abbau beteiligt

Die bei allen untersuchten *naz*-Mutanten und *naz*-RNAi Stämmen beobachteten Verhaltensphänotypen zeigen auffällige Ähnlichkeit zu Phänotypen, die bei Mutanten der T β h beobachtet wurden. Die T β h ist im larvalen VNS in VUM- und *dorsal unpaired median* (DUM) Neuronen exprimiert (Selcho *et al.*, 2012) und katalysiert dort die Umwandlung von TA zu OA. Der Ausfall dieses Enzyms in T β h-null-Mutanten führt zu einer starken Erhöhung der TA-Konzentration und zur fast vollständigen Abwesenheit von OA im NS betroffener Tiere (Monastirioti *et al.*, 1996). In der Imago führt diese Verschiebung der OA- und TA-Konzentrationen dazu, dass Weibchen nicht mehr in der Lage sind, Eier abzulegen. Dieser

Phänotyp wird durch die Abwesenheit von OA verursacht und kann durch Fütterung von OA gerettet werden (Monastirioti *et al.*, 1996). Ein weiterer Effekt der *Tβh*-Mutation konnte im Flugverhalten gefunden werden. *Tβh*-Mutanten sind zwar grundsätzlich in der Lage zu fliegen, zeigen aber im Vergleich zu WT verkürzte Flugzeiten und reagieren weniger sensitiv auf Wind-Stimuli. Diese Phänotypen konnten durch pharmakologische Blockade der TA-Rezeptoren mit Hilfe von YH gerettet werden (Brembs *et al.*, 2007). In larvalen Stadien konnten ebenfalls Verhaltensphänotypen bei *Tβh*-Mutanten festgestellt werden: Betroffene Tiere zeigten hier eine, im Vergleich zu WT Tieren, starke Erhöhung der Richtungsänderungsraten und verbrachten deutlich weniger Zeit in linearer Fortbewegung (Saraswati *et al.*, 2004). Auch hier konnte durch Applikation von YH eine Rettung des Verhaltensphänotyps erreicht werden (Saraswati *et al.*, 2004). Durch Fütterung von OA konnte ebenfalls eine teilweise Rettung des Lokomotionsverhaltens erzielt werden. Die Autoren ziehen daraus die Schlussfolgerung, dass die korrekte Balance der beiden Amine OA und TA eine wichtige Rolle für das Lokomotionsverhalten der Larve spielt (Saraswati *et al.*, 2004). Diese Annahme wird durch weitere Studien an verschiedenen Mutanten des OA-TA-Systems unterstützt. Es konnte gezeigt werden, dass *honoka*-Larven, die reduzierte TA-Rezeptor-Expression zeigen (Kutsukake *et al.*, 2000), längere Wegstrecken zurücklegten als WT-Kontrollen, während *Tβh*-Mutanten deutlich kürzere Strecken zurücklegten (Selcho *et al.*, 2012). Auch hier wird die Hypothese einer antagonistischen Modulation des Lokomotionsverhaltens durch OA und TA bekräftigt. Generell scheint in *Drosophila* eine Verschiebung des OA-TA-Gleichgewichts hin zu TA häufigere Richtungswechsel und eine Verkürzung der zurückgelegten Wegstrecken auszulösen. Verschiebt sich das Gleichgewicht in Richtung OA, werden weniger Richtungswechsel ausgeführt und die Phasen geradliniger Bewegung werden länger.

Interessanterweise spielt TA eine wichtige Rolle in der Fluchtreaktion von *Caenorhabditis elegans*, die ebenfalls eine scharfe Richtungsänderung, den sog. *omega turn* beinhaltet. Es konnte gezeigt werden, dass TA hier sowohl für die Termination der Vorwärtsbewegung als auch für die Ausführung des später ausgeführten *omega turns* verantwortlich ist. Bemerkenswert ist dabei, dass TA im ersten Schritt der Fluchtreaktion über den ionotropen TA-Rezeptor LGC-55 wirkt, während der *omega turn* vom extrasynaptischen metabotropen TA-Rezeptor SER-2 abhängig ist (Donnelly *et al.*, 2013). TA wirkt hier also innerhalb eines Bewegungsablaufs erst als Neurotransmitter und im Anschluss als Neuromodulator.

Das Verhalten der in dieser Studie untersuchten *naz*-mutanten-Larven weist große Ähnlichkeiten zum Verhalten der *Tβh*-Mutanten auf. Auch die untersuchten *naz*-Mutanten zeigen stark erhöhte Richtungsänderungsraten sowie nur kurze Phasen geradliniger Fortbewegung. Um zu überprüfen, ob der bei *naz*-Mutanten beobachtete Phänotyp durch eine erhöhte TA-Konzentration im ZNS ausgelöst wird, wurden *naz*-Mutanten und *naz*-RNAi-Tiere mit YH behandelt. Die aus der Applikation von YH resultierende Blockade der TA-Rezeptoren sollte

erhöhte TA-Konzentrationen im ZNS maskieren und somit eine Rettung des Phänotyps bewirken. Diese Annahme konnte bestätigt werden. Sowohl bei Tieren der *naz*-RNAi als auch bei Tieren der *nazgu*^{Δ1-36}-Mutante führte die Applikation von YH zu signifikant niedrigeren Richtungsänderungsraten. Auch die Anzahl ausgeführter *stop turns* ging deutlich zurück und die Tiere zeigten wieder längere Phasen geradliniger Fortbewegung. Eine pharmakologische Blockade der TA-Rezeptoren führt also zu einer effektiven Rettung des Naz-Phänotyps. Zudem konnte bei adulten *naz*-RNAi-Tieren ein Flugphänotyp festgestellt werden, der dem von *Tβh*-Mutanten entspricht (persönliche Kommunikation Carsten Duch).

Um zu überprüfen, ob TA allein ausreichend ist, um eine Erhöhung der Richtungsänderungsraten auszulösen, wurden WT-Tiere mit TA-haltigem Futter behandelt. Ähnliche Versuche mit Canton-S-Larven, hatten in vorherigen Untersuchungen keine Verhaltensänderungen nach TA-Applikation feststellen können (Saraswati *et al.*, 2004). Allerdings wurde hier lediglich die Pfadlänge und nicht die Richtungsänderungsrate betrachtet (Saraswati *et al.*, 2004). Die von mir mit TA-haltigem Futter behandelten Larven, zeigten in der Folge deutlich höhere Richtungsänderungsraten als unbehandelte Tiere. Durch Fütterung von TA konnte eine ähnlich starke Erhöhung der Richtungsänderungsraten induziert werden wie mit *naz*-RNAi. Zusammengefasst stützen diese Ergebnisse die Hypothese eines erhöhten TA-Spiegels im NS der untersuchten Tiere. Letztendlich lassen sie allerdings nur die Schlussfolgerung zu, dass die beobachteten Verhaltensphänotypen der *naz*-Mutanten und RNAi-Tiere durch Hyperaktivierung eines TA-Rezeptors im NS der Tiere ausgelöst werden. Ob diese tatsächlich durch eine Erhöhung des TA-Spiegels oder durch andere unbekannte Faktoren ausgelöst wird, bleibt unklar. Hier könnte eine direkte Bestimmung des TA-Spiegels im NS betroffener Tiere klären, ob tatsächlich ein erhöhter TA-Spiegel vorliegt. Die Quantifizierung des TA-gehalts einzelner NS scheint allerdings selbst mit fortschrittlichen Analysemethoden kein einfaches Unterfangen zu sein. TA kann jedoch durch Kapillar-Elektrophorese mit nachgeschalteter Fast-Scan-Cyclic-Voltammetry-detektion in einzelnen NS nachgewiesen und quantifiziert werden (Fang *et al.*, 2011; Denno *et al.*, 2015).

4.4 Eaat1 als potentieller Tyramin-Transporter

Eine weitere Voraussetzung für den TA-Abbau in ALGs ist, dass TA in die Zelle transportiert wird. Für die fehlerfreie Funktion des NS ist es unerlässlich, dass Neurotransmitter möglichst schnell aus dem synaptischen Spalt entfernt und dadurch inaktiviert werden. Es konnte bereits gezeigt werden, dass ALGs an diesem Prozess beteiligt sind: ALGs exprimieren den GABA-Transporter GAT und entfernen GABA aus dem synaptischen Spalt (Stork *et al.*, 2014). Auch die Aufnahme von Glutamat über den Transporter Eaat1 wird durch ALGs gewährleistet (Besson *et al.*, 2000; Rival *et al.*, 2004). Spezifische Transporter für TA und OA konnten in *Drosophila* bisher jedoch nicht

identifiziert werden. Ein in *Trichoplusia ni* identifizierter OA-Transporter (Malutan *et al.*, 2002) konnte in *Drosophila* nicht nachgewiesen werden (Donly & Caveney, 2005).

Um mögliche TA-Transporter zu identifizieren, habe ich deshalb einen RNAi-Screen durchgeführt. Dieser basierte auf der Annahme, dass ein ALG-spezifischer *knock-down* des TA-Transporters zu ähnlichen larvalen Lokomotionsphänotypen, wie der Ausfall von *Naz* oder der *Tβh* führen würde. Dieser Phänotyp sollte in der Folge durch YH zumindest teilweise gerettet werden können. Interessanterweise konnten diese Bedingungen bei Tieren mit RNAi *knock-down* von *Eaat1* erfüllt werden: Diese Tiere waren sehr langsam, zeigten aber ähnlich wie die zuvor untersuchten *naz*-Mutanten, eine signifikante Steigerung der Richtungsänderungsrate sowie der Anzahl an *stop turns*. Durch Fütterung von YH konnte die Anzahl der *stop turns* deutlich reduziert werden. Diese Ergebnisse sind überraschend, weil *Eaat1* bisher lediglich als Glutamat-Transporter beschrieben wurde (Besson *et al.*, 2000; Rival *et al.*, 2004; Rival *et al.*, 2006; Stacey *et al.*, 2010). Bisher gab es keine Hinweise, dass *Eaat1* an der Aufnahme von TA beteiligt sein könnte. Dennoch weisen die, für *Eaat1*-Mutanten beschriebenen Phänotypen große Ähnlichkeiten zu Phänotypen auf, die bei *Tβh*-Mutanten vorgefunden wurden. Stacey *et al.* (2010) beschrieben *eaat1*-mutante Larven als deutlich langsamer als untersuchte Kontrolltiere. Die langsame Fortbewegung resultierte hier aus einer erheblich geringeren Frequenz der Kontraktionswellen. Die Autoren wiesen ebenfalls darauf hin, dass die Tiere oftmals verkrümmt waren, und führen diesen Zustand auf nicht komplett ausgeführte Kontraktionswellen zurück (Stacey *et al.*, 2010). Die von mir untersuchten *eaat1*-RNAi-Tiere waren ebenfalls sehr langsam. Zudem wurde eine Erhöhung der Anzahl ausgeführter *stop turns* beobachtet. Ein Verhalten, das auch *Tβh*-Mutanten (Saraswati *et al.*, 2004) sowie die von mir untersuchten *naz*-Mutanten aufweisen. Die Anzahl der *stop turns* konnte, wie bei *Tβh*- und *naz*-Mutanten, durch Fütterung von YH deutlich reduziert werden.

Dies legt die Vermutung nahe, dass die bei *eaat1*-RNAi-Tieren gemessene hohe Anzahl von *stop turns* nicht durch einen verminderten Glutamat-Transport, sondern durch einen zu hohen TA-Spiegel ausgelöst wird. Gesetzt den Fall, dass *Eaat1* tatsächlich sowohl für die Glutamat- als auch für die TA-Aufnahme in ALGs verantwortlich ist, würden die beobachteten Verhaltensänderungen der *eaat1*-RNAi-Tiere aus einer Kombination aus zu hohen Glutamat- und TA-Spiegeln resultieren. Dabei ist es durchaus wahrscheinlich, dass eine Erhöhung der Konzentration von Glutamat und TA sich an unterschiedlichen Orten im NS auswirkt. Ein Effekt der *eaat1*-RNAi an der neuromuskulären Synapse kann dabei ausgeschlossen werden, da im Gegensatz zur Imago in der Larve dort keine *Eaat1*-Expression nachweisbar ist (Rival *et al.*, 2006).

Die Wirkung von Glutamat im ZNS von *Drosophila* scheint nach bisherigem Kenntnisstand hauptsächlich inhibitorischer Natur zu sein (Liu & Wilson, 2013; Kohsaka *et al.*, 2014). Es konnte gezeigt werden, dass eine, in jedem Segment des VNS zu findende, Gruppe von ca. 20 *period*-positiven Interneuronen, die sog. *period-positive median segmental interneurons* (PMSI), eine zentrale Rolle in der Regulation der Kriechgeschwindigkeit von *Drosophila*-Larven einnehmen.

PMSIs bilden glutamaterge Synapsen mit den Motorneuronen des jeweiligen Segments und werden kurze Zeit nach diesen aktiviert. Die Aktivität der PMSIs wiederum führt zu einer Inhibition der Motorneurone und beendet die Kontraktion der, von den Motorneuronen innervierten, Muskeln in diesem Segment (Kohsaka *et al.*, 2014). Werden diese inhibitorischen Eingänge der PMSIs unterbunden, zeigen betroffene Tiere deutlich längere Kontraktionsphasen jedes Segments, was zu wesentlich langsameren peristaltischen Kontraktionswellen und damit deutlich kürzeren Pfaden führt (Kohsaka *et al.*, 2014). Daraus ergeben sich zwei mögliche Szenarien, um die bei *eaat1*-RNAi-Tieren beobachtete geringe Geschwindigkeit zu erklären: Einerseits könnte der, durch die *eaat1*-RNAi zumindest stark eingeschränkte, Abtransport von Glutamat aus dem synaptischen Spalt zwischen PMSI und Motorneuron zu einer Einschränkung der oben beschriebenen modulatorischen Wirkung der PMSIs auf die Motorneurone und somit zu langsamen peristaltischen Kontraktionswellen führen. Andererseits wäre es denkbar, dass die bei *eaat1*-RNAi-Tieren beobachtete langsame Fortbewegung aus einer Störung des Glutamat-Stoffwechsels resultiert. Man geht davon aus, dass Glutamat von ALGs über *Eaat1* aus dem synaptischen Spalt entfernt und in der Glia durch GS2 zu Glutamin abgebaut wird, welches dann an das Neuron zurück fließt. Hier wird das Glutamin wieder zu Glutamat umgewandelt und als Neurotransmitter eingesetzt (Freeman, 2015). Eine Unterbrechung dieses Kreislaufs könnte ebenso zu verlangsamer Lokomotion führen, da den PMSIs vermutlich nicht mehr genug Glutamat zur Verfügung stehen würde, um Motorneurone effektiv zu inhibieren. Die hier dargestellten Szenarien bieten schlüssige Erklärungsansätze für die reduzierte Geschwindigkeit von *eaat1*-RNAi-Tieren und -Mutanten, die in dieser Arbeit beobachtete Erhöhung der Richtungsänderungsrate sowie das vermehrte Auftreten von *stop turns* können sie jedoch nicht erklären.

Das Explorationsverhalten von *Drosophila*-Larven besteht aus den drei Komponenten geradlinige Fortbewegung, Pause und Richtungsänderung, wobei die Pausen immer vor einer Richtungsänderung auftreten. Die neuronalen Erregungsmuster, die zur Umsetzung dieser rhythmischen Bewegungen führen, werden von ZMGs erzeugt (Marder & Bucher, 2001). Es konnte bereits gezeigt werden, dass sich die, für das Explorationsverhalten der *Drosophila*-Larve verantwortlichen ZMGs im VNS befinden. Für die Umsetzung des Explorationsverhaltens werden lediglich die thorakalen und abdominalen Segmente des VNS benötigt. Die Blockade aller chemischen Synapsen der Hirnloben und des SOG sowie die Blockade der neuronalen Aktivität in diesen Bereichen des ZNS führten zu keiner Änderung des Explorationsverhaltens betroffener Tiere (Berni *et al.*, 2012). Für die Ausführung von Richtungsänderungen scheinen also vor allem neuronale Netzwerke in den thorakalen Segmenten des VNS von Bedeutung zu sein (Berni, 2015). Es existieren Berichte über die Beteiligung von dopaminergen, serotonergen sowie cholinergen Populationen von Interneuronen am Richtungsänderungsverhalten: So führte Expression von Tetanus-Toxin in dopaminergen und serotonergen Neuronen durch *Ddc*-GAL4 zu erhöhten

Richtungsänderungsraten (Suster *et al.*, 2003). Auch cholinerge Neurone scheinen für das Richtungsänderungsverhalten von Bedeutung zu sein. So konnten, durch Mutationen im Gen *scribbler (sbb)*, einem Co-Repressor (Haecker *et al.*, 2007), ausgelöste, erhöhte Richtungsänderungsraten, durch Expression von *sbb* in cholinergen Neuronen gerettet werden (Suster *et al.*, 2004). Ebenso scheinen sensorische Eingänge wichtig für das Richtungsänderungsverhalten zu sein. Es konnte gezeigt werden, dass sich die, für das larvale Explorationsverhalten verantwortlichen, ZMGs auch bei völliger Abwesenheit sensorischer Eingänge aus dem peripheren NS entwickeln und grundsätzlich funktionsfähig sind. Allerdings zeigten diese Tiere in der Folge ebenfalls erhöhte Richtungsänderungsraten (Suster & Bate, 2002). Alle diese Beobachtungen geben noch keinen Aufschluss über den genauen Aufbau und die Funktionsweise der ZMGs, die für das larvale Explorationsverhalten verantwortlich sind. Was jedoch bereits des Öfteren berichtet wurde, ist eine antagonistische Modulation der ZMGs durch die biogenen Amine TA und OA (Saraswati *et al.*, 2004; Fox *et al.*, 2006; Selcho *et al.*, 2012). Dabei scheint vor allem die Balance zwischen den beiden Amininen von Bedeutung für das Verhalten zu sein. Eine Verschiebung der OA-TA-Balance hin zu mehr TA führt dabei zu kürzeren Pfaden und erhöhten Richtungsänderungsraten (Saraswati *et al.*, 2004; Selcho *et al.*, 2012). Dieser Effekt konnte auch in dieser Arbeit bestätigt werden. Fütterung von TA an WT-Tiere löste eine signifikante Erhöhung der Richtungsänderungsraten aus. Die Tatsache, dass die hier untersuchten *eaat1*-RNAi-Tiere nach Fütterung von YH signifikant weniger *stop turns* zeigten, lässt die Hypothese zu, dass die erhöhten Richtungsänderungsraten auch hier durch eine Verschiebung des OA-TA-Gleichgewichts verursacht werden. Der beobachtete Verhaltensphänotyp der *eaat1*-RNAi-Tiere würde demnach durch ein Zusammenspiel aus gestörtem Glutamat- und gestörtem TA-Transport verursacht. Der gestörte Glutamat-Transport führt dabei zu der beobachteten niedrigen Bewegungsgeschwindigkeit, während der gestörte TA-Transport für die erhöhte Anzahl von *stop turns* verantwortlich wäre. Dafür spricht auch, dass die Tiere nach Fütterung von YH zwar weniger *stop turns* ausführten, aber keineswegs schneller waren. Leider konnte in dieser Arbeit kein direkter Nachweis für einen TA-Transport durch Eaat1 erbracht werden. Der hier gewählte experimentelle Ansatz eines immunhistochemischen Nachweises des TA-Transports in S2R+-Zellen erwies sich als untauglich, da alle Zellen, auch die der Negativkontrollen, ein TA-Signal zeigten. Um die Hypothese, dass Eaat1 neben Glutamat auch TA in die Zelle transportiert, zu bestätigen, wären noch weitere Versuche notwendig.

4.5 Argumente für einen Tyramin-Abbau unter Beteiligung einer Monoaminoxidase

Ein weiterer Schritt im TA-Stoffwechsel, ist der enzymatische Abbau und die damit verbundene Inaktivierung des TA. Die in dieser Arbeit entwickelte Hypothese zum TA-Abbau in ALGs, geht von einem TA-Abbau unter Beteiligung einer MAO aus. Diese Annahme stützt sich auf die Feststellung,

dass durch Fütterung des MAO-Inhibitors TC erhöhte Richtungsänderungsraten ausgelöst werden können. Der Effekt von TC auf das Verhalten WT-Larven war bei einer TC-Konzentration von 0,5 mg/ml am stärksten. Hier zeigten die Tiere ähnlich hohe Richtungsänderungsraten wie die Tiere aus *naz*-RNAi Versuchen. Interessanterweise zeigte sich bei weiterer Erhöhung der Pharmakon-Konzentration keine klassische Sättigungskurve. Die Erhöhung der TC-Konzentration auf 1 mg/ml und 2 mg/ml führte wieder zu niedrigeren Richtungsänderungsraten. Über die Gründe für diesen atypischen Kurvenverlauf kann hier nur spekuliert werden. Eine Möglichkeit könnte sein, dass mit steigender TC-Konzentration auch der Abbau von OA gehemmt wird. Dies würde wiederum zu einer Normalisierung der Konzentrationsverhältnisse von OA und TA und damit zu wildtypischen Richtungsänderungsraten führen.

Eine weitere Beobachtung, die für einen TA-Abbau unter Beteiligung einer MAO spricht ist, dass Tiere in denen das als Aminoxidase klassifizierte Gen *CG7737* über gliaspezifische RNAi ausgeschaltet wurde, ebenfalls einen Richtungsänderungs-Phänotyp zeigen (Benjamin Altenhein, unpublizierte Daten).

Bisherige Untersuchungen zum Abbau von biogenen Aminen im NS von *Drosophila* ergaben, dass TA hauptsächlich durch N-Acetyltransferasen abgebaut wird. Neben der N-Acetyltransferase-Aktivität wurde auch MAO-Aktivität festgestellt. Diese war aber deutlich geringer als die N-Acetyltransferase-Aktivität (Dewhurst *et al.*, 1972). Auch in *Aedes togoi* (Moskito) und in *Ostrinia nubilalis* (Maiszünsler) wurde N-Acetylierung als primärer Abbauweg für TA identifiziert (Shampengtong *et al.*, 1987; Evans *et al.*, 1980). Dennoch gibt es auch Hinweise, dass der Monoamin-Abbau unter Beteiligung einer MAO eine Rolle für das Verhalten von *Drosophila* spielt. Eine Studie über die Wirkung verschiedener biogener Amine auf das Verhalten dekapitierter Tiere konnte zeigen, dass die Wirkung dieser Substanzen durch zusätzliche Applikation des MAO-Inhibitors Hydrazalin verstärkt wurde (Yellman *et al.*, 1997). Diese Beobachtung sowie das von mir durchgeführte Experiment lassen zumindest den Schluss zu, dass MAOs im Neurotransmitter-Metabolismus von *Drosophila* durchaus von Relevanz zu sein scheinen.

4.6 Die molekulare Funktion von Nazgul bleibt unklar

Die genaue Position von Naz im TA-Abbau sowie das Substrat des Enzyms konnten in dieser Arbeit nicht genau bestimmt werden. Auf Basis der Proteinsequenz kann lediglich eine grobe Einordnung vorgenommen werden. Die Proteinsequenz enthält Motive, die eine Klassifizierung als *short-chain dehydrogenase/reductase* (SDR) erlauben. Die Zuordnung zu einer spezifischen chemischen Reaktion ist durch diese Klassifizierung nicht möglich. Die SDR-Superfamilie ist mit 114 Mitgliedern in *Drosophila* und bisher über 21.000 charakterisierten Enzymen recht groß (Kavanagh *et al.*, 2008). Nimmt man die Proteine hinzu, die lediglich über bioinformatische Methoden kategorisiert wurden, wächst die Anzahl der SDRs noch einmal beträchtlich. Aktuell werden in der Proteindatenbank InterPro (Mitchell *et al.*, 2015) 354.215 Proteine dieser

Superfamilie gelistet. Naz besitzt, wie alle SDRs, eine als „Rossmann fold“ bezeichnete NAD(P)-Bindedomäne und wird aufgrund dieser den SDRs zugeordnet. Die Mitglieder der SDR-Superfamilie decken ein sehr breites Spektrum chemischer Reaktionen ab. Neben Oxidoreduktasen kommen hier auch Epimerasen, Isomerasen, Dehalogenasen sowie einige weitere Enzymklassen vor (Kavanagh *et al.*, 2008). Die molekulare Funktion von Naz ist somit über bioinformatische Methoden nicht eindeutig zu bestimmen.

Die in dieser Arbeit durchgeführten Experimente führen zu der Hypothese, dass TA durch Eaat1 in die Zelle transportiert wird. Der erste Schritt des enzymatischen Abbaus ist eine oxidative Desaminierung. Dabei wird TA von einer MAO zu p-Hydroxyphenol-Acetaldehyd (pHPAA) umgesetzt. Naz könnte für die nächste oder eine andere Reaktion im weiteren Abbau verantwortlich sein. Hier wäre eine weitere Oxidation des pHPAA zu p-Hydroxyphenol-Essigsäure denkbar. Ebenso könnte die, durch die oxidative Desaminierung gebildete Aldehydgruppe reduziert werden. Das Produkt dieser Reaktion wäre p-Hydroxyphenol-Ethanol. Beide Reaktionen würden ins Spektrum der von SDR katalysierten Reaktionen fallen. Um Klarheit über die tatsächliche molekulare Funktion von Naz zu erhalten sind hier noch weitere Versuche nötig.

5 Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurde der Versuch unternommen, die Funktion der Dehydrogenase/Reduktase Nazgul (CG31235) im Nervensystem von *Drosophila* zu charakterisieren. Expressionsanalysen zeigten, dass Nazgul (Naz) ab dem embryonalen Stadium 14 exprimiert wird. In Larven des dritten Larvenstadiums ist die Expression in sechs Astrozyten-ähnlichen Glia pro abdominalem Hemisegment sowie in einer nicht glialen Zelle zu finden. Untersuchungen des larvalen Explorationsverhaltens zeigten sowohl bei *naz*-Mutanten als auch bei gliaspezifisch getriebener *naz*-RNAi eine signifikante Erhöhung der Richtungsänderungsrate. Ein ähnlicher Phänotyp war in der Literatur in Tieren mit gestörter Octopamin-Synthese und einem dadurch bedingten erhöhten Level an Tyramin im Nervensystem beschrieben worden. In Anlehnung an diese Daten konnte ich zeigen, dass durch Applikation des Tyramin-Rezeptor-Antagonisten Yohimbin der Phänotyp in *naz*-Mutanten gerettet und ein gegenteiliger Effekt durch Fütterung von Tyramin an Wildtypen induziert werden konnte. Durch immunhistochemische Färbungen konnte ich zudem zeigen, dass Naz exprimierende Gliazellen Tyramin-Immunoreaktivität aufweisen. Diese Ergebnisse lassen die Schlussfolgerung zu, dass Naz am Tyramin-Abbau in Gliazellen beteiligt ist. Damit liefert die Arbeit erste zellspezifische Erkenntnisse für den Tyramin-Abbau im Nervensystem von *Drosophila*.

Der bei *naz*-Mutanten vorgefundene Phänotyp konnte ebenfalls durch Fütterung des irreversiblen Monoamin-Oxidase Inhibitors Tranylcypromin reproduziert werden. Dies legt den Schluss nahe, dass der TA-Abbau im Nervensystem von *Drosophila* unter Beteiligung einer MAO abläuft.

Bisher konnten keine an der Tyramin-Aufnahme beteiligten Transporter in *Drosophila* identifiziert werden. Durch zellspezifische RNAi-Experimente des bisher lediglich als Glutamat-Transporter beschriebenen Transmembran-Transporters Eaat1 konnte ein mit dem bei *naz*-Mutanten beobachteten Verhalten vergleichbarer Phänotyp induziert werden. Dieser war ebenfalls durch Applikation von Yohimbin reversibel. Ein direkter Nachweis für einen durch Eaat1 geleisteten Tyramin-Transport in Gliazellen konnte jedoch nicht erbracht werden. Dennoch liefern diese Ergebnisse zusammen mit immunhistochemischen Färbungen gegen Eaat1 und Naz weitere Anhaltspunkte dafür, dass Eaat1 für die Tyramin-Aufnahme in Gliazellen verantwortlich sein könnte.

Die vorliegende Arbeit konnte somit neben einer ersten funktionellen Verortung der Dehydrogenase/Reduktase Naz, neue Erkenntnisse zur Funktion Astrozyten-ähnlichen Gliazellen im Nervensystem von *Drosophila* liefern. Die gewonnenen Daten bilden die Grundlage für die Hypothese, dass Tyramin im Nervensystem von *Drosophila* durch diese Zellen erst über Eaat1 aufgenommen und dann unter Beteiligung einer MAO und Naz enzymatisch deaktiviert wird.

6 Literaturverzeichnis

- Adamo, S. A., Linn, C. E., Hoy, R. R. (1995). **The role of neurohormonal octopamine during “fight or flight” behavior in the field cricket *Gryllus bimaculatus*.** *The Journal of Experimental Biology* 198: 1691-1700.
- Adams, M. D., Celniker, S. E., Holt, R. A., Evans, C. A., Gocayne, J. D., Amanatides, P. G., Scherer, S. E., Li, P. W., Hoskins, R. A., Galle, R. F., George, R. A., Lewis, S. E., Richards, S., Ashburner, M., Henderson, S. N., Sutton, G. G., Wortman, J. R., Yandell, M. D., Zhang, Q., Chen, L. X., Brandon, R. C., Rogers, Y. H., Blazej, R. G., Champe, M., Pfeiffer, B. D., Wan, K. H., Doyle, C., Baxter, E. G., Helt, G., Nelson, C. R., Gabor, G. L., Abril, J. F., Agbayani, A., An, H. J., Andrews-Pfannkoch, C., Baldwin, D., Ballew, R. M., Basu, A., Baxendale, J., Bayraktaroglu, L., Beasley, E. M., Beeson, K. Y., Benos, P. V., Berman, B. P., Bhandari, D., Bolshakov, S., Borkova, D., Botchan, M. R., Bouck, J., Brokstein, P., Brottier, P., Burtis, K. C., Busam, D. A., Butler, H., Cadieu, E., Center, A., Chandra, I., Cherry, J. M., Cawley, S., Dahlke, C., Davenport, L. B., Davies, P., de Pablos, B., Delcher, A., Deng, Z., Mays, A. D., Dew, I., Dietz, S. M., Dodson, K., Doup, L. E., Downes, M., Dugan-Rocha, S., Dunkov, B. C., Dunn, P., Durbin, K. J., Evangelista, C. C., Ferraz, C., Ferriera, S., Fleischmann, W., Fosler, C., Gabrielian, A. E., Garg, N. S., Gelbart, W. M., Glasser, K., Glodek, A., Gong, F., Gorrell, J. H., Gu, Z., Guan, P., Harris, M., Harris, N. L., Harvey, D., Heiman, T. J., Hernandez, J. R., Houck, J., Hostin, D., Houston, K. A., Howland, T. J., Wei, M. H., Ibegwam, C., Jalali, M., Kalush, F., Karpen, G. H., Ke, Z., Kennison, J. A., Ketchum, K. A., Kimmel, B. E., Kodira, C. D., Kraft, C., Kravitz, S., Kulp, D., Lai, Z., Lasko, P., Lei, Y., Levitsky, A. A., Li, J., Li, Z., Liang, Y., Lin, X., Liu, X., Mattei, B., McIntosh, T. C., McLeod, M. P., McPherson, D., Merkulov, G., Milshina, N. V., Mobarry, C., Morris, J., Moshrefi, A., Mount, S. M., Moy, M., Murphy, B., Murphy, L., Muzny, D. M., Nelson, D. L., Nelson, D. R., Nelson, K. A., Nixon, K., Nusskern, D. R., Pacleb, J. M., Palazzolo, M., Pittman, G. S., Pan, S., Pollard, J., Puri, V., Reese, M. G., Reinert, K., Remington, K., Saunders, R. D., Scheeler, F., Shen, H., Shue, B. C., Siden-Kiamos, I., Simpson, M., Skupski, M. P., Smith, T., Spier, E., Spradling, A. C., Stapleton, M., Strong, R., Sun, E., Svirskas, R., Tector, C., Turner, R. Venter, E., Wang, A. H., Wang, X., Wang, Z. Y., Wassarman, D. A., Weinstock, G. M., Weissenbach, J., Williams, S. M., Woodage, T., Worley, K. C., Wu, D., Yang, S., Yao, Q. A., Ye, J., Yeh, R. F., Zaveri, J. S., Zhan, M., Zhang, G., Zhao, Q., Zheng, L., Zheng, X. H., Zhong, F. N., Zhong, W., Zhou, X., Zhu, S., Zhu, X., Smith, H. O., Gibbs, R. A., Myers, E. W., Rubin, G. M., Venter, J. C. (2000) **The Genome Sequence of *Drosophila melanogaster*.** *Science* 287:2185-2195.
- Altenhein, B., Becker, A., Busold, C., Beckmann, B., Hoheisel, J. D., Technau, G. M. (2006). **Expression profiling of glial genes during *Drosophila* embryogenesis.** *Developmental Biology* 296(2): 545-560.
- Auld, V. J., Fetter, R. D., Broadie, K. und Goodman, C. S. (1995). **Glialactin, a novel transmembrane protein on peripheral glia, is required to form the blood-nerve barrier in *Drosophila*.** *Cell* 81(5): 757-767.
- Awasaki, T., Lai, S., Ito, K., Lee, T. (2008). **Organization and postembryonic development of glial cells in the adult central brain of *Drosophila*.** *The Journal of Neuroscience* 28(51): 13742-13753.
- Badenhorst, P., (2001). **Tramtrack controls glial number and identity in the *Drosophila* embryonic CNS.** *Development* 128: 4093-4101.

- Baines, R. A., Bate, M. (1998). **Electrophysiological development of central neurons in the *Drosophila* embryo.** *The Journal of Neuroscience* 18: 4673-4683.
- Beckervordersandforth, R. M., Rickert, C., Altenhein, B., Technau, G. M. (2008). **Subtypes of glial cells in the *Drosophila* embryonic ventral nerve cord as related to lineage and gene expression.** *Mechanisms of Development* 125 (5-6): 542-557.
- Benz, G. (1956). **Der Trockenheitssinn bei Larven von *Drosophila melanogaster*.** *Experientia* 12: 297-298.
- Berni, J., Pulver, S. R., Griffith, L. C., Bate, M. (2012). **Autonomous circuitry for substrate exploration in freely moving *Drosophila* larvae.** *Current Biology* 22: 1861-1870.
- Berni, J. (2015). **Genetic dissection of a regionally differentiated network for exploratory behavior in *Drosophila* larvae.** *Current Biology* 25: 1319-1326.
- Besson, M.-T., Soustelle, L., Birman, S. (1999). **Identification and structural characterization of two genes encoding glutamate transporter homologues differently expressed in the nervous system of *Drosophila melanogaster*.** *FEBS Letters* 443: 97-104.
- Besson, M.-T., Soustelle, L., Birman, S. (2000). **Selective high-affinity transport of aspartate by a *Drosophila* homologue of the excitatory amino-acid transporters.** *Current Biology* 2000, 10:207-210.
- Birkholz, O., Rickert, C., Berger, C., Urbach, R., Technau, G. M. (2013). ***Drosophila* tail region and role of *doublesex* in the survival of sex-specific precursors.** *Development* 140(8): 1830-1842.
- Bossing, T., Technau, G. M. (1994). **The fate of the CNS midline progenitors in *Drosophila* as revealed by a new method for single cell labeling.** *Development* 120: 1895-1906.
- Bossing, T., Udolph, G., Doe, C. Q., Technau, G. M. (1996). **The embryonic central nervous system lineages of *Drosophila melanogaster*: I. Neuroblast lineages derived from the ventral half of the neuroectoderm.** *Developmental Biology* 179: 41-64.
- Brand, A. H., Perrimon, N. (1993). **Targeted gene expression as a means of altering cell fates and generating dominant phenotypes.** *Development* 118: 401-415.
- Brembs, B., Christiansen, F., Pflüger, H. F., Duch, C. (2007). **Flight initiation and maintenance deficits in flies with genetically altered biogenic amine levels.** *The Journal of Neuroscience* 27(41): 11122-11131.
- Busch, S., Selcho, M., Ito, K., Tanimoto, H. (2009). **A map of octopaminergic neurons in the *Drosophila* brain.** *The Journal of Comparative Neurology* 513: 643-667.
- Caldwell, J. C., Miller, M. M., Wing, S., Soll, D. R., Eberl, D. F. (2003). **Dynamic analysis of larval locomotion in *Drosophila* chordotonal organ mutants.** *PNAS* 100(26): 16053-16058.
- Cazzamali, G., Klaerke, D. A., Grimmelikhuijzen, C. J. P. (2005). **A new family of insect tyramine receptors.** *Biochemical and Biophysical Research Communications* 338(2): 1189-1196.

- Cong, L., Ran, F. A., Cox, D., Lin, S., Barretto, R., Habib, N., Hsu, P. D., Wu, X., Jiang, W., Marraffini, L. A., Zhang, F. (2013). **Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems.** *Science* 339(6121): 819-823
- Crisp, S., Evers, J. F., Fiala, A., Bate, M. (2008). **The development of motor coordination in *Drosophila* embryos.** *Development* 135: 3707-3717.
- Dadak, A. (2013). **Ein RNAi-Screen für Komponenten des Tyramin Metabolismus in *Drosophila melanogaster*.** Bachelorarbeit am Institut für Genetik der Johannes Gutenberg-Universität Mainz.
- Denno, M. E., Privman, E., Venton, B. J. (2015). **Analysis of neurotransmitter tissue content of *Drosophila melanogaster* in different life stages.** *ASC Chemical Neuroscience* 6: 117-123
- Dewhurst, S. A., Croker, S. G., Ikeda, K., McCaman, R. E. (1972). **Metabolism of biogenic amines in *Drosophila* nervous tissue.** *Comp. Biochem. Physiol.* 43B: 975-981.
- Dixit, R., VijayRaghavan, K., Bate, M. (2008). **Hox genes and the regulation of movement in *Drosophila*.** *Developmental Neurobiology* 68: 309-316.
- Doe, C. Q., Technau, G. M. (1993). **Identification and cell lineage of individual neural precursors in the *Drosophila* CNS.** *Trends in Neurosciences* 16(12): 510-514.
- Doherty, J., Logan, M. A., Tasdemir, Ö. E., Freeman, M. R. (2009). **Ensheathing glia function as phagocytes in the adult *Drosophila* brain.** *The Journal of Neuroscience* 29(15): 4768-4781.
- Donnelly, J. L., Clark, C. M., Leifer, A. M., Pirri, J. K., Haburcak, M., Francis, M. M., Samuel, A. D. T., Alkema, M. J. (2013). **Monoaminergic orchestration of motor programs in a complex *C. elegans* behavior.** *PLoS Biology* 11(4): e1001529. doi:10.1371/journal.pbio.101529
- Donly, B. C., Caveny, S. (2005). **A transporter for phenolamine uptake in the arthropod CNS.** *Archives of Insect Biochemistry and Physiology* 59: 172-183.
- Egger, B., Leemans, R., Loop, T., Kammermeier, L., Fan, Y., Radimerski, T., Strahm, M. C., Certa, U., Reichert, H. (2002). **Gliogenesis in *Drosophila*: genome-wide analysis of downstream genes of glial cells missing in the embryonic nervous system.** *Development* 129: 3295-3309.
- Evans, P. H., Soderlund D. M., Aldrich, J. R. (1980). **In vitro N-acetylation of biogenic amines by tissues of the european corn borer, *Ostrinia nubilalis* Hübner.** *Insect Biochem* 10: 375-380.
- Fang, H., Vickrey, T. L., Venton, B. J. (2011). **Analysis of biogenic amines in a single *Drosophila* larva brain by capillary electrophoresis with fast-scan cyclic voltammetry detection.** *Analytic Chemistry* 83: 2258-2264
- Fox, L. E., Soll, D. R., Wu, C.-F. (2006). **Coordination and modulation of locomotion pattern generators in *Drosophila* larvae: Effects of altered biogenic amine levels by Tyramine β hydroxylase mutation.** *J Neurosci.* 26(5): 1486-1498.
- Freeman, M. R., Delrow, J., Kim, J., Johnson, E., Doe, C. Q. (2003). **Unwrapping glial biology: Gcm target genes regulating glial development, diversification, and function.** *Neuron* 38:567-580.

- Freeman, M. R. (2015). ***Drosophila* central nervous system glia**. *Cold Spring Harb Perspect Biol* doi: 10.1101/cshperspect.a020552.
- Giesen, K., Hummel, T., Stollewerk, A., Harrison, S., Travers, A., Klämbt, C. (1997). **Glial development in the *Drosophila* CNS requires concomitant activation of glial and repression of neuronal differentiation genes**. *Development* 124: 2307-2311.
- Granderath, S., Stollewerk, A., Greig, S., Goodman, C. S., O’Kane, C. J., Klämbt, C. (1999). ***loco* encodes an RGS protein required for *Drosophila* glial differentiation**. *Development* 126: 1781-1791.
- Granderath, S., Bunse, I., Klämbt, C. (2000). ***gcm* and *pointed* synergistically control glial transcription of the *Drosophila* gene *loco***. *Mechanisms of Development* 91 (1-2): 197-208.
- Gratz, S. J., Cummings, A. M., Nguyen, J. N., Hamm, D. C., Donohue, L. K., Harrison, M. M., Wildonger, J., O’Connor-Giles, K. M. (2013). **Genome engineering of *Drosophila* with the CRISPR RNA-guided Cas9 nuclease**. *Genetics* 194: 1029-1035
- Green, C. H., Burnet, B., Conolly, K. J. (1983). **Organization and patterns of inter- and intraspecific variation in the behavior of *Drosophila* larvae**. *Animal Behavior* 31: 282-291.
- Green, E. W., Fedele, G., Giorgini, F., Kyriacou, C. P. (2014). **A *Drosophila* RNAi collection is subject to dominant phenotypic effects**. *Nature Methods* 11:222-223.
- Haecker, A., Qi, D., Lilja, T., Moussian, B., Andrioli, L. P., Luschnig, S., Mannervik, M. (2007). ***Drosophila* *brakeless* interacts with atropin and is required for tailless-mediated transcriptional repression in early embryos**. *PloS Biol* 5(6): e145. Doi:101371/journal.pbio.0050145.
- Halter, D. A., Urban, J., Rickert, C., Ner, S. S., Ito, K., Travers, A. A., Technau, G. M. (1995). **The homeobox gene *repo* is required for the differentiation and maintenance of glia function in the embryonic nervous system of *Drosophila melanogaster***. *Development* 121: 317-332.
- von Hilchen, C. M., Hein, I., Technau, G. M., Altenhein, B. (2010). **Netrins guide migration of distinct glial cells in the *Drosophila* embryo**. *Development* 137: 1251-1262.
- Hosoya, T., Takizawa, K., Nitta, K., Hotta, Y. (1995). **Glial cells missing: A binary switch between neuronal and glial determination in drosophila**. *Cell* 82(6): 1025-1036
- Hooper, J. E. (1986). **Homeotic gene function in the muscles of *Drosophila* larvae**. *The EMBO Journal* 5(9): 2321-2329.
- Hughes, C. L., Thomas, J. B. (2007). **A sensory feedback circuit coordinates muscle activity in *Drosophila***. *Molecular and Cellular Neuroscience* 35(2): 383-396.
- Hwang, R. Y., Zhong, L., Xu, Y., Johnson, T., Zhang, F., Deisseroth, K., Tracey, W. D. (2007). **Nociceptive neurons protect *Drosophila* larvae from parasitoid wasps**. *Current Biology* 17: 2105-2116.
- Ito, K., Urban, J., Technau, G. M. (1995). **Distribution, classification, and development of *Drosophila* glial cells in the late embryonic and early larval ventral nerve cord**. *Roux’s Arch Dev Biol* 204: 284-307.

- Jones, B. W., Fetter, R. D., Tear, G., Goodman, C. S. (1995). **Glia cells missing: A genetic switch that controls glial versus neuronal fate.** *Cell* 82: 1013-1023.
- Kato, K., Forero, M. G., Fenton, J. C., Hidalgo, A. (2011). **The glial regenerative response to central nervous system injury is enabled by pros-notch and pros-NFκB feedback.** *PLoS Biol* 9(8): e1001133. Doi:10.1371/journal.pbio.1001133.
- Kavanagh, K. L., Jörnvall, H., Persson, B., Oppermann, U. (2008). **The SDR superfamily: functional and structural diversity within a family of metabolic and regulatory enzymes.** *Cell. Mol. Life Sci.* 65: 3895-3906.
- Klaes, A., Menne, T., Stollewerk, A., Scholz, H., Klämbt, C. (1994). **The Ets transcription factors encoded by the *Drosophila* Gene *pointed* direct glial cell differentiation in the embryonic CNS.** *Cell* 78(1): 149-160.
- Kohsaka, H., Takasu, E., Morimoto, T., Nose, A. (2014). **A group of segmental premotor interneurons regulates the speed of axial locomotion in *Drosophila* larvae.** *Current Biology* 24: 2632-2642.
- Kutsukake, M., Komatsu, A., Yamamoto, D., Ishiwa-Chigusa, S. (2000). **A tyramine receptor gene mutation causes a defective olfactory behavior in *Drosophila melanogaster*.** *Gene* 245: 31-42.
- Landgraf, M., Bossing, T., Technau, G. M., Bate, M. (1997). **The origin, location, and projections of the embryonic abdominal motorneurons of *Drosophila*.** *The Journal of Neuroscience* 17(24): 9642-9655.
- Landgraf, M., Sánchez-Soriano, N., Technau, G. M., Urban, J., Prokop, A. (2003). **Charting the *Drosophila* neuropile: a strategy for the standardized characterization of genetically amenable neurites.** *Developmental Biology* 260: 207-225.
- Lanzendörfer, S. (2012). **Charakterisierung verschiedener Mutationen im Gen *nazgul* von *Drosophila melanogaster*.** Bachelorarbeit am Institut für Genetik der Johannes Gutenberg-Universität Mainz.
- Liu, W. W., Wilson, R. I. (2013). **Glutamate is an inhibitory neurotransmitter in the *Drosophila* olfactory system.** *PNAS* 110(25): 10294-10299.
- Malutan, T., McLean, H., Caveney, S., Donly, C. (2002). **A high-affinity octopamine transporter cloned from the central nervous system of cabbage looper *Trichoplusia ni*.** *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 32: 343-357.
- Marder, E., Bucher, D. (2001). **Central pattern generators and the control of rhythmic movements.** *Current Biology* 11: R986-R996.
- Mauch, D. H., Nägler, K., Schumacher, S., Göritz, C., Müller, E. C., Otto, A., Pfrieder, F. W. (2001). **CNS synaptogenesis promoted by glial-derived cholesterol.** *Science* 294: 1354-1357.

- Mitchell, A., Chang, H.-Y., Daugherty, L., Fraser, M., Hunter, S., Lopez, R., McAnulla, C., McMenamin, C., Nuka, G., Pesseat, S., Sangrador-Vegas, A., Scheremetjew, M., Rato, C., Yong, S.-Y., Bateman, A., Punta, M., Attwood, T. K., Sigrist, C. J. A., Redaschi, N., Rivoire, C., Xenarios, I., Kahn, D., Guyot, D., Bork, P., Letunic, I., Gough, J., Oates, M., Haft, D., Huang, H., Natale, D. A., Wu, C. H., Orengo, C., Sillitoe, I., Mi, H., Thomas P. D., Finn, R. D. (2015). **The InterPro protein families database: the classification resource after 15 years.** *Nucleic Acids Research*, Jan 2015; doi: 10.1093/nar/gku1243.
- Monastirioti, M., Gorczyca, M., Rapus, J., Eckert, M., White, K., Budnik, V. (1995). **Octopamine immunoreactivity in the fruit fly *Drosophila melanogaster*.** *The Journal of comparative Neurology* 356: 275-287.
- Monastirioti, M., Linn jr., C. E., White, K. (1996). **Characterization of *Drosophila* tyramine β -hydroxylase gene and isolation of mutant flies lacking Octopamine.** *The Journal of Neuroscience* 16(12):3900-3911.
- Nagaya, Y., Kutsukake, M., Chigusa, S. I., Komatsu, A. (2002). **A trace amine, tyramine, functions as a neuromodulator in *Drosophila melanogaster*.** *Neuroscience Letters* 329: 324-328.
- Nassif, C., Noveen, A., Hartenstein, V. (1998). **Embryonic development of the *Drosophila* brain. I. Pattern of pioneer tracts.** *Journal of Comparative Neurology* 402(1): 10-31.
- Omoto, J. J., Yogi, P., Hartenstein, V. (2015). **Origin and development of neuropile glia of the *Drosophila* larval and adult brain: Two distinct glial populations derived from separate progenitors.** *Developmental Biology* 404: 2-20.
- Ormerod, K. G., Hadden, J. K., Deady, L. D., Mercier A. J., Krans, J. L. (2013). **Action of octopamine and tyramine on muscles of *Drosophila melanogaster* larvae.** *Journal of Neurophysiology* 110: 1984-1996.
- Peco, E., Davla, S., Camp, D., Stacey, S., Landgraf, M., van Meyel, D. (2016). ***Drosophila* astrocytes cover specific territories of CNS neuropil and are instructed to differentiate by Prospero, a key effector of Notch.** *Development* 2016: doi: 10.1242/dev.133165.
- Peifer, M., Bender, W. (1986). **The anterobithorax and bithorax mutations of the bithorax complex.** *The EMBO Journal* 5(9): 2293-2303.
- Pereanu, W., Spindler, S., Im, E., Buu, N., Hartenstein, V. (2007). **The emergence of patterned movement during late embryogenesis of *Drosophila*.** *Dev Neurobiol.* 67(12): 1669-1685.
- Richardt, A., Kemme, T., Wagner, S., Schwarzer, D., Marahiel, M. A., Hovemann, B. T. (2003). **Ebony, a novel nonribosomal peptide synthetase for β -alanine conjugation with biogenic amines in *Drosophila*.** *The Journal of Biological Chemistry* 278(42):41160-41166.
- Rival, T., Soustelle, L., Strambi, C., Besson, M.-T., Iché, M., Birman, S. (2004). **Decreasing glutamate buffering capacity triggers oxidative stress and neuropil degeneration in the *Drosophila* brain.** *Current Biology* 2004, 14: 599-605.
- Rival, T., Soustelle, L., Cattaert, D., Strambi, C., Iché, M., Birman, S. (2006). **Physiological requirement for the glutamate transporter dEAAT1 at the adult *Drosophila* neuromuscular junction.** *J Neurobiol* 66: 1061-1074.

- Rohrscheib, C. E., Bondy, E., Josh, P., Riegler, M., Eyles, D., van Swinderen, B., Weible, M. W., Brownlie, J. C. (2015). **Wolbachia influences the production of octopamine and affects *Drosophila* male aggression.** *Applied and Environmental Microbiology* 81: 4573-4580.
- Roseman, R. R., Johnson, E. A., Rodesch, C. K., Bjerke, M., Nagoshi, R. N., Geyer, P. K. (1995). **A P element containing suppressor of hairy-wing binding regions has novel properties for mutagenesis in *Drosophila melanogaster*.** *Genetics* 141(3): 1061-1074.
- Saraswati, S., Fox, L. E., Soll, D. R., Wu, C.-F. (2004). **Tyramine and octopamine have opposite effects on the locomotion *Drosophila* larvae.** *J Neurobiol* 58: 425-441.
- Saudou, F., Amlaiky, N., Plassat, P.-L., Borrelli, E., Hen, R. (1990). **Cloning and characterization of a *Drosophila* tyramine receptor.** *The EMBO Journal* 9(11): 3611-3617.
- Schmid, A., Chiba, A., Doe, C. Q. (1999). **Clonal analysis of *Drosophila* embryonic neuroblasts: neural cell types, axon projections and muscle targets.** *Development* 126: 4653-4689.
- Schmidt, H., Rickert, C., Bossing, T., Vef, O., Urban, J., Technau, G. M. (1997). **The embryonic central nervous system lineages of *Drosophila melanogaster* II. Neuroblast lineages derived from the dorsal part of the neuroectoderm.** *Developmental Biology* 189(2): 186-204.
- Schneider, I. (1972). **Cell lines derived from late embryonic stages of *Drosophila melanogaster*.** *Development* 27: 353-365.
- Selcho, M., Pauls, D., el Jundi, B., Stocker, R. F., Thum, A. S. (2012). **The role of octopamine and tyramine in *Drosophila* larval locomotion.** *The Journal of Comparative Neurology* 520: 3764-3785.
- Selcho, M., Pauls, D., Huser, A., Stocker, R. F., Thum, A. S. (2014). **Characterization of the octopaminergic and tyraminergeric neurons in the central brain of *Drosophila* larvae.** *The Journal of Comparative Neurology* 522: 3485-3500.
- Shampengtong, L., Wong, K. P., Ho, B. C. (1987). **N-Acetylation of dopamin and tyramine by mosquito pupae (*Aedes togoi*).** *Insect Biochem* 17(1): 111-116.
- Song, W., Onishi, M., Yeh Jan, L., Nung Jan, Y. (2007). **Peripheral multidendritic sensory neurons are necessary for rhythmic locomotion behavior in *Drosophila* larvae.** *PNAS* 104(12): 5199-5204.
- Stacey, S. M., Muraro, N. I., Peco, E., Labbé, A., Thomas, G. B., Baines, R. A., van Meyel, D. J. (2010). ***Drosophila* glial glutamate transporter Ea1 is regulated by fringe-mediated notch signaling and is essential for larval locomotion.** *The Journal of Neuroscience* 30(43): 14446-14457.
- Stork, T., Sheehan, A., Tasdemir-Yilmaz, O. E., Freeman, M. R. (2014). **Neuron-glia interactions through the Heartless FGF receptor signaling mediate morphogenesis of *Drosophila* astrocytes.** *Neuron* 83: 388-403.
- Suster, M. L., Bate, M. (2002). **Embryonic assembly of a central pattern generator without sensory input.** *Nature* 416: 174-178.

- Suster, M. L., Martin, J.-R., Sung, C., Robinow, S. (2003). **Targeted expression of tetanus toxin reveals sets of neurons involved in larval locomotion in *Drosophila*.** *J Neurobiol* 55: 233-246.
- Suster, M. L., Karunanithi, S., Atwood, H. L., Sokolowski, M. B. (2004). **Turning behavior in *Drosophila* larvae: a role for the small scribbler transcript.** *Genes, Brain and Behavior* 3: 273-286.
- Vincent, S., Vonesch, J. L., Giangrande, A. (1996). **Glide directs glial fate commitment and cell fate between neurones and glia.** *Development* 122: 131-139
- Wang, J. W., Sylwester, A. W., Reed, D., Wu, D. A., Soll, D. R., Wu, C. F. (1997). **Morphometric description of the wandering behavior in *Drosophila* larvae: aberrant locomotion in Na⁺ and K⁺ channel mutants revealed by computer-assisted motion analysis.** *Journal of Neurogenetics* 11(3-4): 231-254.
- Wang, J. W., Soll, D. R., Wu, C. F. (2002). **Morphometric description of the wandering behavior in *Drosophila* larvae: a phenotypic analysis of K⁺ channel mutants.** *Journal of Neurogenetics* 16(1): 45-63.
- Xiong, W.-C., Montell, C. (1993). ***tramtrack* is a transcriptional repressor required for cell fate determination in the *Drosophila* eye.** *Genes & Development* 7: 1085-1096.
- Yanagawa, S.-i., Lee, J.-S. Ishimoto, A. (1998). **Identification and characterization of a novel line of *Drosophila* Schneider S2 cells that respond to wingless signaling.** *The Journal of Biological Chemistry* 273: 32353-32359.
- Yellman, C., Tao, H., He, B., Hirsh, J. (1997). **Conserved and sexually dimorphic behavioral responses to biogenic amines in decapitated *Drosophila*.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94: 4131-4136.
- Yuasa, Y., Okabe, M., Yoshikawa, S., Tabuchi, K., Xiong, W.-C., Hiromi, Y., Okano, H. (2003). ***Drosophila* homeodomain protein Repo controls glial differentiation by cooperating with ETS and BTB transcription factors.** *Development* 130: 2419-2428.

7 Anhang

7.1 Abkürzungsverzeichnis

7.1.1 Allgemeine Abkürzungen

ALG	Astrozyten ähnliche Glia
CBG	<i>cell body</i> Glia
cDNA	<i>copy</i> DNA
DEPC	Diethylcarbonat
DIAS	Dynamic Image Analysis System
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonucleinsäure
dNTP	2'-Desoxyribonucleosid-5'-triphosphat
DUM	<i>dorsal unpaired median</i> Neuronen
GO-Terms	<i>Gene Ontology Terms</i>
GS2	Glutamin-Synthetase 2
HS	Hemisegment
ISN	intersegmentaler Nerv
L3	drittes Larvenstadium
LG	longitudinal Glia
LSM	Laser-Scanning-Mikroskop
MAO	Monoaminoxidase
mRNA	<i>messenger</i> RNA
MWRST	Mann-Whitney Rank Sum Test
NB	Neuroblasten
NS	Nervensystem
<i>One Way ANOVA</i>	<i>One Way Analysis of Variance</i>
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
pHPAA	p-Hydroxyphenol-Acetaldehyd

PMSI	<i>period-positive median segmental interneurons</i>
PNS	peripheres Nervensystem
P{SUPor-P}	suppressor P-Elements
RT	Raumtemperatur
SDR	<i>short-chain dehydrogenase/reductase</i>
SMB	Natrium-methabisulfit
SN	segmentaler Nerv
SPG	<i>subperineurial Glia</i>
St.	Stadium
TA	Tyramin
TC	Tranlycypromin
TN	transversaler Nerv
TRiP	Transgenic RNAi Project
UAS	<i>upstream activating sequence</i>
UTR	untranslatierte Region
VDRC	Vienna Drosophila RNAi Center
VNS	ventrales Nervensystem
VUM	<i>ventral unpaired medial Neuronen</i>
YH	Yohimbin
ZMG	zentrale Mustergeneratoren
ZNS	zentrales Nervensystem

7.1.2 Namen und Abkürzungen der Gene

CG5549

CG7708

Eaat1 *Excitatory amino acid transporter 1*

Eaat2 *Excitatory amino acid transporter 2*

hoe2 *Hoepel2*

gcm *glia cells missing*

naz *nazgul*

<i>pros</i>	<i>prospero</i>
<i>pnt</i>	<i>pointed</i>
<i>repo</i>	<i>reverse polarity</i>
<i>sbb</i>	<i>scribbler</i>
<i>su(Hw)</i>	<i>suppressor of Hairy wing</i>
<i>Tdc</i>	<i>Tyrosin-Decarboxylase</i>
<i>Tβh</i>	<i>Tyramin-β-Hydroxylase</i>
<i>ttk</i>	<i>tramtrack</i>
<i>w</i>	<i>white</i>
<i>y</i>	<i>yellow</i>

7.2 Verwendete Lösungen

50x TAE-Puffer:

242 g Tris-HCl
57,1 ml Eisessig
0,5 ml EDTA (0,5 M)
pH 8 mit HCl einstellen
mit Aqua dest. auf 1 l auffüllen

PEMS-Puffer:

1,2 M Sorbitol
100 mM PIPES
1 mM EGTA
1 mM MgSO₄
pH 6,9

Fixativ für Antikörperfärbung von Embryonen:

450 µl PEMS-Puffer
70 µl 37%iges Formaldehyd
600 µl Heptan

PBS (20x):

1,3 M NaCl

0,07 M Na₂HPO₄

0,03 M NaH₂PO₄ pH 7,4

zum Gebrauch, PBS (1x) im Verhältnis 1:19 mit Aqua dest. verdünnt

0,1 % PBT (1x):

1x PBS mit 0,1 % (v/v) Triton-X-100

0,5 % PBT (1x):

1x PBS mit 0,5 % (v/v) Triton-X-100

DNA-Puffer A:

100 mM Tris/HCl

100 mM EDTA

100 mM NaCl

0,5 % SDS

pH 7,5

DNA-Puffer B:

1 Teil C₂H₃KO₂ (5 M)

2,5 Teile LiCl (6 M)

LB-Medium:

10 g Trypton

5 g Hefeextrakt

10 g NaCl

10 ml KCl (250 mM)

mit Aqua dest. auf 1 l auffüllen; pH 7 mit 10 M NaOH einstellen

autoklavieren und bei 4 °C lagern

Antibiotika wurden nach Bedarf mit 50 µl pro ml LB-Medium zugegeben.

SOC-Medium:

20 g Trypton

5 g Hefeextrakt

0,5 g NaCl

10 ml KCl (250 mM)

pH 7 mit 5 M NaOH einstellen; mit Aqua dest. auf 990 ml auffüllen

10 ml steriles MgCl₂ (1M) zugeben

20 ml steril filtrierte 20%ige Glukoselösung zugeben

Natrium-Cacodylat-Puffer (2x):

200mM Natrium-Cacodylat

pH mit 0,2M HCl auf 7 eingestellt.

Fixativ für Tyraminnachweis im L3 ZNS:

100mM Natrium-Cacodylat-Puffer

0,65 % (v/v) Glutaraldehyd

1 % (w/v) Natriummetabisulfit

TrisHCl SMB:

0,05M TrisHCl

0,45 % (w/v) Natriummetabisulfit

TrisHCl SMB TX:

0,05M TrisHCl

0,45 % (w/v) Natriummetabisulfit

0,3 % (v/v) Triton X-100

7.3 Geräteliste

Gerät	Modell	Hersteller
Brenner Fluoreszenzbimokular	ebq 100	Jena
Brenner Fluoreszenzmikroskop	U-RFL-T	Olympus
Binokular	MZ75	Leica
Eismaschine	AF100	Scotsman
Feinwaage	AM50	Mettler
Fluoreszenzbinokular	MZFL III	Leica
Fluoreszenzmikroskop	BX50WI	Olympus
Geldoku	E-Box VX 2	peqlab
Gelkammer	HE99X	Hofer
Heizschüttler	Thermomixer Compact	Eppendorf
Kaltlichtquelle	KL1500	Schott
Kamera	9000 pro for Mac	Logitech
Kamera Fluoreszenzmikroskop	AxioCam MRm	Zeiss
konfokales Laserscanning-Mikroskop	DMRE TCS SP2	Leica
konfokales Laserscanning-Mikroskop	DM TCS SP5	Leica
Schüttler	Shaker Dos-20S	neoLab
Schüttler	TPM-2	Sarstedt
Schüttler	Vibra VXR	IKA
Thermocycler	TGradient	Biometra
Thermocycler	TPersonal	Biometra

Thermocycler
Transformator Fluoreszenzmikroskop
Tischzentrifuge
pH-Meter
Vortexer
Waage
Zentrifuge

T1000 Touch
TH3
miniSpin
CG840
Reax 2000
PM4600 DeltaRange
5417R

Bio-Rad
Olympus
Eppendorf
Schott
Heidolph
Mettler
Eppendorf

7.4 Verhalten der *nazgul*-Exzisionsmutanten auf Apfelsaftagar

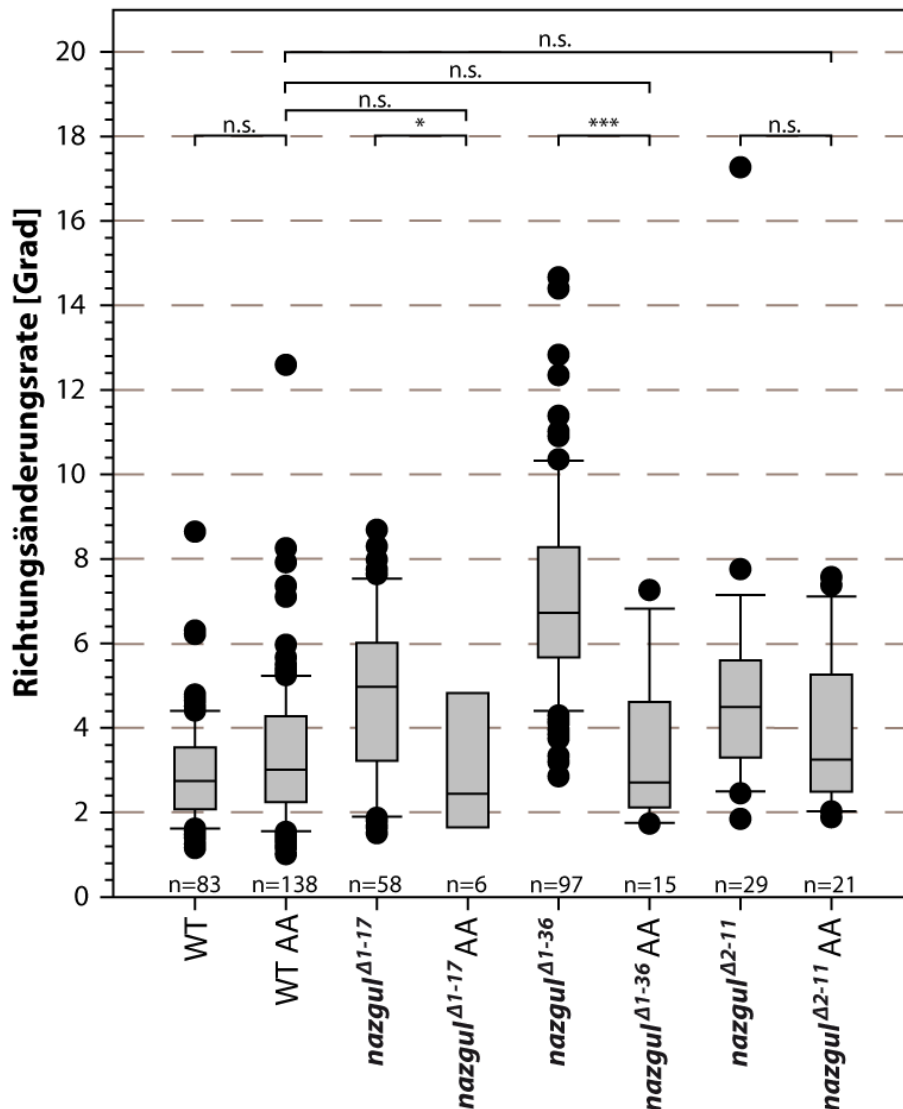


Abbildung 29: Verhalten der *nazgul*-Exzisionsmutanten auf Apfelsaftagar

Vergleich der auf Apfelsaftagar (AA) bestimmten Richtungsänderungsraten von WT und *nazgul*-Exzisionsmutanten mit den zuvor auf Wasseragar gemessenen Werten. Während WT-Tiere hier keine signifikanten Veränderungen des Explorationsverhaltens zeigten ($P=0,068$), wurde bei den Exzisionsmutanten *nazgul* Δ 1-36 ($P<0,001$) und *nazgul* Δ 1-17 ($P=0,044$) eine signifikant niedrigere Richtungsänderungsrate gemessen. Die Mutante *nazgul* Δ 2-11 dagegen zeigte keine signifikante Veränderung der zuvor auf Wasseragar bestimmten Werte ($P=0,074$). Im Vergleich mit den auf Apfelsaftagar getesteten WT konnte für keine der drei auf Apfelsaftagar getesteten Exzisionsmutanten ein signifikanter Unterschied der Richtungsänderungsraten nachgewiesen werden (Alle Daten wurden paarweise mit MWRST verglichen).

7.5 Statistische Datentafeln

Tabelle 8: Frequenzanalyse Richtungsänderungen

Gruppe	WT Median	WT 25 %	WT 75 %	<i>nazgul</i> ^{A1-36} Median	<i>nazgul</i> ^{A1-36} 25 %	<i>nazgul</i> ^{A1-36} 75 %	P-Wert (MWRST)
0°-10°	500	486,25	530,25	370	330,5	414,75	<0,001
10°-20°	48	37,5	62,75	113	99	126,75	<0,001
20°-30°	14	11	20,25	41	35	51	<0,001
30°-40°	7	5	10	21	14,25	27,75	<0,001
40°-50°	3	2	5	12	8	16	<0,001
50°-60°	2	1	3,25	7	5	10	<0,001
60°-70°	2	1	4	6	4	8	<0,001
70°-80°	2	1	3	4	3	6	<0,001
80°-90°	1	0	2	4	2	5	<0,001
90°-100°	1	0	2	2	1	4	<0,001
100°-110°	1	0	1,25	2	1	3	<0,001
110°-120°	1	0	2	2	1	3	=0,003
120°-130°	1	0	1	2	1	3	<0,001
130°-140°	1	0	1	2	1	3	<0,001
140°-150°	1	0	2	1	1	2	=0,23
150°-160°	0	0	1	1	1	3	<0,001
160°-170°	1	0	2	1	0	2	=0,267
170°-180°	0	0	2	1	1	2	=0,009

Tabelle 9: Richtungsänderungsraten WT

Test	Median	25 %	75 %
WT-1	3,474	1,48	7,815
WT-2	2,169	0,921	4,349
WT-3	2,371	1,057	4,941
WT-4.1	4,813	2,138	11,109
WT-4.2	2,292	0,821	4,99
WT-6.1	1,84	0,828	4,088
WT-6.2	1,491	0,622	4,001
WT-7.1	2,436	0,918	6,272
WT-7.2	2,678	1,041	6,413
WT-8.1	2,767	1,1	5,281
WT-8.2	2,865	1,103	6,587
WT-9	3,51	1,443	9,226
WT-10.1	3,587	1,366	8,371
WT-10.2	3,051	1,318	7,365
WT-11.1	2,155	0,968	5,783
WT-11.2	3,076	1,263	7,991
WT-12.1	3,338	1,275	8,272
WT-12.2	3,219	1,263	8,674
WT-13.1	2,603	1,073	6,441
WT-13.2	2,812	1,151	6,375
WT-14.1	3,822	1,45	8,451
WT-14.2	2,157	0,998	5,347
WT-15.1	2,141	1,004	4,031

WT-15.2	1,837	0,721	6,037
WT-16	3,849	1,701	8,643
WT-19	1,808	0,877	4,571
WT-23	1,703	0,737	3,791
WT-24	1,563	0,715	3,375
WT-25	1,462	0,639	3,388
WT-26	3,143	1,291	7,444
WT-27	2,13	0,825	6,688
WT-28	2,431	1,081	5,968
WT-29.1	1,863	0,735	5,653
WT-29.2	1,936	0,877	4,146
WT-30	1,936	0,787	4,555
WT switch WA 01 1	2,36	0,979	5,769
WT switch WA 02 2	2,393	0,963	6,18
WT switch WA 02 3	2,684	1,117	5,484
WT switch WA 03 1	2,616	1,104	4,965
WT switch WA 04 1	1,88	0,806	3,826
WT switch WA 05 1	2,192	0,981	4,464
WT switch WA 05 2	1,394	0,625	2,707
WT switch WA 06 1	1,14	0,53	2,154
WT switch WA 06 2	1,405	0,555	2,756
WT switch WA 07 1	3,571	1,397	8,13
WT switch WA 07 2	3,024	1,272	10,824
WT switch WA 08 1	3,555	1,685	6,986
WT switch WA 08 2	1,843	0,761	3,381
WT switch WA 10 1	2,292	0,946	4,295
WT switch WA 10 2	4,418	1,583	9,4
WT switch WA 10 3	2,824	1,143	6,685
WT switch WA 10 4	4,198	1,831	8,671
WT switch WA 11 1	2,802	1,103	6,42
WT switch WA 11 2	4,448	1,677	9,232
WT switch WA 11 3	3,467	1,28	8,359
WT switch WA 12 1	3,486	1,312	8,347
WT switch WA 12 2	3,839	1,393	9,727
WT switch WA 12 3	3,655	1,538	7,446
WT switch WA 12 4	3,287	1,523	7,525
WT switch WA 13 1	2,927	1,029	7,259
WT switch WA 13 2	2,195	0,969	5,17
WT switch WA 13 3	2,908	1,201	5,797
WT switch WA 13 4	3,796	1,537	9,279
WT switch WA 14 1	4,067	1,655	9,8
WT switch WA 14 2	4,803	1,926	11,003
WT switch WA 15 1	2,252	0,881	5,435
WT switch WA 15 2	2,426	0,856	5,853
v2WT 001 1	2,751	1,016	4,961
v2WT 002 1	3,028	1,36	5,869
v2WT 003 1	2,199	0,874	5,013

v2WT 004 1	10,294	3,985	22,571
v2WT 005 1	4,187	1,708	11,109
v2WT 005 2	4,126	1,448	11,433
v2WT 006 1	3,845	1,353	11,115
v2WT 007 2	1,936	0,839	4,036
v2WT 008 8	1,002	0,424	1,81
v2WT 009 1	3,569	1,355	9,507
v2WT 009 2	5,977	2,704	10,719
v2WT 011 1	1,444	0,669	2,894
v2WT 011 2	1,667	0,744	3,159
v2WT 012 1	1,693	0,623	3,791
v2WT 012 2	2,979	1,248	7,132
v2WT 013 2	3,816	1,198	10,605

Tabelle 10: Richtungsänderungsraten WT auf Apfelsaftagar

Test	Median	25 %	75 %
WT AA 001 1	4,17	1,473	9,385
WT AA 001 2	1,766	0,764	3,722
WT AA 002 1	3,903	1,426	10,521
WT AA 002 2	1,803	0,785	6,543
WT AA 004 1	3,98	1,654	8,311
WT AA 004 2	4,279	1,985	9,267
WT AA 005 1	2,317	0,814	6,485
WT AA 005 2	3,424	1,394	10,859
WT AA 006 1	5,23	2,001	11,415
WT AA 006 2	3,126	1,041	7,669
WT AA 007 1	4,97	1,599	13,65
WT AA 007 2	1,582	0,644	4,079
WT AA 008 1	2,97	1,161	8,158
WT AA 008 2	7,361	2,598	17,843
WT AA 009 1	5,495	1,834	15,368
WT AA 009 2	4,706	1,38	12,013
WT AA 010 1	4,985	1,924	13,223
WT AA 010 2	5,18	1,388	15,164
WT AA 011 1	3,862	1,451	10,773
WT AA 011 2	3,607	1,461	8,854
WT AA 012 1	8,252	2,916	19,574
WT AA 012 2	4,284	1,434	12,497
WT AA 013 1	1,302	0,599	2,506
WT AA 013 2	4,697	1,784	10,238
WT AA 014 1	4,612	1,732	13,884
WT AA 014 2	4,57	1,826	12,834
WT AA 015 2	4,569	1,71	11,1
WT AA 016 1	2,524	0,884	6,849
WT AA 016 2	4,274	1,621	14,211
WT AA 017 1	5,409	1,918	12,354

WT AA 017 2	5,162	1,893	12,769
WT AA 018 1	4,351	1,617	12,264
WT AA 018 2	3,044	1,255	7,802
WT AA 019 1	5,122	2,174	14,182
WT AA 019 2	1,461	0,563	4,614
WT AA 020 1	2,869	1,042	8,171
WT AA 020 2	7,918	2,258	23,386
WT AA 020 3	3,334	1,19	8,704
WT AA 020 4	3,744	1,382	12,22
WT AA 021 1	1,555	0,618	3,44
WT AA 021 2	1,901	0,84	4,401
WT AA 022 1	4,689	1,447	14,636
WT AA 022 2	3,1	1,123	7,588
WT AA 022 3	7,103	2,492	17,868
WT AA 022 4	3,189	1,17	8,729
WT AA 023 1	5,062	1,289	23,755
WT AA 023 2	4,031	1,562	9,616
WT AA 023 3	4,143	1,54	10,14
WT AA 023 4	2,339	0,824	9,283
WT AA 024 1	5,372	1,977	14,081
WT AA 024 2	3,696	1,516	9,09
WT AA 024 3	2,74	1,091	7,986
WT AA 024 4	3,748	1,251	13,499
WT AA 025 1	5,352	1,336	26,614
WT AA 025 2	5,248	2,273	12,43
WT AA 025 3	2,483	0,968	6,968
WT AA 025 4	12,592	2,029	30,264
WT AA 026 1	5,285	1,686	13,717
WT AA 026 2	3,208	1,046	8,422
WT AA 026 3	1,907	0,782	4,987
WT AA 026 4	4,096	1,583	11,3
WT AA 027 1	2,791	0,823	8,411
WT AA 027 2	3,795	1,561	9,849
WT AA 028 1	4,039	1,196	13,333
WT AA 028 2	2,577	1,027	7,982
WT AA 028 3	4,226	1,209	12,982
WT AA 028 4	3,841	1,669	9,166
WT AA 029 1	4,417	1,554	12,534
WT AA 029 2	1,935	0,796	5,333
WT AA 029 3	3,995	1,453	8,937
WT AA 030 1	2,337	0,937	6,777
WT AA 030 2	2,193	0,714	14,137
WT AA 030 3	2,359	0,977	6,546
WT AA 030 4	2,373	0,794	9,314
WT AA 031 1	3,447	1,404	9,088
WT AA 031 2	1,407	0,551	3,109
WT AA 032 1	2,268	0,885	6,471

WT AA 032 2	1,875	0,759	6,099
WT AA 032 3	3,655	1,433	9,994
WT AA 032 4	1,365	0,521	3,14
WT AA 033 1	1,875	0,725	5,387
WT AA 033 2	3,081	1,227	11,713
WT AA 034 1	1,847	0,775	3,997
WT AA 034 2	2,632	0,877	7,286
WT AA 034 3	2,103	0,771	6,463
WT AA 034 4	3,393	1,291	8,533
WT AA 035 1	4,611	0,805	36,187
WT AA 035 2	1,506	0,632	3,702
WT AA 035 3	1,898	0,702	7,336
WT AA 035 4	2,985	1,018	8,241
WT AA 036 1	4,294	1,464	11,587
WT AA 036 2	2,314	1,008	5,364
WT AA 036 3	2,98	0,936	8,61
WT AA 036 4	5,965	2,19	21,143
WT AA 037 1	2,747	0,895	10,849
WT AA 037 2	3,705	1,401	10,466
WT AA 037 3	4,53	1,925	10,242
WT AA 037 4	3,113	1,056	8,554
WT AA 038 1	5,666	2,071	14,412
WT AA 038 2	3,052	0,739	13,602
WT AA 038 3	1,468	0,673	4,159
WT AA 039 1	2,272	0,986	5,216
WT AA 039 2	1,467	0,7	3,353
WT AA 039 3	1,538	0,726	2,854
WT AA 040 2	1,309	0,576	2,692
WT AA 040 4	2,511	0,828	7,594
WT AA 041 1	2,318	0,739	6,92
WT AA 041 2	2,27	0,9	5,465
WT AA 041 3	3,282	1,247	8,034
WT AA 041 4	2,955	1,287	6,636
WT AA 042 1	4,706	1,495	11,204
WT AA 042 2	1,966	0,743	4,631
WT AA 042 3	2,377	0,918	5,469
WT AA 043 1	2,929	1,215	7,551
WT AA 043 2	3,469	1,28	10,502
WT AA 043 3	1,226	0,573	2,333
WT AA 043 4	2,408	0,792	7,109
WT AA 044 1	1,178	0,597	2,174
WT AA 044 2	2,389	0,975	5,023
WT AA 045 1	1,799	0,732	3,943
WT AA 045 2	2,738	1,121	7,004
WT AA 045 3	1,012	0,482	2,027
WT AA 046 1	1,723	0,692	3,828
WT AA 046 2	2,786	0,985	7,716

WT AA 047 1	3,548	1,386	9,32
WT AA 049 1	2,434	0,895	6,34
WT AA 050 1	1,875	0,811	4,113
WT AA 051 1	2,162	0,852	5,327
WT AA 052 2	2,781	1,057	7,12
WT AA 052 3	1,576	0,695	3,327
WT AA 052 4	2,32	0,858	6,074
WT AA 053 1	2,046	0,946	5,02
WT AA 053 2	2,273	0,794	6,227
WT AA 053 3	2,151	0,946	5,095
WT AA 054 1	2,772	1,004	7,26
WT AA 054 2	3,221	1,114	8,85
WT AA 054 3	1,158	0,516	2,184
WT AA 054 4	2,395	0,943	5,988

Tabelle 11: Richtungsänderungsraten *nazgul*^{Δ1-36}

Test	Median	25 %	75 %
1-36 001	7,644	3,308	15,849
1-36 005	5,701	2,095	13,313
1-36 006	8,947	3,737	25,920
1-36 007	6,978	3,073	14,579
1-36 008	10,265	3,588	26,628
1-36 009	5,991	2,417	13,128
1-36 010	8,381	3,552	18,029
1-36 011	6,249	2,677	13,138
1-36 012	8,346	3,529	20,250
1-36 013	6,185	2,122	16,571
1-36 015	7,636	2,485	18,703
1-36 016	6,934	2,874	15,594
1-36 017	7,674	2,956	17,967
1-36 018	6,038	2,267	14,794
Naz-ex 1-36 019	7,832	3,306	16,272
Naz-ex 1-36 020	3,924	1,697	8,081
Naz-ex 1-36 021	8,369	3,808	18,431
Naz-ex 1-36 022	6,232	2,730	14,287
Naz-ex 1-36 023	6,058	2,663	11,992
Naz-ex 1-36 024	9,170	3,671	20,634
Naz-ex 1-36 025	5,219	2,232	11,444
Naz-ex 1-36 026	10,097	4,148	21,687
Naz-ex 1-36 027	5,958	2,568	11,090
Naz-ex 1-36 028	8,096	3,727	14,828
Naz-ex 1-36 029	7,520	2,582	16,582
Naz-ex 1-36 030	9,528	3,838	19,894
Naz-ex 1-36 031	10,768	4,485	30,291
Naz-ex 1-36 032	7,185	2,875	15,498
Naz-ex 1-36 033	6,277	2,570	13,395

Naz-ex 1-36 034	8,584	3,454	19,330
Naz-ex 1-36 035	12,544	4,703	27,779
Naz-ex 1-36 036	6,026	2,572	14,296
Naz-ex 1-36 037	6,848	2,966	15,843
Naz-ex 1-36 038	5,007	2,076	11,733
Naz-ex 1-36 039	12,612	5,295	28,820
Naz-ex 1-36 040	14,654	5,237	35,939
Naz ex 1-36 1 water 1	7,766	3,246	17,289
Naz ex 1-36 1 water 2	5,738	2,333	13,309
Naz ex 1-36 1 water 3	10,486	3,691	24,979
Naz ex 1-36 2 water 1	8,786	3,923	19,726
Naz ex 1-36 2 water 2	6,256	2,734	12,361
Naz ex 1-36 2 water 3	7,141	3,194	15,286
Naz ex 1-36 2 water 4	4,526	2,096	9,702
Naz ex 1-36 2 water 5	7,884	3,388	17,425
Naz ex 1-36 2 water 1	8,786	3,923	19,726
Naz ex 1-36 2 water 2	6,783	2,721	13,910
Naz ex 1-36 2 water 3	10,055	4,042	22,818
Naz ex 1-36 2 water 4	8,660	3,256	20,017
Naz ex 1-36 2 water 5	8,090	3,278	16,128
Naz ex 1-36 3 water 1	4,613	1,842	9,947
Naz ex 1-36 3 water 2	6,783	2,721	13,910
Naz ex 1-36 3 water 3	10,055	4,042	22,818
Naz ex 1-36 3 water 4	8,660	3,256	20,017
Naz ex 1-36 3 water 5	8,090	3,278	16,128
Naz ex 1-36 4 water 1	5,007	2,278	11,812
Naz ex 1-36 4 water 2	14,562	5,885	27,911
Naz ex 1-36 4 water 3	2,829	1,056	6,450
Naz ex 1-35 5 water 1	5,955	2,538	11,622
Naz ex 1-35 5 water 2	8,503	3,543	16,963
Naz ex 1-35 5 water 3	8,085	3,815	20,116
Naz ex 1-35 5 water 4	5,990	2,379	12,884
Naz ex 1-35 5 water 5	6,314	2,908	13,426
Naz ex 1-35 6 water 1	6,428	2,767	14,421
Naz ex 1-35 6 water 2	7,954	3,521	15,608
Naz ex 1-35 6 water 3	4,943	1,851	11,335
Naz ex 1-35 6 water 4	6,389	2,380	12,965
Naz ex 1-35 6 water 5	10,175	4,015	24,912
Naz ex 1-35 7 water 1	8,122	3,604	16,289
Naz ex 1-35 7 water 2	9,128	3,661	18,847
Naz ex 1-35 7 water 3	5,842	2,277	12,151
Naz ex 1-35 7 water 4	4,905	1,899	11,685
Naz ex 1-35 7 water 5	5,284	2,024	11,859
Naz ex 1-35 8 water 1	6,354	2,322	16,697
Naz ex 1-35 8 water 2	7,157	2,861	17,156
Naz ex 1-35 8 water 3	4,493	1,776	10,785
Naz ex 1-35 9 water 1	3,199	1,324	6,650

Naz ex 1-35 9 water 2	3,850	1,582	9,692
Naz ex 1-35 9 water 3	5,677	2,321	12,912
Naz ex 1-35 9 water 5	4,112	1,633	9,051
switch WA 01 1	5,198	2,424	11,450
switch WA 01 2	5,691	2,214	12,448
switch WA 01 3	8,858	3,977	19,850
switch WA 01 4	7,484	3,595	16,173
switch WA 02 1	3,341	1,671	6,058
switch WA 02 2	8,056	3,025	17,493
switch WA 02 3	5,813	2,881	11,954
switch WA 02 4	4,284	1,992	9,794
switch WA 02 5	5,121	2,073	10,390
switch WA 03 1	8,189	3,318	18,032
switch WA 03 2	11,049	4,020	24,582
switch WA 03 3	6,744	2,918	16,803
switch WA 04 1	3,516	1,507	8,536
switch WA 04 2	5,824	2,500	11,616
switch WA 04 3	4,202	1,995	7,628
switch WA 04 4	5,506	2,441	11,689
switch WA 05 1	5,494	2,352	10,345
switch WA 05 2	4,147	1,782	8,187

Tabelle 12: Richtungsänderungsraten *nazgul*^{IA1-36} auf Apfelsaftagar

Test	Median	25 %	75 %
Naz-Ex 1-36 AA 01a 1	2,057	0,887	4,531
Naz-Ex 1-36 AA 01a 2	2,372	1,028	5,077
Naz-Ex 1-36 AA 01a 3	2,711	1,162	6,924
Naz-Ex 1-36 AA 01a 4	4,616	1,964	12,495
Naz-Ex 1-36 AA 02a 1	2,608	1,055	5,171
Naz-Ex 1-36 AA 02a 2	2,118	0,91	3,934
Naz-Ex 1-36 AA 03a 1	2,922	1,355	5,641
Naz-Ex 1-36 AA 03a 2	3,847	1,691	7,993
Naz-Ex 1-36 AA 03a 3	6,535	2,693	13,504
Naz-Ex 1-36 AA 03a 4	2,554	1,156	4,557
Naz-Ex 1-36 AA 04a 1	1,766	0,751	3,434
Naz-Ex 1-36 AA 04a 2	7,26	3,08	18,566
Naz-Ex 1-36 AA 04a 3	3,87	1,584	7,919
Naz-Ex 1-36 AA 04a 4	1,733	0,783	3,11
Naz-Ex 1-36 AA 05a 1	4,923	1,843	11,756

Tabelle 13: Richtungsänderungsraten *nazgul*^{A1-17}

Test	Median	25 %	75 %
Naz-Ex 1-17 L3 003	6,398	2,67	12,351
Naz-Ex 1-17 L3 004	5,573	1,545	16,977
Naz-Ex 1-17 L3 005	5,523	2,424	12,344
Naz-Ex 1-17 L3 006	5,391	1,92	12,641
Naz-Ex 1-17 L3 009	7,489	2,901	17,312
Naz-Ex 1-17 L3 010	7,815	3,339	15,871
Naz-Ex 1-17 L3 011	5,226	2,304	11,131
Naz-Ex 1-17 L3 012	6,897	3,127	14,481
Naz-Ex 1-17 L3 013	6,276	2,175	15,842
Naz-Ex 1-17 L3 014	6,313	2,553	15,238
Naz-Ex 1-17 L3 015	8,812	3,644	19,884
Naz-Ex 1-17 L3 016	7,969	3,08	18,411
Naz-Ex 1-17 L3 017	5,34	2,273	11,958
Naz-Ex 1-17 L3 018	2,998	1,23	7,015
Naz-Ex 1-17 L3 019	6,871	2,737	15,551
Naz-Ex 1-17 L3 020	5,525	2,19	12,743
Naz-Ex 1-17 L3 021	1,672	0,838	3,711
Naz-Ex 1-17 L3 022	5,771	2,509	13,302
Naz-Ex 1-17 L3 023	6,955	2,177	14,959
Naz-Ex 1-17 L3 024	6,083	2,187	14,767
Naz-Ex 1-17 L3 025	6,202	2,764	12,859
Naz-Ex 1-17 L3 026	7,795	2,996	15,783
Naz-Ex 1-17 L3 027	4,196	1,741	9,354
Naz-Ex 1-17 L3 028	2,616	1,006	7,165
Naz-Ex 1-17 L3 029	8,837	3,626	18,122
Naz-Ex 1-17 L3 030	6,923	2,679	15,71
Naz-Ex 1-17 L3 031	6,112	2,523	13,189
Naz ex 1-17 1 water 3	3,67	1,652	7,368
Naz ex 1-17 1 water 4	5,725	2,262	12,886
Naz ex 1-17 1 water 5	4,476	2,039	9,034
Naz ex 1-17 2 water 1	3,49	1,449	5,801
Naz ex 1-17 2 water 2	6,125	2,481	14,615
Naz ex 1-17 3 water 1	3,067	1,343	6,074
Naz ex 1-17 3 water 2	4,544	1,779	9,334
Naz ex 1-17 3 water 3	4,352	1,971	8,166
Naz ex 1-17 4 water 1	3,075	1,287	6,593
Naz ex 1-17 4 water 2	2,449	1,145	5,061
Naz ex 1-17 4 water 3	3,454	1,502	8,396
Naz ex 1-17 5 water 1	2,066	0,696	4,621
Naz ex 1-17 6 water 1	1,871	0,701	3,914
Naz ex 1-17 6 water 2	1,807	0,663	3,779
Naz ex 1-17 6 water 3	1,901	0,794	3,668
Naz ex 1-17 7 water 4	1,645	0,698	3,507
Naz ex 1-17 8 water 1	3,273	1,339	8,884
Naz ex 1-17 8 water 2	3,912	1,752	8,399

Naz ex 1-17 8 water 3	3,336	1,574	6,437
Naz ex 1-17 9 water 1	2,675	1,11	6,506
Naz ex 1-17 9 water 2	4,339	1,77	9,692
Naz ex 1-17 10 water 1	1,508	0,718	2,843
Naz ex 1-17 10 water 2	2,765	0,994	6,729
Naz ex 1-17 10 water 3	3,407	1,346	7,916

Tabelle 14: Richtungsänderungsraten *nazgul*^{A1-17} auf Apfelsaftagar

Test	Median	25 %	75 %
Naz-Ex 1-17 AA 01a	2,335	1,04	5,122
Naz-Ex 1-17 AA 02a	5,967	2,208	16,331
Naz-Ex 1-17 AA 03a	2,555	1,027	6,238
Naz-Ex 1-17 AA 04a	1,801	0,872	3,595
Naz-Ex 1-17 AA 05a	1,181	0,536	2,252
Naz-Ex 1-17 AA 06a	4,446	1,857	11,83

Tabelle 15: Richtungsänderungsraten *nazgul*^{A2-11}

Test	Median	25 %	75 %
naz ex 2-11 1 water 1	5,924	2,673	12,158
naz ex 2-11 1 water 2	5,369	1,766	13,338
naz ex 2-11 1 water 3	4,574	1,937	9,683
naz ex 2-11 1 water 4	4,812	2,182	11,828
naz ex 2-11 2 water 1	1,848	0,702	3,571
naz ex 2-11 2 water 2	4,219	1,767	9,115
naz ex 2-11 2 water 3	4,478	1,879	9,509
naz ex 2-11 2 water 4	4,459	1,59	11,455
naz ex 2-11 2 water 5	3,08	1,222	7,226
naz ex 2-11 3 water 1	7,146	2,873	15
naz ex 2-11 3 water 2	5,225	2,117	9,754
naz ex 2-11 3 water 3	7,146	2,807	15,888
naz ex 2-11 3 water 4	5,737	2,398	12,752
naz ex 2-11 3 water 5	2,773	1,243	4,951
naz ex 2-11 4 water 1	2,452	1,011	5,634
naz ex 2-11 4 water 2	3,727	1,552	7,45
naz ex 2-11 4 water 3	4,521	2,039	8,905
naz ex 2-11 4 water 4	3,437	1,39	8,085
naz ex 2-11 4 water 5	3,163	1,331	6,674
naz ex 2-11 5 water 1	17,268	3,258	60,274
naz ex 2-11 5 water 2	4,497	1,703	9,404
naz ex 2-11 5 water 3	4,714	1,972	9,486
naz ex 2-11 WA 02-1	7,755	3,409	17,187
naz ex 2-11 WS 02-2	6,438	2,863	13,354
naz ex 2-11 WA 04-1	3,536	1,511	7,057
naz ex 2-11 WA 05-1	2,499	0,884	6,209
naz ex 2-11 WA 06-1	5,457	2,439	10,576
naz ex 2-11 WA 06-2	4,334	1,484	8,981

naz ex 2-11 WA 07-1	2,505	0,971	4,294
---------------------	-------	-------	-------

Tabelle 16: Richtungsänderungsraten *nazgul*^{A2-11} auf Apfelsaftagar

Test	Median	25 %	75 %
Naz-Ex 2-11 AA 01-1	2,733	1,296	5,723
Naz-Ex 2-11 AA 01-2	3,817	1,366	10,92
Naz-Ex 2-11 AA 01-3	2,287	0,928	4,48
Naz-Ex 2-11 AA 01-4	3,138	1,31	6,845
Naz-Ex 2-11 AA 02-1	2,022	0,872	4,375
Naz-Ex 2-11 AA 02-2	6,051	0,606	30,54
Naz-Ex 2-11 AA 02-3	7,569	2,657	19,447
Naz-Ex 2-11 AA 03-1	3,262	1,217	8,023
Naz-Ex 2-11 AA 03-2	1,883	0,82	3,307
Naz-Ex 2-11 AA 04-1	4,943	1,966	13
Naz-Ex 2-11 AA 04-2	3,253	1,263	8,32
Naz-Ex 2-11 AA 04-3	4,177	1,381	9,372
Naz-Ex 2-11 AA 05-1	2,536	1,067	4,517
Naz-Ex 2-11 AA 05-2	2,053	0,815	4
Naz-Ex 2-11 AA 05-3	2,442	0,986	5,011
Naz-Ex 2-11 AA 06-1	5,585	2,467	14,771
Naz-Ex 2-11 AA 06-2	7,379	3,061	19,371
Naz-Ex 2-11 AA 06-3	2,99	1,209	8,565
Naz-Ex 2-11 AA 07-1	5,655	1,93	15,622
Naz-Ex 2-11 AA 07-2	2,749	1,159	6,204
Naz-Ex 2-11 AA 07-3	4,052	1,611	9,119

Tabelle 17: Richtungsänderungsraten P-Element Insertion

Test	Median	25 %	75 %
P-Element Insertion 01 1	5,4	2,161	12,432
P-Element Insertion 01 2	4,404	1,782	9,163
P-Element Insertion 01 3	6,143	2,398	11,641
P-Element Insertion 02 1	3,577	1,605	7,988
P-Element Insertion 02 2	4,096	1,771	9,224
P-Element Insertion 02 3	5,104	2,154	11,918
P-Element Insertion 02 4	4,237	1,574	9,079
P-Element Insertion 03 1	5,859	2,545	9,858
P-Element Insertion 03 2	1,854	0,779	3,602
P-Element Insertion 03 3	6,778	2,867	13,807
P-Element Insertion 03 4	3,718	1,584	9,409
P-Element Insertion 04 1	5,087	2,211	10,847
P-Element Insertion 04 2	4,038	1,638	9,16
P-Element Insertion 04 3	4,536	1,907	9,547
P-Element Insertion 04 4	3,867	1,722	7,699
P-Element Insertion 05 1	4,108	1,537	8,912
P-Element Insertion 05 2	3,494	1,533	7,069
P-Element Insertion 05 3	4,189	1,857	7,215

P-Element Insertion 06 1	3,158	1,484	6,413
P-Element Insertion 06 2	5,09	2,231	10,399
P-Element Insertion 06 3	3,5	1,452	6,752

Tabelle 18: Richtungsänderungsraten Df(3R)EXEL6178/nazgul^{A1-36}

Test	Median	25 %	75 %
1-36xnazdef 01 1	3,988	1,686	8,49
1-36xnazdef 01 2	1,766	0,747	3,766
1-36xnazdef 01 3	6,229	2,407	15,12
1-36xnazdef 02 1	2,548	1,203	4,669
1-36xnazdef 02 2	3,058	1,378	5,574
1-36xnazdef 02 3	6,198	2,665	12,409
1-36xnazdef 02 4	1,663	0,77	3,015
1-36xnazdef 03 1	6,181	2,636	12,449
1-36xnazdef 04 1	1,74	0,739	3,413
1-36xnazdef 04 2	1,709	0,781	3,375
1-36xnazdef 05 1	3,356	1,442	6,747
1-36xnazdef 05 2	4,399	1,688	9,407
1-36xnazdef 06 1	4,004	1,696	9,281
1-36xnazdef 06 2	4,309	1,977	9,305
1-36xnazdef 07 1	3,169	1,219	7,011
1-36xnazdef 08 1	2,638	1,238	4,966
1-36xnazdef 09 1	4,147	1,696	7,954
1-36xnazdef 09 2	3,441	1,569	6,738
1-36xnazdef 09 3	2,882	1,175	5,616
1-36xnazdef 09 4	3,59	1,627	7,807
1-36xnazdef 10 1	3,244	1,314	7,977
1-36xnazdef 10 3	2,592	0,975	5,449
1-36xnazdef 10 4	2,93	1,277	6,047
Nazdefx1-36 01 1	3,409	1,547	6,681
Nazdefx1-36 02 1	3,973	1,878	8,803
Nazdefx1-36 02 2	4,303	1,794	8,195
Nazdefx1-36 02 3	3,689	1,627	8,576
Nazdefx1-36 02 4	6,45	3,18	11,797
Nazdefx1-36 03 1	3,222	1,168	8,515
Nazdefx1-36 03 2	2,82	1,156	6,017
Nazdefx1-36 03 3	3,224	1,409	6,737
Nazdefx1-36 03 4	3,941	1,722	7,998
Nazdefx1-36 04 1	3,81	1,944	6,75
Nazdefx1-36 04 2	4,294	1,657	8,114
Nazdefx1-36 04 3	4,944	2,027	9,415
Nazdefx1-36 04 4	4,774	1,919	8,806
Nazdefx1-36 05 1	4,304	1,857	9,516
Nazdefx1-36 05 2	6,442	2,907	11,895
Nazdefx1-36 05 3	5,732	2,168	11,938

Tabelle 19: Richtungsänderungsraten *naz*-RNAi VDRC

Test	Median	25 %	75 %
nazRNAi KK 01 1	2,911	1,294	5,649
nazRNAi KK 02 1	2,56	1,077	5,274
nazRNAi KK 02 2	5,689	2,181	20,6
nazRNAi KK 02 4	3,931	1,818	7,151
nazRNAi KK 03 1	6,282	2,983	10,953
nazRNAi KK 03 2	3,355	1,378	6,371
nazRNAi KK 04 1	2,669	1,12	5,583
nazRNAi KK 04 2	3,953	1,532	9,201
nazRNAi KK 05 1	4,603	1,687	12,839
nazRNAi KK 05 2	7,165	2,615	21,743
nazRNAi KK 05 4	3,443	1,416	6,632
nazRNAi KK 07 1	5,907	2,159	13,717
nazRNAi KK 07 2	4,485	1,599	9,992
nazRNAi KK 07 3	6,867	2,684	16,504
nazRNAi KK 09 1	6,018	2,552	11,72
nazRNAi KK 09 2	10,44	4,387	25,433
nazRNAi KK 09 3	4,34	1,785	8,562
nazRNAi KK 10 1	4,369	1,78	9,923
nazRNAi KK 10 2	2,791	1,24	5,146
nazRNAi KK 10 3	3,44	1,351	8,417
nazRNAi KK 11 1	2,401	0,984	6,146
nazRNAi KK 11 2	2,252	0,958	4,363
nazRNAi KK 11 3	2,158	0,991	4,286
nazRNAi KK 12 1	6,046	2,435	12,822
nazRNAi KK 12 3	3,18	1,352	6,355
nazRNAi KK 13 1	2,039	0,878	4,224
nazRNAi KK 14 1	2,717	1,108	5,268

Tabelle 20: Richtungsänderungsraten *naz*-RNAi TRiP

Test	Median	25 %	75 %
dicer repoG4nazRNAi 01 1	4,767	1,917	9,984
dicer repoG4nazRNAi 01 2	2,928	1,259	5,812
dicer repoG4nazRNAi 01 3	5,711	2,071	11,851
dicer repoG4nazRNAi 01 4	7,399	2,963	14,642
dicer repoG4nazRNAi 02 1	5,339	2,399	9,685
dicer repoG4nazRNAi 03 1	4,241	1,782	8,987
dicer repoG4nazRNAi 03 2	3,208	1,515	5,825
dicer repoG4nazRNAi 03 4	3,85	1,551	8,454
dicer repoG4nazRNAi 04 1	2,298	0,997	4,092
dicer repoG4nazRNAi 04 2	2,093	1,02	3,909
dicer repoG4nazRNAi 04 3	3,883	1,536	8,513
dicer repoG4nazRNAi 04 4	7,956	3,327	17,032
dicer repoG4nazRNAi05 1	3,818	1,682	9,135
dicer repoG4nazRNAi 05 2	4,032	1,363	8,195

dicer repoG4nazRNAi 06 1	2,355	0,889	4,517
dicer repoG4nazRNAi 06 2	2,438	1,154	5,518
dicer repoG4nazRNAi 06 3	4,276	1,566	9,176
dicer repoG4nazRNAi 07 1	6,377	2,624	13,835
dicer repoG4nazRNAi 07 2	4,928	2,062	9,864
dicer repoG4nazRNAi 07 3	4,197	1,872	7,86
dicer repoG4nazRNAi 08 1	5,689	2,532	10,758
dicer repoG4nazRNAi 08 2	5,591	2,52	9,8
dicer repoG4nazRNAi 09 1	2,366	1,042	4,661
dicer repoG4nazRNAi 09 2	3,718	1,68	7,135
dicer repoG4nazRNAi 10 1	5,706	2,582	11,276
dicer repoG4nazRNAi 10 3	5,66	2,206	11,514
dicer repoG4nazRNAi 11 1	2,88	1,405	5,975
dicer repoG4nazRNAi 11 2	4,577	1,815	10,133
dicer repoG4nazRNAi 12 1	5,347	2,112	11,252
dicer repoG4nazRNAi 12 2	5,303	2,477	10,236
dicer repoG4nazRNAi 12 3	6,465	2,673	12,992
dicer repoG4nazRNAi 13 1	5,953	2,438	13,043
dicer repoG4nazRNAi 13 2	5,472	2,163	12,667
dicer repoG4nazRNAi 13 3	5,758	2,214	11,059
dicer repoG4nazRNAi 14 1	4,459	1,76	9,077
dicer repoG4nazRNAi 14 3	2,926	1,201	6,326
nazRNAi TRiP NF Kon 01 1	1,827	0,8	4,109
nazRNAi TRiP NF Kon 01 2	5,378	2,299	11,467
nazRNAi TRiP NF Kon 01 3	4,309	1,901	8,748
nazRNAi TRiP NF Kon 02 1	5,68	2,2	12,482
nazRNAi TRiP NF Kon 02 2	6,75	3,076	13,735
nazRNAi TRiP NF Kon 02 3	4,97	1,978	11,424
nazRNAi TRiP NF Kon 02 4	4,526	2,177	11,342
nazRNAi TRiP NF Kon 03 1	5,28	2,148	11,099
nazRNAi TRiP NF Kon 03 2	5,745	2,337	12,607
nazRNAi TRiP NF Kon 03 3	3,568	1,442	8,785
nazRNAi TRiP NF Kon 03 4	7,157	3,045	15,942
nazRNAi TRiP NF Kon 04 1	4,04	1,733	8,879
nazRNAi TRiP NF Kon 04 2	2,543	1,165	5,684
nazRNAi TRiP NF Kon 04 3	5,919	2,221	12,82
nazRNAi TRiP NF Kon 05 1	3,959	1,755	9,047
nazRNAi TRiP NF Kon 05 2	4,802	2,145	10,294
nazRNAi TRiP NF Kon 05 3	4,476	1,858	8,858

Tabelle 21: Richtungsänderungsraten heterozygote *naz*-RNAi VDRK Kontrolle

Test	Median	25 %	75 %
w-xNazRNAiKK 01 1	1,845	0,801	3,314
w-xNazRNAiKK 02 1	1,781	0,777	3,403
w-xNazRNAiKK 03 1	2,899	1,249	5,584
w-xNazRNAiKK 03 2	1,248	0,568	2,571

w-xNazRNAiKK 06 1	2,45	1,143	4,428
w-xNazRNAiKK 07 1	1,824	0,79	4,123
w-xNazRNAiKK 08 1	2,995	1,162	6,762
w-xNazRNAiKK 09 1	1,494	0,622	3,102
w-xNazRNAiKK 10 1	1,684	0,682	3,157
w-xNazRNAiKK 10 2	1,887	0,816	3,308
w-xNazRNAiKK 11 1	2,151	0,946	4,229
w-xNazRNAiKK 14 1	2,992	1,303	5,36
w-xNazRNAiKK 15 1	2,161	0,843	3,761
w-xNazRNAiKK 16 1	1,326	0,585	2,498
w-xNazRNAiKK 17 1	1,526	0,712	2,595
w-xNazRNAiKK 17 2	3,543	1,382	9,59
w-xNazRNAiKK 18 1	1,362	0,571	2,755
w-xNazRNAiKK 19 1	4,087	1,841	10,87

Tabelle 22: Richtungsänderungsraten heterozygote *naz*-RNAi TRiP Kontrolle

Test	Median	25 %	75 %
w-xnazRNAiTRiP 01 1	1,598	0,673	3,404
w-xnazRNAiTRiP 03 1	1,685	0,729	3,474
w-xnazRNAiTRiP 04 1	1,521	0,64	3,796
w-xnazRNAiTRiP 04 2	1,39	0,582	3,191
w-xnazRNAiTRiP 05 1	2,136	0,958	5,26
w-xnazRNAiTRiP 05 2	2,604	1,006	6,744
w-xnazRNAiTRiP 06 1	2,391	0,987	6,309
w-xnazRNAiTRiP 07 1	1,709	0,694	3,312
w-xnazRNAiTRiP 08 1	4,042	1,328	9,559
w-xnazRNAiTRiP 08 2	1,52	0,535	3,725
w-xnazRNAiTRiP 09 1	2,229	0,939	5,443
w-xnazRNAiTRiP 11 1	2,267	0,824	6,235
w-xnazRNAiTRiP 12 1	2,123	0,808	5,431
w-xnazRNAiTRiP 12 2	2,298	0,929	6,663
w-xnazRNAiTRiP 12 3	2,743	0,994	7,848
w-xnazRNAiTRiP 12 4	1,733	0,605	4,375
w-xnazRNAiTRiP 13 1	1,76	0,736	3,986
w-xnazRNAiTRiP 13 2	1,802	0,792	4,255
w-xnazRNAiTRiP 14 1	3,217	1,229	8,618
w-xnazRNAiTRiP 14 2	1,705	0,751	3,933
w-xnazRNAiTRiP 15 1	1,318	0,553	2,924
w-xnazRNAiTRiP 15 2	1,583	0,608	4,149
w-xnazRNAiTRiP 16 1	2,681	1,171	6,154
w-xnazRNAiTRiP 17 1	2,039	0,748	5,38
w-xnazRNAiTRiP 17 2	3,138	1,15	7,762
w-xnazRNAiTRiP 18 1	1,856	0,817	3,962
w-xnazRNAiTRiP 18 2	2,569	0,857	5,866
w-xnazRNAiTRiP 18 3	2,126	0,783	6,346
w-xnazRNAiTRiP 19 1	2,351	0,95	5,534

w-xnazRNAiTRiP 19 2	2,487	0,865	6,085
w-xnazRNAiTRiP 20 1	2,306	0,958	4,533
w-xnazRNAiTRiP 20 2	2,978	1,242	6,361
w-xnazRNAiTRiP 20 3	2,281	0,879	4,948
w-xnazRNAiTRiP 21 1	2,393	1,003	5,545
w-xnazRNAiTRiP 21 2	2,117	0,95	5,027
w-xnazRNAiTRiP 21 3	2,833	1,312	6,307
w-xnazRNAiTRiP 23 1	2,47	1,105	6,064

Tabelle 23: Richtungsänderungsraten heterozygote *dicer*; *repo*-GAL4-Treiber Kontrolle

Test	Median	25 %	75 %
w-xdicerrepoG4 01 1	2,337	0,941	4,541
w-xdicerrepoG4 01 2	3,338	1,279	8,927
w-xdicerrepoG4 02 1	1,195	0,6	2,324
w-xdicerrepoG4 03 1	2,302	0,94	4,732
w-xdicerrepoG4 03 2	2,213	0,903	5,066
w-xdicerrepoG4 03 3	1,621	0,792	3,345
w-xdicerrepoG4 04 1	2,55	1,117	5,696
w-xdicerrepoG4 04 2	1,664	0,693	3,277
w-xdicerrepoG4 04 3	1,713	0,826	3,595
w-xdicerrepoG4 06 1	2,952	1,277	5,573
w-xdicerrepoG4 07 1	2,005	0,96	3,662
w-xdicerrepoG4 08 1	1,967	0,923	4,709
w-xdicerrepoG4 09 1	3,605	1,567	7,83
w-xdicerrepoG4 09 2	1,626	0,788	3,015
w-xdicerrepoG4 10 1	2,19	1,04	4,963
w-xdicerrepoG4 11 1	2,567	1,066	7,032
w-xdicerrepoG4 12 1	2,501	1,127	5,489
w-xdicerrepoG4 12 2	1,76	0,904	3,026
w-xdicerrepoG4 12 3	3,135	1,325	6,52
w-xdicerrepoG4 13 1	2,751	1,145	5,656
w-xdicerrepoG4 13 2	1,307	0,518	2,968
w-xdicerrepoG4 14 1	3,565	1,616	8,286
w-xdicerrepoG4 14 2	2,459	0,969	6,155
w-xdicerrepoG4 15 1	2,001	0,83	4,628
w-xdicerrepoG4 15 2	2,616	1,16	4,713
w-xdicerrepoG4 15 3	2,737	1,297	6,703
w-xdicerrepoG4 15 4	2,05	0,882	7,054
w-xdicerrepoG4 16 1	1,554	0,648	4,723
w-xdicerrepoG4 17 1	3,26	1,318	7,292
w-xdicerrepoG4 17 2	2,34	1,005	5,69
w-xdicerrepoG4 18 1	1,595	0,647	4,135
w-xdicerrepoG4 18 2	2,158	0,907	6,507
w-xdicerrepoG4 19 1	2,419	0,995	6,653
w-xdicerrepoG4 21 1	1,508	0,578	4,011
w-xdicerrepoG4 21 2	2,937	1,112	6,865

w-xdicerrepoG4 21 3	0,794	0,372	1,394
w-xdicerrepoG4 21 4	1,382	0,608	3,457
w-xdicerrepoG4 22 1	1,378	0,584	3,493
w-xdicerrepoG4 22 2	2,321	0,779	5,656
w-xdicerrepoG4 23 1	2,08	0,794	4,941
w-xdicerrepoG4 25 1	3,042	1,105	8,923
w-xdicerrepoG4 25 2	1,733	0,696	4,76
w-xdicerrepoG4 26 1	1,961	0,849	4,89
w-xdicerrepoG4 26 2	1,325	0,561	3,116
w-xdicerrepoG4 28 1	1,899	0,849	5,026

Tabelle 24: Richtungsänderungsraten WT nach 2h auf Instant Futtermedium

Test	Median	25 %	75 %
WT BF 01 1	1,829	0,805	4,764
WT BF 01 2	3,108	1,233	7,418
WT BF 01 3	2,884	1,119	6,899
WT BF 02 1	3,389	1,317	7,444
WT BF 03 1	1,063	0,476	1,857
WT BF 03 2	3,796	1,542	6,568
WT BF 03 3	1,787	0,775	3,735
WT BF 03 4	1,416	0,671	2,651
WT BF 04 1	3,349	1,207	6,487
WT BF 04 2	1,376	0,637	2,362
WT BF 04 3	3,83	1,49	9,141
WT BF 05 1	4,214	1,694	8,923
WT BF 05 2	2,851	1,31	5,403
WT BF 05 3	4,543	2,191	8,766
WT BF 06 1	2,549	1,024	5,646
WT BF 06 2	5,207	1,949	11,959
WT BF 06 3	4,59	1,998	10,008
WT BF 07 1	2,884	1,268	5,409
WT BF 07 2	2,453	1,065	4,675
WT BF 07 3	2,656	1,013	5,219

Tabelle 25: Richtungsänderungsraten WT 0,5 mg/ml Yohimbin

Test	Median	25 %	75 %
WT YH 0,5mg/ml 01 1	3,838	1,515	8,279
WT YH 0,5mg/ml 01 2	5,165	2,221	10,957
WT YH 0,5mg/ml 01 3	3,252	1,457	6,246
WT YH 0,5mg/ml 02 1	3,728	1,614	7,476
WT YH 0,5mg/ml 02 2	4,326	1,718	9,682
WT YH 0,5mg/ml 02 3	6,399	2,603	13,117
WT YH 0,5mg/ml 03 1	8,856	4,032	17,565
WT YH 0,5mg/ml 03 2	3,936	1,457	8,065
WT YH 0,5mg/ml 03 3	5,047	2,186	10,482
WT YH 0,5mg/ml 04 1	3,973	1,85	8,127

WT YH 0,5mg/ml 04 2	6,464	2,788	12,796
WT YH 0,5mg/ml 04 3	6,287	2,699	11,373
WT YH 0,5mg/ml 04 4	4,534	1,703	9,212
WT YH 0,5mg/ml 05 1	3,511	1,495	7,556
WT YH 0,5mg/ml 05 2	3,848	1,58	8,375
WT YH 0,5mg/ml 05 3	5,351	2,199	10,773
WT YH 0,5mg/ml 06 1	4,72	1,958	10,65
WT YH 0,5mg/ml 06 2	6,016	2,545	10,682
WT YH 0,5mg/ml 06 3	2,77	1,27	5,902
WT YH 0,5mg/ml 06 4	3,741	1,418	7,902
WT YH 0,5mg/ml 07 1	4,36	1,797	9,122
WT YH 0,5mg/ml 07 2	10,742	4,416	21,949
WT YH 0,5mg/ml 07 3	3,282	1,219	7,072

Tabelle 26: Richtungsänderungsraten WT 1,0 mg/ml Yohimbin

Test	Median	25 %	75 %
WT YH 1mg/ml 01 1	3,346	1,296	6,176
WT YH 1mg/ml 01 2	4,901	2,206	8,529
WT YH 1mg/ml 01 3	4,867	2,416	9,945
WT YH 1mg/ml 01 4	5,333	2,629	10,414
WT YH 1mg/ml 02 1	4,902	2,071	9,814
WT YH 1mg/ml 03 1	3,816	1,558	8,369
WT YH 1mg/ml 04 1	4,814	2,036	8,998
WT YH 1mg/ml 04 2	9,078	4,047	17,483
WT YH 1mg/ml 04 3	4,138	1,602	8,305
WT YH 1mg/ml 05 1	3,215	1,478	5,678
WT YH 1mg/ml 05 2	4,908	2,269	10,035
WT YH 1mg/ml 05 3	3,451	1,427	7,269
WT YH 1mg/ml 06 1	3,458	1,48	7,479
WT YH 1mg/ml 06 2	5,468	2,076	10,26
WT YH 1mg/ml 06 3	4,229	1,744	8,257
WT YH 1mg/ml 06 4	5,817	2,547	10,099
WT YH 1mg/ml 07 1	10,191	3,377	23,495
WT YH 1mg/ml 07 2	3,452	1,433	6,797

Tabelle 27: Richtungsänderungsraten WT 1,5 mg/ml Yohimbin

Test	Median	25 %	75 %
WT YH 1,5mg/ml 01 1	4,738	2,111	8,948
WT YH 1,5mg/ml 01 2	3,298	1,226	8,638
WT YH 1,5mg/ml 01 3	4,96	2,086	10,723
WT YH 1,5mg/ml 01 4	5,027	1,888	9,696
WT YH 1,5mg/ml 02 1	2,682	1,042	6,15
WT YH 1,5mg/ml 02 2	5,128	2,367	10,232
WT YH 1,5mg/ml 02 3	6,112	2,549	11,977
WT YH 1,5mg/ml 02 4	3,935	1,844	8,143

WT YH 1,5mg/ml 03 1	5,154	2,167	10,637
WT YH 1,5mg/ml 03 2	6,241	3,199	11,104
WT YH 1,5mg/ml 03 3	6,473	2,767	11,702
WT YH 1,5mg/ml 04 1	7,734	3,264	14,776
WT YH 1,5mg/ml 04 2	2,288	0,951	5,027
WT YH 1,5mg/ml 04 4	9,072	3,783	20,03
WT YH 1,5mg/ml 05 1	3,663	1,493	7,041
WT YH 1,5mg/ml 05 2	4,365	1,835	7,857
WT YH 1,5mg/ml 05 3	7,76	3,61	16,597
WT YH 1,5mg/ml 06 1	2,822	1,373	6,009
WT YH 1,5mg/ml 06 2	4,885	2,25	10,537
WT YH 1,5mg/ml 06 3	5,239	2,337	11,945
WT YH 1,5mg/ml 07 1	2,861	1,15	6,291
WT YH 1,5mg/ml 07 2	7,211	2,96	14,97

Tabelle 28: Richtungsänderungsraten WT 3,0 mg/ml Yohimbin

Test	Median	25 %	75 %
WT YH 3mg/ml 01 1	9,593	3,795	19,401
WT YH 3mg/ml 01 2	7,163	3,224	14,359
WT YH 3mg/ml 02 1	8,284	3,72	19,731
WT YH 3mg/ml 02 2	6,768	3,335	13,113
WT YH 3mg/ml 02 3	10,491	4,174	25,45
WT YH 3mg/ml 03 1	4,06	1,807	8,692
WT YH 3mg/ml 03 2	7,152	2,981	13,088
WT YH 3mg/ml 04 1	6,7	3,009	12,94
WT YH 3mg/ml 05 1	5,449	2,353	10,249
WT YH 3mg/ml 05 2	5,366	2,585	10,823
WT YH 3mg/ml 05 3	5,499	2,329	10,184
WT YH 3mg/ml 06 1	5,724	2,388	12,446
WT YH 3mg/ml 06 2	6,395	2,441	12,156
WT YH 3mg/ml 06 3	4,496	2,029	8,45
WT YH 3mg/ml 07 1	5,76	2,509	10,871
WT YH 3mg/ml 07 2	5,522	2,832	10,529

Tabelle 29: Richtungsänderungsraten *naz*-RNAi TRiP 0,5 mg/ml Yohimbin

Test	Median	25 %	75 %
<i>naz</i> RNAiTRiPNFYH 0,5mg 01 1	2,751	1,335	4,748
<i>naz</i> RNAiTRiPNFYH 0,5mg 01 2	4,164	1,878	8,606
<i>naz</i> RNAiTRiPNFYH 0,5mg 01 3	2,347	1,043	4,545
<i>naz</i> RNAiTRiPNFYH 0,5mg 02 1	3,523	1,676	6,142
<i>naz</i> RNAiTRiPNFYH 0,5mg 02 2	4,248	1,825	8,242
<i>naz</i> RNAiTRiPNFYH 0,5mg 03 1	3,242	1,257	6,58
<i>naz</i> RNAiTRiPNFYH 0,5mg 03 2	3,713	1,674	7,197
<i>naz</i> RNAiTRiPNFYH 0,5mg 04 1	3	1,351	5,785
<i>naz</i> RNAiTRiPNFYH 0,5mg 04 2	2,107	0,965	3,75
<i>naz</i> RNAiTRiPNFYH 0,5mg 04 3	3,304	1,371	6,719

nazRNAiTRiPNFYH 0,5mg 04 4	6,144	2,542	12,791
nazRNAiTRiPNFYH 0,5mg 05 1	3,677	1,672	7,229
nazRNAiTRiPNFYH 0,5mg 05 2	3,189	1,571	5,992
nazRNAiTRiPNFYH 0,5mg 05 3	3,872	1,743	8,753
nazRNAiTRiPNFYH 0,5mg 06 1	3,681	1,748	6,729
nazRNAiTRiPNFYH 0,5mg 06 2	4,068	1,714	9,164
nazRNAiTRiPNFYH 0,5mg 06 3	3,817	1,709	7,631
nazRNAiTRiPNFYH 0,5mg 07 1	3,621	1,496	7,371
nazRNAiTRiPNFYH 0,5mg 07 2	4,218	1,744	9,08
nazRNAiTRiPNFYH 0,5mg 07 3	4,858	2,058	12,218
nazRNAiTRiPNFYH 0,5mg 08 1	3,364	1,591	5,746
nazRNAiTRiPNFYH 0,5mg 08 1	6,17	2,497	13,84
nazRNAiTRiPNFYH 0,5mg 09 1	5,149	2,074	12,374

Tabelle 30: Richtungsänderungsraten *nazgu*^{Δ1-36} 0,5 mg/ml Yohimbin

Test	Median	25 %	75 %
1-36 post 01 1	2,664	1,024	5,707
1-36 post 01 2	2,923	1,283	5,506
1-36 post 02 1	2,19	0,974	4,31
1-36 post 03 1	2,343	1,001	4,941
1-36 post 03 2	3,735	1,396	7,566
1-36 post 04 1	2,45	1,023	4,554
1-36 post 05 1	3,9	1,761	6,8
1-36 post 05 2	4,479	1,806	9,705
1-36 post 06 1	6,002	2,432	12,453
1-36 post 06 2	13,345	4,951	31,651
1-36 post 07 1	5,446	2,25	10,683
1-36 post 08 1	3,464	1,638	6,537
1-36 post 09 1	4,957	2,064	8,352
1-36 post 10 1	6,736	2,759	13,77

Tabelle 31: Richtungsänderungsraten WT 4 mg/ml Tyramin

Test	Median	25 %	75 %
WT TA 01 1	3,554	1,442	7,651
WT TA 01 2	3,87	1,692	9,144
WT TA 01 3	2,986	1,36	7,748
WT TA 02 1	3,763	1,504	9,578
WT TA 02 2	4,758	1,768	10,666
WT TA 02 3	4,142	1,642	9,738
WT TA 02 4	3,414	1,07	9,154
WT TA 03 1	4,215	1,728	9,049
WT TA 03 2	4,489	1,625	13,355
WT TA 04 1	4,563	1,979	10,034
WT TA 04 2	2,644	1,14	6,48
WT TA 04 3	2,483	1,02	5,264
WT TA 05 1	3,943	1,541	9,485

WT TA 05 2	3,235	1,374	7,229
WT TA 05 3	3,65	1,294	8,922
WT TA 05 4	4,3	1,437	11,038
WT TA 06 1	5,406	2,148	11,652
WT TA 06 2	3,997	1,545	9,362
WT TA 06 3	3,71	1,586	8,23
WT TA 06 4	3,142	1,256	8,819

Tabelle 32: Richtungsänderungsraten WT 0,1 mg/ml Tranylcypromin

Test	Median	25 %	75 %
WT TC 0,1mg/ml 01 1	3,594	1,585	8,262
WT TC 0,1mg/ml 01 2	1,9	0,8	3,305
WT TC 0,1mg/ml 02 1	4,67	1,725	9,795
WT TC 0,1mg/ml 03 1	1,019	0,491	1,893
WT TC 0,1mg/ml 06 1	1,44	0,628	2,499
WT TC 0,1mg/ml 06 2	3,567	1,65	7,566
WT TC 0,1mg/ml 08 1	5,504	2,483	12,681
WT TC 0,1mg/ml 08 2	4,978	2,443	9,808
WT TC 0,1mg/ml 08 3	5,161	2,223	10,61
WT TC 0,1mg/ml 08 4	4,003	1,59	8,585
WT TC 0,1mg/ml 09 1	3,468	1,554	8,433
WT TC 0,1mg/ml 09 2	4,778	1,927	10,188
WT TC 0,1mg/ml 09 3	4,351	1,812	9,12
WT TC 0,1mg/ml 10 1	1,982	0,853	3,996
WT TC 0,1mg/ml 10 2	4,289	1,866	8,013
WT TC 0,1mg/ml 12 1	1,459	0,641	3,649
WT TC 0,1mg/ml 12 2	5,47	2,267	12,041
WT TC 0,1mg/ml 12 3	2,933	1,165	6,071
WT TC 0,1mg/ml 13 1	3,789	1,633	7,908
WT TC 0,1mg/ml 13 2	1,752	0,792	3,632
WT TC 0,1mg/ml 13 3	3,24	1,385	6,954
WT TC 0,1mg/ml 14 1	1,602	0,716	3,14
WT TC 0,1mg/ml 14 2	1,957	0,982	3,523
WT TC 0,1mg/ml 14 3	2	0,957	3,798
WT TC 0,1mg/ml 15 1	2,656	1,107	5,425
WT TC 0,1mg/ml 15 2	3,359	1,42	6,5
WT TC 0,1mg/ml 16 1	2,496	1,045	4,983
WT TC 0,1mg/ml 16 2	2,094	0,979	3,83

Tabelle 33: Richtungsänderungsraten WT 0,5 mg/ml Tranylcypromin

Test	Median	25 %	75 %
WT TC 0,5mg/ml 01 1	4,487	1,895	10,503
WT TC 0,5mg/ml 01 2	3,419	1,524	7,013
WT TC 0,5mg/ml 01 3	3,647	1,697	8,078
WT TC 0,5mg/ml 01 4	4,641	2,294	9,171
WT TC 0,5mg/ml 02 1	2,724	1,063	5,337

WT TC 0,5mg/ml 02 2	4,059	1,651	8,964
WT TC 0,5mg/ml 02 3	3,561	1,548	10,56
WT TC 0,5mg/ml 02 4	3,994	1,886	7,244
WT TC 0,5mg/ml 03 1	3,321	1,439	6,367
WT TC 0,5mg/ml 03 2	3,471	1,563	6,55
WT TC 0,5mg/ml 03 3	7,423	3,173	18,706
WT TC 0,5mg/ml 03 4	4,065	1,87	7,689
WT TC 0,5mg/ml 04 1	4,291	2,044	8,269
WT TC 0,5mg/ml 04 2	3,326	1,596	6,583
WT TC 0,5mg/ml 05 1	2,86	1,232	6,523
WT TC 0,5mg/ml 05 2	4,461	1,969	10,228
WT TC 0,5mg/ml 05 3	4,164	1,597	9,827
WT TC 0,5mg/ml 05 4	3,553	1,525	8,505
WT TC 0,5mg/ml 06 1	3,423	1,252	7,101
WT TC 0,5mg/ml 06 2	3,422	1,585	5,782
WT TC 0,5mg/ml 06 3	2,811	1,244	5,795
WT TC 0,5mg/ml 07 1	3,512	1,42	8,524
WT TC 0,5mg/ml 07 2	4,398	1,87	8,615
WT TC 0,5mg/ml 07 3	2,844	1,231	6,024
WT TC 0,5mg/ml 07 4	4,963	2,112	10,611

Tabelle 34: Richtungsänderungsraten WT 1,0 mg/ml Tranylcypromin

Test	Median	25 %	75 %
WT TC 1mg/ml 01 1	4,267	1,791	8,537
WT TC 1mg/ml 01 2	6,773	2,719	12,77
WT TC 1mg/ml 02 1	1,801	0,934	3,075
WT TC 1mg/ml 02 2	2,382	1,044	4,487
WT TC 1mg/ml 05 1	3,541	1,548	7,699
WT TC 1mg/ml 05 2	1,78	0,912	3,274
WT TC 1mg/ml 06 1	5,273	2,465	11,469
WT TC 1mg/ml 06 2	2,897	1,421	5,598
WT TC 1mg/ml 07 1	3,18	1,459	5,272
WT TC 1mg/ml 07 2	4,904	2,005	9,09
WT TC 1mg/ml 08 1	2,326	0,975	4,243

Tabelle 35: Richtungsänderungsraten WT 2,0 mg/ml Tranylcypromin

Test	Median	25 %	75 %
WT TC 2mg/ml 01 1	2,27	1,076	4,268
WT TC 2mg/ml 02 1	3,255	1,281	6,159
WT TC 2mg/ml 02 2	2,17	1,111	4,411
WT TC 2mg/ml 04 1	2,377	0,855	4,535
WT TC 2mg/ml 07 1	3,134	1,266	6,821
WT TC 2mg/ml 07 2	3,134	1,266	6,821
WT TC 2mg/ml 10 1	3,304	1,402	6,567
WT TC 2mg/ml 10 2	3,393	1,476	6,606
WT TC 2mg/ml 10 3	2,696	1,285	4,68

WT TC 2mg/ml 11 1	2,351	0,921	4,597
WT TC 2mg/ml 11 2	2,843	1,37	5,35
WT TC 2mg/ml 11 3	2,869	1,27	5,992
WT TC 2mg/ml 11 4	1,895	0,904	3,923
WT TC 2mg/ml 12 1	2,692	1,173	5,253
WT TC 2mg/ml 12 2	3,534	1,635	7,121
WT TC 2mg/ml 12 3	2,881	1,402	5,239

Tabelle 36: Richtungsänderungsraten *Eaat1*-RNAi

Test	Median	25 %	75 %
CG3747 RNAi 01-1	7,114	2,375	15,409
CG3747 RNAi 02-1	6,349	1,988	15,638
CG3747 RNAi 03-1	2,038	0,834	4,559
CG3747 RNAi 04-1	10,214	3,727	23,453
CG3747 RNAi 01-2	2,694	1,038	9,009
CG3747 RNAi 02-2	5,583	1,665	16,963
CG3747 RNAi 03-2	9,602	3,258	26,693
CG3747 RNAi 04-2	7,064	3,02	15,554
CG3747 RNAi 01-3	8,364	2,957	19,548
CG3747 RNAi 02-3	2,861	1,22	6,84
CG3747 RNAi 03-3	5,487	2,199	16,437
CG3747 RNAi 04-3	7,305	2,462	18,965
CG3747 RNAi 01-4	7,407	3,07	16,426
CG3747 RNAi 02-4	9,858	3,677	17,962
CG3747 RNAi 03-4	8,113	3,19	18,917
CG3747 RNAi 01-5	7,4	2,839	21,631
CG3747 RNAi 02-5	3,863	1,571	9,798
CG3747 RNAi 03-5	6,092	2,27	15,165
CG3747 RNAi 04-5	7,663	3,071	20,084
CG3747 RNAi 01-6	4,83	1,845	10,105
CG3747 RNAi 02-6	7,759	2,521	24,225
CG3747 RNAi 03-6	11,6	3,592	34,663
CG3747 RNAi 04-6	3,867	1,457	10,426
CG3747 RNAi 01-7	6,074	2,503	13,882
CG3747 RNAi 02-7	6,275	2,572	15,411
CG3747 RNAi 03-7	4,717	1,789	11,877
CG3747 RNAi 04-7	7,265	2,901	18,334

Tabelle 37: Richtungsänderungsraten heterozygote *Eaat1*-RNAi Kontrolle

Test	Median	25 %	75 %
w-xEAAT1RNAiKK 01 1	1,601	0,729	3,796
w-xEAAT1RNAiKK 01 2	5,258	2,335	11,698
w-xEAAT1RNAiKK 02 1	3,079	1,263	7,087
w-xEAAT1RNAiKK 02 2	2,515	0,993	6,654
w-xEAAT1RNAiKK 02 3	2,434	1,068	6,366
w-xEAAT1RNAiKK 03 1	2,517	0,829	6,772

w-xEAAT1RNAiKK 03 2	1,845	0,841	5,341
w-xEAAT1RNAiKK 04 1	2,425	1,047	4,598
w-xEAAT1RNAiKK 04 2	2,201	0,872	5,631
w-xEAAT1RNAiKK 05 1	2,418	0,947	5,419
w-xEAAT1RNAiKK 06 1	1,847	0,856	4,493
w-xEAAT1RNAiKK 06 2	2,035	0,862	4,62
w-xEAAT1RNAiKK 07 1	2,789	1,082	7,28
w-xEAAT1RNAiKK 09 1	2,375	0,987	5,32
w-xEAAT1RNAiKK 09 2	2,2	0,911	6,002
w-xEAAT1RNAiKK 10 1	3,724	1,461	8,871
w-xEAAT1RNAiKK 10 2	2,512	0,934	7,538
w-xEAAT1RNAiKK 11 1	1,959	0,861	4,935
w-xEAAT1RNAiKK 11 2	2,22	0,873	5,358

Tabelle 38: Richtungsänderungsraten heterozygote *Eaat1*-GAL4 Kontrolle

Test	Median	25 %	75 %
w-xEAAT1GAL4 01 1	2,301	1,058	4,885
w-xEAAT1GAL4 01 3	2,265	0,74	5,671
w-xEAAT1GAL4 02 1	1,845	0,779	4,317
w-xEAAT1GAL4 03 1	2,127	0,786	4,51
w-xEAAT1GAL4 04 1	2,279	0,821	8,037
w-xEAAT1GAL4 05 1	4,216	1,658	9,696
w-xEAAT1GAL4 05 2	1,154	0,491	2,397
w-xEAAT1GAL4 05 3	1,79	0,675	4,114
w-xEAAT1GAL4 05 4	1,714	0,692	3,918
w-xEAAT1GAL4 06 1	1,33	0,592	3,286
w-xEAAT1GAL4 06 2	1,279	0,543	3,724
w-xEAAT1GAL4 06 3	1,127	0,462	3,475
w-xEAAT1GAL4 06 4	1,206	0,483	3,951
w-xEAAT1GAL4 07 1	1,064	0,476	2,702
w-xEAAT1GAL4 07 2	2,057	0,764	5,342
w-xEAAT1GAL4 07 3	2,96	1,308	6,553
w-xEAAT1GAL4 09 1	1,946	0,908	4,664
w-xEAAT1GAL4 09 2	2,51	0,969	6,01
w-xEAAT1GAL4 10 1	3,089	1,287	7,114
w-xEAAT1GAL4 10 2	2,102	0,842	5,199
w-xEAAT1GAL4 10 3	2,432	0,929	5,958

Tabelle 39: Richtungsänderungsraten *Eaat2*-RNAi

Test	Median	25 %	75 %
CG3159 RNAi 01-1	2,049	0,785	5,008
CG3159 RNAi 02-1	2,373	0,911	5,05
CG3159 RNAi 01-2	3,386	1,406	9,013
CG3159 RNAi 02-2	2,102	0,971	4,861
CG3159 RNAi 03-2	2,767	1,192	6,796
CG3159 RNAi 04-2	2,942	1,197	8,225

CG3159 RNAi 01-3	4,417	1,793	10,248
CG3159 RNAi 02-3	2,804	1,143	8,271
CG3159 RNAi 01-4	1,431	0,521	3,561
CG3159 RNAi 01-5	0,792	0	2,006
CG3159 RNAi 02-5	2,117	1,02	4,748
CG3159 RNAi 03-5	4,228	1,678	10,241

Tabelle 40: Richtungsänderungsraten *hoe2*-RNAi

Test	Median	25 %	75 %
CG 15624 RNAi 01-1	3,733	1,349	10,368
CG 15624 RNAi 02-1	3,382	1,36	7,44
CG 15624 RNAi 03-1	5,871	2,264	13,448
CG 15624 RNAi 01-2	3,223	1,223	8,109
CG 15624 RNAi 02-2	1,293	0,61	2,846
CG 15624 RNAi 03-2	2,297	0,985	6,523
CG 15624 RNAi 01-3	1,349	0,599	2,65
CG 15624 RNAi 01-4	2,868	1,094	7,216
CG 15624 RNAi 02-4	3,917	1,242	11,207
CG 15624 RNAi 03-4	2,568	0,965	6,373
CG 15624 RNAi 01-5	4,795	1,801	9,204
CG 15624 RNAi 02-5	4,013	1,606	9,369
CG 15624 RNAi 03-5	1,982	0,869	4,117

Tabelle 41:: Richtungsänderungsraten *CG5549*-RNAi

Test	Median	25 %	75 %
CG5549 RNAi-01-1	3,382	1,21	8,958
CG5549 RNAi-02-1	3,265	1,141	9,4
CG5549 RNAi-03-1	2,148	0,884	4,732
CG5549 RNAi-04-1	2,248	1,042	4,045
CG5549 RNAi-01-2	2,883	1,197	6,756
CG5549 RNAi-02-2	3,041	1,161	7,467
CG5549 RNAi-03-2	2,402	0,992	5,976
CG5549 RNAi-04-2	4,239	1,865	8,754
CG5549 RNAi 01-3	4,751	1,568	10,864
CG5549 RNAi 02-3	4,698	1,7	12,229
CG5549 RNAi 03-3	3,009	1,221	9,005
CG5549 RNAi 04-3	1,664	0,713	3,692
CG5549 RNAi 01-4	4,146	1,704	9,88
CG5549 RNAi 02-4	5,173	2,35	11,087
CG5549 RNAi 03-4	3,457	1,494	7,502
CG5549 RNAi 04-4	4,332	1,596	9,379
CG5549 RNAi 01-5	2,282	0,838	7,339
CG5549 RNAi 02-5	2,767	1,035	7,424
CG5549 RNAi 03-5	4,82	1,812	10,306
CG5549 RNAi 04-5	2,868	1,134	7,179
CG5549 RNAi 01-6	1,677	0,714	3,994

CG5549 RNAi 02-6	4,871	1,877	12,318
CG5549 RNAi 03-6	1,232	0,506	3,286
CG5549 RNAi 04-6	1,013	0,422	2,409

Tabelle 42: Richtungsänderungsraten *CG7708*-RNAi

Test	Median	25 %	75 %
CG7708 RNAi 01-1	3,596	1,674	7,549
CG7708 RNAi 02-1	2,718	1,064	7,113
CG7708 RNAi 01-2	2,02	0,827	5,459
CG7708 RNAi 02-3	2,148	0,892	3,995
CG7708 RNAi 01-4	2,033	0,813	4,178
CG7708 RNAi 04-4	3,538	1,414	10,187
CG7708 RNAi 01-5	2,708	0,972	6,055
CG7708 RNAi 02-5	3,348	1,49	8,098
CG7708 RNAi 01-6	2,275	1,055	5,242

Tabelle 43: Richtungsänderungsraten *Eaat1*-RNAi 0,5mg/ml Yohimbin

Test	Median	25 %	75 %
CG3747 RNAi YH 01-1	23,81	9,371	55,76
CG3747 RNAi YH 02-1	23,009	9,193	54,559
CG3747 RNAi YH 03-1	10,433	4,351	24,565
CG3747 RNAi YH 01-2	3,854	1,889	7,447
CG3747 RNAi YH 01-2	14,807	4,118	46,248
CG3747 RNAi YH 03-2	14,832	6,132	35,182
CG3747 RNAi YH 04-2	11,51	4,459	27,421
CG3747 RNAi YH 01-3	7,104	2,625	17,106
CG3747 RNAi YH 02-3	9,993	3,677	22,854
CG3747 RNAi YH 03-3	7,995	3,523	21,792
CG3747 RNAi YH 04-3	15,952	3,884	52,525
CG3747 RNAi YH 01-4	6,874	2,951	11,855
CG3747 RNAi YH 02-4	72,825	21,126	147,876
CG3747 RNAi YH 03-4	26,168	7,34	89,671
CG3747 RNAi YH 04-4	3,479	1,637	7,385
CG3747 RNAi YH 01-5	15,349	4,104	53,897
CG3747 RNAi YH 02-5	8,535	2,916	19,865
CG3747 RNAi YH 03-5	7,965	2,97	17,139
CG3747 RNAi YH 04-5	13,012	5,235	27,2
CG3747 RNAi YH 01-6	13,349	4,017	52,72
CG3747 RNAi YH 02-6	19,563	2,356	60,376
CG3747 RNAi YH 03-6	6,404	2,963	13,827
CG3747 RNAi YH 01-7	8,017	3,186	17,026
CG3747 RNAi YH 02-7	2,865	1,383	5,602
CG3747 RNAi YH 03-7	4,93	1,811	12,297
CG3747 RNAi YH 04-7	3,447	1,195	7,228
CG3747 RNAi YH 01-8	8,129	3,125	15,81
CG3747 RNAi YH 02-8	7,888	2,916	16,791

CG3747 RNAi YH 03-8	14,432	6,366	31,247
CG3747 RNAi YH 01-9	3,192	1,43	6,109
CG3747 RNAi YH 02-9	2,892	1,276	5,994
CG3747 RNAi YH 03-9	9,885	1,847	36,057
CG3747 RNAi YH 04-9	6,962	2,701	16,125
CG3747 RNAi YH 01-10	4,266	1,684	9,429
CG3747 RNAi YH 02-10	5,796	2,702	11,673
CG3747 RNAi YH 03-10	13,504	5,721	31,179
CG3747 RNAi YH 04-10	16,989	5,911	35,191

Tabelle 44: *Stop Turns*

<i>nazgul</i> ^{A1-36}	WT	<i>Eaat1</i> -RNAi	<i>Eaat1</i> -RNAi YH	<i>nazgul</i> ^{A1-36} YH
21	7	12	7	9
15	4	14	4	6
10	4	15	14	8
20	26	3	4	7
11	9	9	7	4
22	5	5	7	4
20	9	10	4	2
18	12	13	5	0
18	9	6	3	7
14	6	10	0	7
13	15	8	2	9
20	20	12	7	8
17	4	15	0	3
19	12	13	12	8
20	12	17	7	13
14	9	9	4	
21	10	8	2	
20	18	8	6	
17	8	14	1	
28	9	11	8	
17	12	5	6	
12	7	8	5	
13	4	9	2	
21	0	11	12	
15	15	14	11	
12	14	10	14	
14	4	11	2	
15	3	11	6	
16	5		0	
13	2		4	
16	4		4	
15	9		3	
18	11		5	
17	5		10	
5	5			
15	8			
	6			
	10			
	5			
	2			
	3			
	5			

7.6 Sequenzierungen

7.6.1 Sequenzierung der *nazgul*^{Δ1-17} mRNA

NazgulΔ1-17	1	-----	0
Flybase	1	TTCAGTTTTTCGTTCAACATTTGTGTCTGCGAGACCCAGTCACAGATTTCAT	50
NazgulΔ1-17	1	-----	0
Flybase	51	TCATCGATTGCGAGGGGAAGAAAGTGAGGCAGGACCTAACGCGCACCCAGT	100
NazgulΔ1-17	1	-----ATGGAACGATTGCTGACCATGTTCTGA	26
Flybase	101	AGCATCCAAAGCATACTCAAGGATGGAACGATTGCTGACCATGTTCTGA	150
NazgulΔ1-17	27	GGAGGCGGATCCCTTCGCCACGTGGTGGCCACGATAGCGGCCCTCACGG	76
Flybase	151	GGAGGCGGATCCCTTCGCCACGTGGTGGCCACGATAGCGGCCCTCACGG	200
NazgulΔ1-17	77	TGGGCATTGTGATTACGGTGCAGACCTTAATGAGCGGCCAGCGCTGTCCG	126
Flybase	201	TGGGCATTGTGATTACGGTGCAGACCTTAATGAGCGGCCAGCGCTGTCCG	250
NazgulΔ1-17	127	AACGATAATCAAATCAAGGAGCAAATCGTGGTGGTACCAGCGGCAACAG	176
Flybase	251	AACGATAATCAAATCAAGGAGCAAATCGTGGTGGTACCAGCGGCAACAG	300
NazgulΔ1-17	177	CGGCATTGGCTTCGAAATAGCCAGGCTCTGGCTGGCCGAGGTGGCCGGA	226
Flybase	301	CGGCATTGGCTTCGAAATAGCCAGGCTCTGGCTGGCCGAGGTGGCCGGA	350
NazgulΔ1-17	227	TAATCCTCGCCTGCCGCAATCTCGAGGCCGGGAAGCGGGCGGCCATA	276
Flybase	351	TAATCCTCGCCTGCCGCAATCTCGAGGCCGGGAAGCGGGCGGCCATA	400
NazgulΔ1-17	277	ATCAAACGTGAGCTGGGCTGCCGCACACCCTGAATTCCTTGGATGAGGA	326
Flybase	401	ATCAAACGTGAGCTGGGCTGCCGCACACCCTGAATTCCTTGGATGAGGA	450
NazgulΔ1-17	327	TCGCAATCCGGAGGACAGGTACTTCGTGGAGGCACGCTACTTGGACCTCT	376
Flybase	451	TCGCAATCCGGAGGACAGGTACTTCGTGGAGGCACGCTACTTGGACCTCT	500
NazgulΔ1-17	377	GTTTCGCTGCGCAGTGTCCATCACTTTGCCGGCCAGCTGATGGCGGAATTC	426
Flybase	501	GTTTCGCTGCGCAGTGTCCATCACTTTGCCGGCCAGCTGATGGCGGAATTC	550
NazgulΔ1-17	427	GAGCGGAACGATGTGCTGGTGAACAATGCCGGAGTGGTATTCGCCAACAC	476
Flybase	551	GAGCGGAACGATGTGCTGGTGAACAATGCCGGAGTGGTATTCGCCAACAC	600
NazgulΔ1-17	477	TCAGATGCCACCGAGGATGGCTTCGAACGGCACAGCCAGGTGAACATATC	526
Flybase	601	TCAGATGCCACCGAGGATGGCTTCGAACGGCACAGCCAGGTGAACATATC	650
NazgulΔ1-17	527	TGGCCCCCTTCCTGTTGACCCACCTGCTCCTGCCACACTTGCAACGCTCG	576
Flybase	651	TGGCCCCCTTCCTGTTGACCCACCTGCTCCTGCCACACTTGCAACGCTCG	700
NazgulΔ1-17	577	GAGCAAGGACGCATCCTCTTCGTTTCCGCCATGCCCATCAGGGCGCCAA	626
Flybase	701	GAGCAAGGACGCATCCTCTTCGTTTCCGCCATGCCCATCAGGGCGCCAA	750
NazgulΔ1-17	627	AATCGATTTTCGACGATCCCTGAATGTGGCACCTGGTCGGTGAAGTTCC	676
Flybase	751	AATCGATTTTCGACGATCCCTGAATGTGGCACCTGGTCGGTGAAGTTCC	800
NazgulΔ1-17	677	ACGCCCGGAAGCATTGCCCCTCAAGCTCTGCGTGTCTCTTGCCACC	726
Flybase	801	ACGCCCGGAAGCATTGCCCCTCAAGCTCTGCGTGTCTCTTGCCACC	850
NazgulΔ1-17	727	CGTTGGATGGCCAGGGAACGAAAGGTACCTCGGTACGGTCAACTGCTG	776
Flybase	851	CGTTGGATGGCCAGGGAACGAAAGGTACCTCGGTACGGTCAACTGCTG	900
NazgulΔ1-17	777	TACGCCAGGACTCGTCCGTGGAACCCGCCATTTTCGCAACTCGCCGCTGA	826
Flybase	901	TACGCCAGGACTCGTCCGTGGAACCCGCCATTTTCGCAACTCGCCGCTGA	950
NazgulΔ1-17	827	TGTCGTCCCTCTGCGTGAAGGCGGTACCTATCCGTGGATGTGGCTGTTT	876
Flybase	951	TGTCGTCCCTCTGCGTGAAGGCGGTACCTATCCGTGGATGTGGCTGTTT	1000

NazgulΔ1-17	877	ATGAAGAATGCCTACGAGGGCGCCCAGTGCGCCATCCGCTTGGCCACCGA	926
Flybase	1001	ATGAAGAATGCCTACGAGGGCGCCCAGTGCGCCATCCGCTTGGCCACCGA	1050
NazgulΔ1-17	927	TCCCCAGCTGAAGGAAGTCACCGGCGAGTACTTCAATGATTGCGAAATTG	976
Flybase	1051	TCCCCAGCTGAAGGAAGTCACCGGCGAGTACTTCAATGATTGCGAAATTG	1100
NazgulΔ1-17	977	CGGCAAGTTCGGTGACGGGCCAAGACAAGGAGTTGGCCAAGAAGCTGTAT	1026
Flybase	1101	CGGCAAGTTCGGTGACGGGCCAAGACAAGGAGTTGGCCAAGAAGCTGTAT	1150
NazgulΔ1-17	1027	ATGCAAACCATAAAAAACCCTCGAAAGCGTTACCAAGCTAACCGTCGACAG	1076
Flybase	1151	ATGCAAACCATAAAAAACCCTCGAAAGCGTTACCAAGCTAACCGTCGACAG	1200
NazgulΔ1-17	1077	GGAGGAGTACGGCTTGGATTGTCAGCTGGAGATGGAGTCTGAGCTGAGGC	1126
Flybase	1201	GGAGGAGTACGGCTTGGATTGTCAGCTGGAGATGGAGTCTGAGCTGAGGC	1250
NazgulΔ1-17	1127	TGGAGGAACCGGCGGAAGCGGAACCGGAAACGAAACGAACCAGGCAGCG	1176
Flybase	1251	TGGAGGAACCGGCGGAAGCGGAACCGGAAACGAAACGAACCAGGCAGCG	1300
NazgulΔ1-17	1177	GATGAAAAGAAGTGGCAGGGGAATGGTGAGACGAAGCAGCCGT-----	1219
Flybase	1301	GATGAAAAGAAGTGGCAGGGGAATGGTGAGACGAAGCAGCCGTAGTCATT	1350
NazgulΔ1-17	1220	-----	1219
Flybase	1351	GGAGTGATTTATGCCTGGCACGGCCCGAGTTCCTTGGAGACTGCCAAC	1400
NazgulΔ1-17	1220	-----	1219
Flybase	1401	TGCAACGTCTATTTGCATTTCGGTTTAAACAATTGCCGATTAGGCAGCCTC	1450
NazgulΔ1-17	1220	-----	1219
Flybase	1451	CCCTCGCCACCTCCCCCTCCCCCTCCCGCCATTTTATGTGGACCCCT	1500
NazgulΔ1-17	1220	-----	1219
Flybase	1501	GACTTTGTGGGGCTTCCCCGTTTTTCGCCGGAATAAATGCAACTTTAAT	1550
NazgulΔ1-17	1220	-----	1219
Flybase	1551	GTGCGAGCAGCCTG	1564

7.6.2 Sequenzierung 1 der *nazgul*^{Δ2-11} mRNA

Flybase	74	GGCAGGACCTAACGCGCACCCAGTAGCATCCAAGCATACTCAAGGATGGAACGATTG	133
NazgulΔ2-11	48	GGCAGGACCTAACGCGCACCCAGTAGCATCCAAGCATACTCAAGGATGGAACGATTG	107
Flybase	134	CTGACCATGTTTCGAGGAGGCGGATCCCTTCGCCACGTGGTGGCCACGATAGCGGCCCTC	193
NazgulΔ2-11	108	CTGACCATGTTTCGAGGAGGCGGATCCCTTCGCCACGTGGTGGCCACGATAGCGGCCCTC	167
Flybase	194	ACGGTGGGCATTGTGATTACGGTGCAGACCTTAATGAGCGGCCAGCGCTGTCCGAACGAT	253
NazgulΔ2-11	168	ACGGTGGGCATTGTGATTACGGTGCAGACCTTAATGAGCGGCCAGCGCTGTCCGAACGAT	227
Flybase	254	AATCAAATCAAGGAGCAAATCGTGGTGGTCACCGCGGCAACAGCGGCATTGGCTTCGAA	313
NazgulΔ2-11	228	AATCAAATCAAGGAGCAAATCGTGGTGGTCACCGCGGCAACAGCGGCATTGGCTTCGAA	287
Flybase	314	ATAGCCCAGGCTCTGGCTGGCCGAGTGGCCGATAATCCTCGCCTGCCGCAATCTCGAG	373
NazgulΔ2-11	288	ATAGCCCAGGCTCTGGCTGGCCGAGTGGCCGATAATCCTCGCCTGCCGCAATCTCGAG	347
Flybase	374	GCCGGGAAGCGGGCGGGCCATAATCAAACGTGAGCTGGGCTGCCGCACACCCCTGAAT	433
NazgulΔ2-11	348	GCCGGGAAGCGGGCGGGCCATAATCAAACGTGAGCTGGGCTGCCGCACACCCCTGAAT	407
Flybase	434	TCCTTGGATGAGGATGACAATCCGAGGACAGGTACTTCGTGGAGGCACGCTACTTGGAC	493
NazgulΔ2-11	408	TCCTTGGATGAGGATGACAATCCGAGGACAGGTACTTCGTGGAGGCACGCTACTTGGAC	467
Flybase	494	CTCTGTTTCGCTGCGCAGTGTCCATCCTTTGCCGGCCAGCTGATGGCGGAATTCGAGCGG	553
NazgulΔ2-11	468	CTCTGTTTCGCTGCGCAGTGTCCATCCTTTGCCGGCCAGCTGATGGCGGAATTCGAGCGG	527
Flybase	554	ATCGATGTGCTGGTGAACAATGCCGGAGTGGTATTGCCAACACTCAGATGCCACCGAG	613
NazgulΔ2-11	528	ATCGATGTGCTGGTGAACAATGCCGGAGTGGTATTGCCAACACTCAGATGCCACCGAG	587
Flybase	614	GATGGCTTCGAACGGCACAGCCAGGTGAACACTATCTGGCCCCCTTCCTGTTGACCCACCTG	673
NazgulΔ2-11	588	GATGGCTTCGAACGGCACAGCCAGGTGAACACTATCTGGCCCCCTTCCTGTTGACCCACCTG	647
Flybase	674	CTCCTGCCACACTTGCAACGCTCGGAGCAAGGACGCATCCTCTCGTTTCCGCCCATGCC	733
NazgulΔ2-11	648	CTCCTGCCACACTTGCAACGCTCGGAGCAAGGACGCATCCTCTCGTTTCCGCCCATGCC	707
Flybase	734	CATCAGGGCGCCAAAATCGATTTTCGACGATCCCTGAATGTGGGCACCTGGTCGGTGAAG	793
NazgulΔ2-11	708	CATCAGGGCGCCAAAATCGATTTTCGACGATCCCTGAATGTGGGCACCTGGTCGGTGAAG	767
Flybase	794	TTCCACGCCCGGAAGCATTGGCCACTCCAAGCTCTGCGTGTCTCCTTGCCACCCGTTGG	853
NazgulΔ2-11	768	TTCCACGCCCGGAAGCATTGGCCACTCCAAGCTCTGCGTGTCTCCTTGCCACCCGTTGG	827
Flybase	854	ATGGCCAGGGAAGTGAAGGTACCTCGGTCACGGTCAACTGCTGTACGCCAGGACTCGTC	913
NazgulΔ2-11	828	ATGGCCAGGGAAGTGAAGGTACCTCGGTCACGGTCAACTGCTGTACGCCAGGACTCGTC	887
Flybase	914	CGTGAACCCGCCATTTTCGCAACTCGCCGCTGATGTCGTCCCTCTGCGTGAAGGCGGTC	973
NazgulΔ2-11	888	CGTGAACCCGCCATTTTCGCAACTCGCCGCTGATGTCGTCCCTCTGCGTGAAGGCGGTC	947
Flybase	974	ACCTATCCGTGGATGTGGCTGTTTCATGAAGAATGCCTACGAGGGCGCCAGTGCGCATC	1033
NazgulΔ2-11	948	ACCTATCCGTGGATGTGGCTGTTTCATGAAGAATGCCTACGAGGGCGCCAGTGCGCATC	1007
Flybase	1034	CGCTTGGCCACCGATCCCCAGCTGAAGGAAGTACCAGGAGTACCAATGATTGCGAA	1093
NazgulΔ2-11	1008	CGCTTGGCCACCGATCCCCAGCTGAAGGAAGTACCAGGAGTACCAATGATTGCGAA	1067
Flybase	1094	ATTGCGGCAAGTTCGGTGCAGGGCCAAAGCAAGGAGTTGGCCAAGAAGCTGTATATGCAA	1153
NazgulΔ2-11	1068	ATTGCGGCAAGTTCGGTGCAGGGCCAAAGCAAGGAGTTGGCCAAGAAGCTGTATATGCAA	1127
Flybase	1154	ACCATAAAACCCCTCGAAAGCGTTACCAAGCTAACCGTCGACAGGGAGGAGTACGGCTTG	1213
NazgulΔ2-11	1128	ACCATAAAACCCCTCGAAAGCGTTACCAAGCTAACCGTCGACAGGGAGGAGTACGGCTTG	1187
Flybase	1214	GATTTGCAGCTGGAGATGGAGTCTGAGCTGAGGCTGGAGGAACCGGCGGAAGCGGAACCG	1273
NazgulΔ2-11	1188	GATTTGCAGCTGGAGATGGAGTCTGAGCTGAGGCTGGAGGAACCGGCGGAAGCGGAACCG	1247
Flybase	1274	GAAACGGAAACGAACACCGCAGCGGATGAAAAGAAGTGGCAGGGGAATGGTGAAGCGAAG	1333
NazgulΔ2-11	1248	GAAACGGAAACGAACACCGCAGCGGATGAAAAGAAGTGGCAGGGGAATGGTGAAGCGAAG	1307

Flybase	1334	CAGCCGTAGTCATTGGAGTGATTATGCCTGGCACGCGGCCGAGTTCCTTGGAGACTGC	1393
NazgulΔ2-11	1308	 CAGCCGTAGTCATTGGAGTGATTATGCCTGGCACGCGGCCGAGTTCCTTGGAGACTGC	1367
Flybase	1394	CAACTGCAACG 1404	
NazgulΔ2-11	1368	 CAACTGCAACG 1378	

7.6.3 Sequenzierung 2 der nazgul^{Δ2-11} mRNA

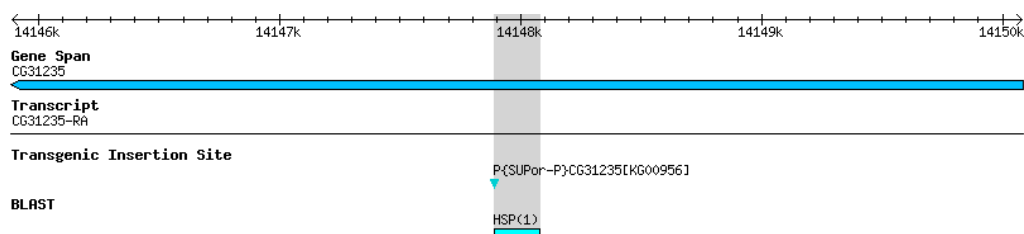
Flybase	74	GGCAGGACCTAACGCGCACCCAGTAGCATCCAAGCATACTCAAGGATGGAACGATTG	133
NazgulΔ2-11	41	 GGCAGGACCTAACGCGCACCCAGTAGCATCCAAGCATACTCAAGGATGGAACGATTG	100
Flybase	134	CTGACCATGTTTCGAGGAGGCGGATCCCTTCGCCACGTGGTGGCCACGATAGCGGCCCTC	193
NazgulΔ2-11	101	 CTGACCATGTTTCGAGGAGGCGGATCCCTTCGCCACGTGGTGGCCACGATAGCGGCCCTC	160
Flybase	194	ACGGTGGGCATTGTGATTACGGTGCAGACCTTAATGAGCGGCCAGCGCTGTCCGAACGAT	253
NazgulΔ2-11	161	 ACGGTGGGCATTGTGATTACGGTGCAGACCTTAATGAGCGGCCAGCGCTGTCCGAACGAT	220
Flybase	254	AATCAAATCAAGGAGCAAATCGTGGTGGTCACCGCGGCAACAGCGGCATTGGCTTCGAA	313
NazgulΔ2-11	221	 AATCAAATCAAGGAGCAAATCGTGGTGGTCACCGCGGCAACAGCGGCATTGGCTTCGAA	280
Flybase	314	ATAGCCCAGGCTCTGGCTGGCCGAGGTGGCCGATAATCCTCGCCTGCCGAATCTCGAG	373
NazgulΔ2-11	281	 ATAGCCCAGGCTCTGGCTGGCCGAGGTGGCCGATAATCCTCGCCTGCCGAATCTCGAG	340
Flybase	374	GCCGGGAAGCGGGCGGCCATAATCAAACGTGAGCTGGGCTGCCGCACACCCCTGAAT	433
NazgulΔ2-11	341	 GCCGGGAAGCGGGCGGCCATAATCAAACGTGAGCTGGGCTGCCGCACACCCCTGAAT	400
Flybase	434	TCC TGGATGAGGATGACAATCCGG GGACAGGTACTTCGTGGAGGCACGCTACTTGGAC	493
NazgulΔ2-11	401	 TCC TGGATGAGGATGACAATCCGG GGACAGGTACTTCGTGGAGGCACGCTACTTGGAC	460
Flybase	494	CTCTGTTTCGCTGCG AGTGTCCATCACTTTGCCGGCCAGCTGATGGCGGAATTCGAGCGG	553
NazgulΔ2-11	461	 CTCTGTTTCGCTGCG AGTGTCCATCACTTTGCCGGCCAGCTGATGGCGGAATTCGAGCGG	520
Flybase	554	ATCGATGTGCTGGTGAACAATGCCGGAGTGGTATTGCCAACACTCAGATGCCAC GAG	613
NazgulΔ2-11	521	 ATCGATGTGCTGGTGAACAATGCCGGAGTGGTATTGCCAACACTCAGATGCCAC GAG	580
Flybase	614	GATGGCTTCGAACGGCACAGCCAGGTGAACATATCTGGCC CTTCCTGTTGACCCACCTG	673
NazgulΔ2-11	581	 GATGGCTTCGAACGGCACAGCCAGGTGAACATATCTGGCC CTTCCTGTTGACCCACCTG	640
Flybase	674	CTCCTGCCACACTTGCAACGCTCGGAGCAAGGACGCATCCTCTTCGTTTCCGCCATGCC	733
NazgulΔ2-11	641	 CTCCTGCCACACTTGCAACGCTCGGAGCAAGGACGCATCCTCTTCGTTTCCGCCATGCC	700
Flybase	734	CATCAGGGCGCCAAAATCGATTTTCGACGATCCCTGAATGTGGGCACCTGGTCGGTGAAG	793
NazgulΔ2-11	701	 CATCAGGGCGCCAAAATCGATTTTCGACGATCCCTGAATGTGGGCACCTGGTCGGTGAAG	760
Flybase	794	TTCCACGCCCGGAAGCATTGGCCACTCCAAGCTCTGCGTGTCTCTTGGCACCCGTTGG	853
NazgulΔ2-11	761	 TTCCACGCCCGGAAGCATTGGCCACTCCAAGCTCTGCGTGTCTCTTGGCACCCGTTGG	820
Flybase	854	ATGGCCAGGGAAGTGAAGGTACCTCGGTCACGGTCAACTGCTGTACGCCAGGACTCGTC	913
NazgulΔ2-11	821	 ATGGCCAGGGAAGTGAAGGTACCTCGGTCACGGTCAACTGCTGTACGCCAGGACTCGTC	880
Flybase	914	CGTGAACCCGCCATTTTCGCAACTCGCCGCTGATGTCGTCCCTCTGCGTGAAGGCGGTC	973
NazgulΔ2-11	881	 CGTGAACCCGCCATTTTCGCAACTCGCCGCTGATGTCGTCCCTCTGCGTGAAGGCGGTC	940
Flybase	974	ACCTATCCGTGGATGTGGCTGTTTCATGAAGAA GCCTACGAGGGCGCCAGTGCGCCATC	1033
NazgulΔ2-11	941	 ACCTATCCGTGGATGTGGCTGTTTCATGAAGAA GCCTACGAGGGCGCCAGTGCGCCATC	1000
Flybase	1034	CGCTTGGCCACCGATCCCCAGCTGAAGGAAGTCACCGCGGAGTACTTCAATGATTGCGAA	1093
NazgulΔ2-11	1001	 CGCTTGGCCACCGATCCCCAGCTGAAGGAAGTCACCGCGGAGTACTTCAATGATTGCGAA	1060
Flybase	1094	ATTGCGG AAGTTCGGTGACGGGCCAAGACAAGGAGTTGGCCAAGAAGCTGTATATGCAA	1153
NazgulΔ2-11	1061	 ATTGCGG AAGTTCGGTGACGGGCCAAGACAAGGAGTTGGCCAAGAAGCTGTATATGCAA	1120
Flybase	1154	ACCATAAAAAACCTT GAAAGCGTTACCAAGCTAACCGTCGACAGGGAGGAGTACGGCTTG	1213
NazgulΔ2-11	1121	 ACCATAAAAAACCTT GAAAGCGTTACCAAGCTAACCGTCGACAGGGAGGAGTACGGCTTG	1180

Flybase	1214	GATTTGCAGCTGGAGATGG	GTCTGAGCTGAGGCTGGAGGAACCGCGGAAGCGGAACCG	1273
NazgulΔ2-11	1181	GATTTGCAGCTGGAGATGG	GTCTGAGCTGAGGCTGGAGGAACCGCGGAAGCGGAACCG	1240
Flybase	1274	GAAACGAAACGAACCAGGCAGCGGATGAAAAGAAGTGGCAGGGGAATGGTGGAGACGAAG		1333
NazgulΔ2-11	1241	GAAACGAAACGAACCAGGCAGCGGATGAAAAGAAGTGGCAGGGGAATGGTGGAGACGAAG		1300
Flybase	1334	CAGCCGTAGTCATTGGAGTGATTTATGCCTGGCACGCGGCCGAGTTCCTTGGAGACTGC		1393
NazgulΔ2-11	1301	CAGCCGTAGTCATTGGAGTGATTTATGCCTGGCACGCGGCCGAGTTCCTTGGAGACTGC		1360
Flybase	1394	CAACTGCAACG	1404	
NazgulΔ2-11	1361	CAACTGCAACG	1371	

7.6.4 Sequenzierung des P-Element Exzisions-Lokus in *nazgul*^{A1-17}

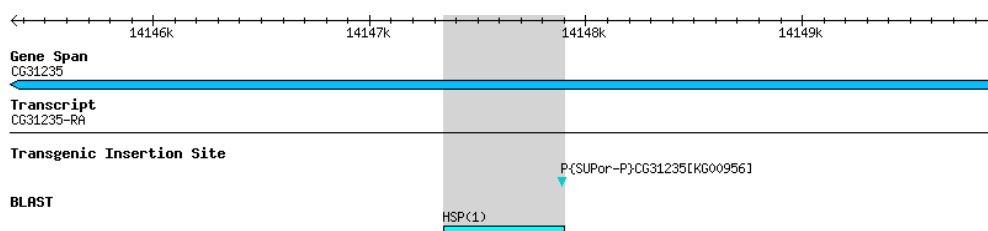
3'-Ende des P-Elements:

CAATGCGCCAGCAAAAAGTGGCCTGAAAATGGGGAAAAAGCGAAGCAGGCAAATTAATGCCTTGGCGAGCGTAC
 AAATCATTGGACATAAAAACGCAGCACCTTGGCAGGTGGAATATGACATGGTCATGGAGATGGAGATGGCCATGA
 AACTGGGGTTGGGCATGTGGATAGGTACTGCTCATGATGAAATAACATAAAGGTGGTCCCGTCGGCAAGAGACATC
 CACTTAACGTATGCTTGAATAAGTGCAGTGAAGGAATAGTATTCTGAGTGTGCTATTGAGTCTGAGTGAGAC
 AGCGATATGATTGTTGATTAACCTTAGCATGTCCGTGGGGTTTGAATTAACCTATAATTAATTAGAGGAAAT
 TATTTTTAAAGTTTTATTTTTAATAATTTGCGAGTACGCAAAGCTTGGCTGCAGGTCGACTCTAGTCGACCTGCA
 GGTCAACGGATCCTACCCTACCACCAACAAAGTCTTTTTGTTTGCCTGCTGAAGTCTGGCTCCGATCAAAAAGCA
 AAAATTTCAATTACAGTCGAATCTCAAGCGACCAGGCGATCTCAAATTTAGCGGATTAAGTTGAACTTTCCTGCA
 CCCAAACAAGATCTTGTGCATAGCTTTATCAACCTACTTCTTGCCTGGTAGTAGTACTCCAGAAAATGTACAGT
 TGTGATATATTTAGAATTTATGCATACTTACATTTTTTCCGCTTTTTTCGCTCAGAAAATGCGTAAACTCTTAAC
 CTCAAAAAAAGTGATTTATGTATTTTTGCTAACATAACTAGAATAAAGTATGATTTGCCACTTGCTCATACTG
 CATGTGGTTTTTTACGCTGTTGCCCTATGTTGTTGTCTTTAAATATTCTTACTTCATCGAGTGTGGTGGGAATAT
 ACCCAGTACGTGTGAGGATTAGTACTGATGCGTGATGAATGCCACACCCGATGCGGGCAT



5'-Ende des P-Elements:

TTCACCTACGTGTACAGCCACTTGATGTCGCTTCCGCTGTTTCATTGCTGTTTTATTGCCGCTGCCCGCAGCAGTT
 GGCCAAGTTTTGGGGCAAGTGGGGTGCTTCCTTGGCCACTAGAGGTGAGCATGTGTTTGTTCGTTAATTTGTT
 TCGACTTTGCCTGGTTTTGTTGTGTTGCCCTTGCAATACAACAAAATTGAGGCATTTGTGCTGAAAGTGCACGCTA
 GCACTATATTTAATTTATTGTTAAAGGTCTATAAATATTTGGCTCCTACATAGGCAAAATGACTACCTTAACTACT
 TGAATTTATTTAGAAAATATTTTCGATAAATGTCGAGTATAGGAATTGCATAACTTAGGTGGATGTATGCTTAC
 ATCATAAACATATCGATAACTCAAGATATTCCAATGGGTATGTTATATCTATACATAAGTCAATCATTTTTTATT
 AGTCAATCCTATTTTATTATAAAATAGGAGCAATGCTCATCTCTACGTTGTAAGATGGCTTGGTTTCTTCGTTGG
 TCACGTGCCACGCCGATAGGAGCAGTACCATGATGAAATAACATAAAGGTGGTCCCGTCGATAGCCGAAGCTTAC
 CGAAGTATACACTTAAATTCAGTGCACGTCTGCTTGTGAGAGGAAAGTTGTGTGCGGACGAATTTTTTTTTG
 AAAACATTAACCCTTACGTGGAATAAAAAAATGAAATATTGCAATTTTGCTGCAAAGCTGTGACTGGAGTA
 AAATTAATTCACGTGCCGAAGTGTGCTATTAAGAGAAAAATGTGGGAGCAGAGCCTTGGGTGCAGCCTTGGTGA
 ACTCCCAAATTTGTGATACCCACTTAAATGATTTCGAGTGAAGCTGCACCTGCAAAAGGTGAGACATTTAAAGG
 AGCGACTCAACGCAGATGCGTACCTAGTAAAGGTGATAGAGCCTGACCAGAAAAGATAAAAGAGCTATACCAGT
 GGGAGTACACAACAGAGTAAGTTTG



Legende:

nazgul Intron 3 (HSP(1))

Inverted repeat

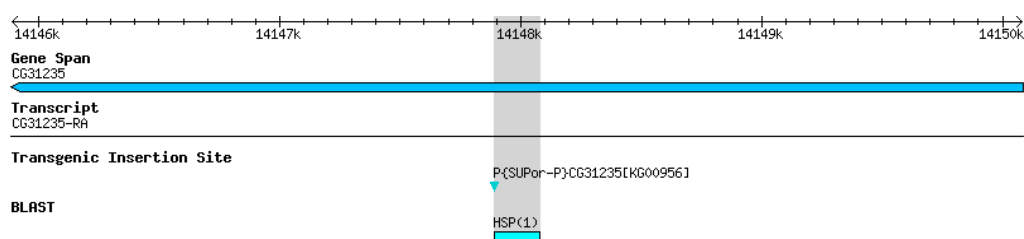
P{SUPor-P}-Sequenz

yellow-Sequenz

7.6.5 Sequenzierung des P-Element Exzisions-Lokus in *nazgul*^{A1-36}

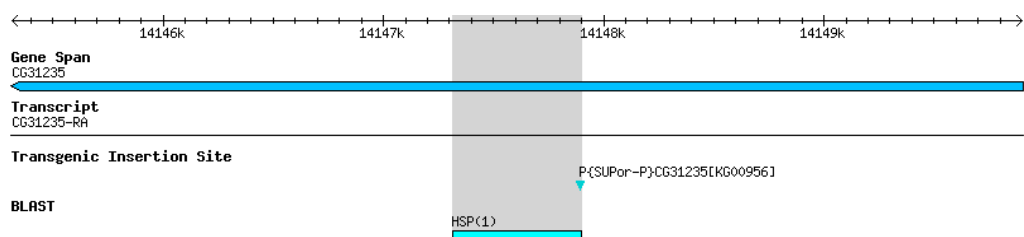
3'-Ende des P-Elements:

ATGCGATAACAATGCGCCAGCAAAAAGTGGCCTGAAAATGGGGAAAAAGCGAAGCAGGCAAATTAATGCCTTGG
 CGAGCGTACAAATCATTGGACATAAAACGCAGCACCTTGGCAGGTGGAATATGACATGGTCATGGAGATGGAGA
 TGGCCATGAAACTGGGGTTGGGCATGTGGATAGGTAAGTCT**CATGATG**AAATAACATAAAGGTGGTCCCGTCCGGCA
 AGAGACATCCACTTAACGTATGCTTGCAATAAGTGGAGTGAAGGAATAGTATTCTGAGTGTCTGATTGAGTCT
 GAGTGAGACAGCGATATGATTGTTGATTAACCGTTAGCATGTCCGTGGGGTTTGAATTAACFCATAATATTAATT
 AGACGAAATTATTTTAAAGTTTATTTTAAATAATTTGGCAGTACGCAAAGCTTGGCTGCAGGTCGACTCTAGT
 CGACCTGCAGGTCAACGGATCTACCCACCACCAACAAAGTCTTTTGTGGCCCGTCTGAAGTCTGGCTCCGA
 TCAAAAAGCAAAAATTTCAATTACAGCCGAATCTCAAGCGACCAGGCGATCTCAAATGAGCGATTAAGTTGAACT
 TTCCCTGCACCCAAACAAGATCTTGTGCATAGCTTTATCAACCTACTTTCTTGCCTGGTAGTAGTACTCCAGAAAA
 TGTACAGTTGTTGATATATTTAGAATTTATGCATGCTTACATTTTTTCCGCTTTTTCCGCTCAAGAAAATTGCGT
 AAACCTTAACCTTCAAAAAAAGTTGATTTATTGTTATTTTTGCTTAACATAACTAGATAAAGTATTGATTTG
 CCACTTGCTCATACGTCCTGTGGTTTTTTTAAACCGCTGTTGCCCTATGTTGTTGTCTTTAAATATTCTTTACATCA
 ATCGAGTGTGTGAGAATATACCCAAGTACCGTGTGTAGGATTATGTTAACCTTGATGCTGATGATGCCACCACCC
 AGATTGGCGGGCATTACATAA



5'-Ende des P-Elements:

TCCGAGCCCGTGGAGAAGCCCGGCTCACATTCACCTACGTGTACAGCCACTTGATGTGCGCTTCCGCTGTTTCAATTTG
 CTGTTTTATTGCCGCTGCCCGCAGCAGTTGGCCAAGTTTTGGGGCAAGTGGGGTGTCTCCTTGGCCACTAGAGGTG
 AGCATGTGTTTGTTCGTTTAAATTTGTTTCGACTTTGCCTGGTTTGTGTTGCCCTTGCAATACAACAAAATT
 GAGGCATTTGTGCTGAAAGTGCAGCCTAGCACTATATTTAATTTATTGTTAAAGGTCTATAAATATTTGGCTCCT
 ACATAGGCAAATGACTACCTTAACTACTTGAATTTATTTAGAAAAATTTTCGATAAATGTCGGAGTATAGGAAT
 TGCATAACTTAGGTGGATGTATGCTTACATCGTAAACATATCGATAACTCAAGATATTCCAATGGGTATGTTATA
 TTCTATACATAAGTCAATCATTTTTATTAGTCAATCCTATTTTATTATAAAATAGGAGCAATGCTCATCTCTACG
 TTGTAAGATGGCTTGGTTTCTTCGTTGGTCACGTGCCACGCCGATAGGAGCAGTACC**CATGATG**AAATAACATAA
 GGTGGTCCCGTCGATAGCCGAAGCTTACCGAAGTATACACTTAAATTCAGTGCACGTTTGCTTGTGAGAGGAAA
 GGTTGTGTGCGGACGAATTTTTTTTTGAAAAATTAACCTTACGTGGAATAAAAAAAAAAATGAAATATTGCAAT
 TTTGCTGCAAAGCTGTGACTGGAGTAAATTAATTCACGTGCCGAAGTGTGCTATTAAGAGAAAATTGTGGGAGCA
 GAGCCTTGGGTGCAGCCTTGGTGAAGACTCCCAAATTTGTGATACCCACTTTAATGATTCCGAGTGGAAAGCTGCA
 CCTGCAAAGTCAACATTTAAAGGAGGCGACTCAACGCAGATGCCGTACCTAGTAAAGTGATAGAGCCTGAAC
 CAGAAAAAGATAAAAAGAAGCTATA



Legende:

nazgul Intron 3 (HSP(1))

Inverted repeat

P{SUPor-P}-Sequenz

yellow-Sequenz

7.6.6 Sequenzierung des P-Element Exzisions-Lokus in *nazgul*^{Δ2-11}

Alignments der *nazgul*^{Δ2-11} Sequenzierung und des dritten Chromosoms von *Drosophila*:

Sequenzierung 1:

```

NazgulΔ2-11 62  GCCTGAAAATGGGGAAAAAGCGAAGCAGGCAAATTAATGCCTTGGCGAGCGTACAAATC 121
|||||
Dmel13R 18322329 GCCTGAAAATGGGGAAAAAGCGAAGCAGGCAAATTAATGCCTTGGCGAGCGTACAAATC 18322270

NazgulΔ2-11 122  ATTTGGACATAAAACGCAGCACCTTGGCAGGTGGAATATGACATGGTCATGGAGATGGAG 181
|||||
Dmel13R 18322269  ATTTGGACATAAAACGCAGCACCTTGGCAGGTGGAATATGACATGGTCATGGAGATGGAG 18322210

NazgulΔ2-11 182  ATGGCCATGAA-----TAGGATGGATAGGTACTGCTCCTATCGGCGTGGCACGT 231
|||||
Dmel13R 18322209  ATGGCCATGAAACTGGGGTTGGATGGATAGGTACTGCTCCTATCGGCGTGGCACGT 18322150

NazgulΔ2-11 232  GACCAACGAAGAAACCAAGCCATCTTACAACGTAGAGATGAGCATTGCTCCTATTTTATA 291
|||||
Dmel13R 18322149  GACCAACGAAGAAACCAAGCCATCTTACAACGTAGAGATGAGCATTGCTCCTATTTTATA 18322090

NazgulΔ2-11 292  ATAAAATAGGATTGACTAATAAAAATGATTGACTTATGTATAGAATATAACATACCCATT 351
|||||
Dmel13R 18322089  ATAAAATAGGATTGACTAATAAAAATGATTGACTTATGTATAGAATATAACATACCCATT 18322030

```

Sequenzierung 2:

```

NazgulΔ2-11 480  AAGTCAATCATTTTTATTAGTCAATCCTATTTTATTATAAAAATAGGAGCAATGCTCATCT 539
|||||
Dmel13R 18322055  AAGTCAATCATTTTTATTAGTCAATCCTATTTTATTATAAAAATAGGAGCAATGCTCATCT 18322114

NazgulΔ2-11 540  CTACGTTGTAAGATGGCTTGGTTTCTTCGTTGGTCACGTGCCACGCCGATAGGAGCAGTA 599
|||||
Dmel13R 18322115  CTACGTTGTAAGATGGCTTGGTTTCTTCGTTGGTCACGTGCCACGCCGATAGGAGCAGTA 18322174

NazgulΔ2-11 600  CCTATCCATCCAA-----TTCATGGCCATCTCCATCTCCATGACCATGTATAT 649
|||||
Dmel13R 18322175  CCTATCCATCCAAACCCAGTTTCATGGCCATCTCCATCTCCATGACCATGTATAT 18322234

NazgulΔ2-11 650  TCCACCTGCCAAGGTGCTGCGTTTTATGTCCAAATGATTTGTACGCTCGCCAAGGCATTT 709
|||||
Dmel13R 18322235  TCCACCTGCCAAGGTGCTGCGTTTTATGTCCAAATGATTTGTACGCTCGCCAAGGCATTT 18322294

NazgulΔ2-11 710  AATTTGCCTGCTTCGCTTTTTCCCATTTTCAGGCCACTTTTGTGGCGCATTTGTTATC 769
|||||
Dmel13R 18322295  AATTTGCCTGCTTCGCTTTTTCCCATTTTCAGGCCACTTTTGTGGCGCATTTGTTATC 18322354

```

7.7 Eidesstattliche Erklärung

Versicherung gemäß §11, Abs.3d der Promotionsordnung

1. Ich habe die als Dissertation vorgelegte Arbeit selbst angefertigt und alle benutzten Hilfsmittel (Literatur, Apparaturen, Material) in der Arbeit angegeben.
2. Ich habe und hatte die als vorgelegte Dissertation vorgelegte Arbeit nicht als Prüfungsarbeit für eine staatliche oder andere wissenschaftliche Prüfung eingereicht.
3. Ich hatte weder die als Dissertation vorgelegte Arbeit noch Teile einer Abhandlung davon bei einer anderen Fakultät bzw. einem anderen Fachbereich als Dissertation eingereicht.

Mainz, den

Andres de Visser