

Falko Drews: Funktion von zyklischen Nukleotiden und zyklisch Nukleotid-gesteuerten Ionenkanälen im visuellen und olfaktorischen System von *Drosophila melanogaster*. 2002

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

In dieser Arbeit wurden zum ersten Mal durch Datenbankanalysen vier Gene identifiziert, die für CNG-Kanaluntereinheiten bei *Drosophila* kodieren. Ein Gen (*Dmcnngb*) wurde aus einer cDNA-Bibliothek isoliert. Es kodiert vermutlich für eine (-Untereinheit eines CNG-Kanals. Das *Dmcnngb*-, *Dmcnnga*- und *Dmcnng3*-Gen wurde mit einem Expressions-Tag versehen. Sowohl *DmCNGA*- als auch *DmCNGB*-Proteine werden in HEK293-Zellen exprimiert. Das *DmCNG3*-Protein war nicht nachweisbar. Mit immunzytochemischen Färbungen kotransfizierter HEK-TSA-Zellen wurden die *DmCNGA*- und *DmCNGB*-Proteine in einigen Zellen kolokalisiert. Die elektrischen Eigenschaften der CNG-Kanäle aus *Dmcnnga*/*Dmcnngb* kotransfizierten Zellen unterscheiden sich nicht von CNG-Kanälen aus Zellen, die nur mit dem *Dmcnnga*-Gen transfiziert wurden.

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

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

In the present study three novel genes (*Dmcnngb*, *Dmcnng3*, *Dmcnng4*) coding for potential CNG channel-subunits were identified by screening the *Drosophila* genome data bank with the *Dmcnnga*-sequence. The cDNA of *Dmcnngb* was cloned by library screening and PCR amplification. The *Dmcnngb*-gene most likely encodes a (-subunit of a CNG channel. The *Dmcnngb*-gene as well as the *Dmcnnga*- and *Dmcnng3*-genes were HA-epitope tagged. Immunostaining of transiently transfected HEK293 cells with either construct revealed that only *DmCNGA* and *DmCNGB*-HA proteins were synthesized. As shown by immunostaining, the cotransfection of HEK-TSA-cells with *Dmcnnga*- and *Dmcnngb*-constructs resulted in a few cells that expressed both proteins. The electrical properties of CNG channels in cotransfected cells, however, were identical to homooligomeric *DmCNGA*-channels. In this study specific antibodies were raised against the *DmCNGA*-subunit. Immunohistochemical stainings of adult *Drosophila* head sections showed that *DmCNGA* is located in the retina. Homooligomeric *DmCNGA*-channels are ~ 50- fold more sensitive to cGMP than to cAMP. An enzyme synthesizing cGMP (soluble guanylyl cyclase) has already been described in the retina. In addition, in this study the nitric oxide synthase was also identified in the *Drosophila* retina. The nitric oxide synthase produces the gaseous messenger NO which is necessary for activation of soluble guanylyl cyclases. Therefore the retina contains the enzymatic components for a cGMP- regulated signaling pathway in which CNG channels probably suit as the downstream targets.