



(19)
Bundesrepublik Deutschland
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) DE 699 23 556 T2 2006.01.26

(12)

Übersetzung der europäischen Patentschrift

(97) EP 1 084 406 B1

(51) Int Cl.⁸: **G01N 33/50** (2006.01)

(21) Deutsches Aktenzeichen: **699 23 556.1**

(86) PCT-Aktenzeichen: **PCT/GB99/01786**

(96) Europäisches Aktenzeichen: **99 955 537.8**

(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: **WO 99/064859**

(86) PCT-Anmeldetag: **07.06.1999**

(87) Veröffentlichungstag

der PCT-Anmeldung: **16.12.1999**

(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: **21.03.2001**

(97) Veröffentlichungstag

der Patenterteilung beim EPA: **02.02.2005**

(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: **26.01.2006**

(30) Unionspriorität:

9812127 06.06.1998 GB

(84) Benannte Vertragsstaaten:

AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LI, LU, MC, NL, PT, SE

(73) Patentinhaber:

**The University Court of the University of Glasgow,
Glasgow, Scotland, GB**

(72) Erfinder:

**KAISER, Kim, Milngavie G62 8DG, GB; ROSAY,
Philippe, Saint Larain, FR; ARMSTRONG,
Douglas, James, Glasgow G20 8BB, GB**

(74) Vertreter:

LEINWEBER & ZIMMERMANN, 80331 München

(54) Bezeichnung: **DETEKTIERUNG NEURALER AKTIVITÄT**

Anmerkung: Innerhalb von neun Monaten nach der Bekanntmachung des Hinweises auf die Erteilung des europäischen Patents kann jedermann beim Europäischen Patentamt gegen das erteilte europäische Patent Einspruch einlegen. Der Einspruch ist schriftlich einzureichen und zu begründen. Er gilt erst als eingelebt, wenn die Einspruchsgebühr entrichtet worden ist (Art. 99 (1) Europäisches Patentübereinkommen).

Die Übersetzung ist gemäß Artikel II § 3 Abs. 1 IntPatÜG 1991 vom Patentinhaber eingereicht worden. Sie wurde vom Deutschen Patent- und Markenamt inhaltlich nicht geprüft.

Beschreibung

[0001] Die vorliegende Erfindung betrifft einen In-situ-Insektenhirngewebe-Test, insbesondere geeignet für Dipteren-Hirngewebe, und Verwendungen solch eines Tests.

[0002] In einem vielzelligen Organismus ist Zellkommunikation essentiell, um die unterschiedlichen Aktivitäten spezialisierter Gewebe zu regulieren. In allen Tierzellen sind intrazelluläre zweite Messenger-Stoffwechselwege konserviert. Unter diesen ist Calcium ein wichtiger zweiter Messenger. In Nervenzellen, Muskelzellen und anderen Zellen reguliert eine Modulation der intrazellulären Calciumaktivität von typischen Konzentrationen im Ruhezustand von 100 nM zahlreiche kurze und längerfristige Prozesse. Calciummessungen sind daher zum Verständnis von normalen Funktionszuständen und von Erkrankungszuständen von großer Bedeutung, und Wirkstoffe, die Calciumsignalisierung modulieren, erwiesen sich bei der Behandlung von zahlreichen verschiedenen Erkrankungen als klinisch nützlich.

[0003] Die Erfinder zeigten die Nützlichkeit eines transgenen Aequorin-Expressionssystems im genetischen Modellorganismus Drosophila auf; Rosay et al. (1997).

[0004] Unter Verwendung des GAL4/UAS-Enhancer-Trap-Systems, basierend auf synthetischen P-Element-Transposons, zeigten die Erfinder der vorliegenden Erfindung, dass es möglich war, Apoaequorin spezifisch in definierten Teilmengen von Zellen des Malpighigefäßes spezifisch zu exprimieren, und dass Inkubation des frisch sezierten Gefäßgewebes in Coelenterazin ausreichend war, um funktionelles Aequorin wiederherzustellen; Rosay et al. (1997).

[0005] Die vorliegende Erfindung basiert auf der überraschenden Entdeckung durch die Erfinder, dass unter Verwendung des zuvor beschriebenen Verfahrens Schwankungen von intrazellulären Calciumkonzentrationen im intakten Drosophila-Gehirn festgestellt werden. Diese Schwankungen sind langfristig, Zelltypen-spezifisch, endogen, robust und synchron, eine Kombination aus Eigenschaften, die nach bestem Wissen des Erfinders der vorliegenden Beschreibung bis dato noch nicht festgestellt werden konnte. Da Calciumschwankungen in diesem System eine Schwankung neuraler Aktivität widerzuspiegeln scheint, kann von anderen Mitteln, durch die neurale Aktivität überwacht werden kann, angenommen werden, dass sie denselben grundlegenden Prozess aufzeigen.

[0006] Calciumschwankungen ähnlicher Dauer konnten in bestimmten Wirbeltiersystemen festgestellt werden, obwohl hier im Zusammenhang mit einzelnen Zellen und nicht mit intakten Geweben, beispielsweise kultivierten Hippocampus-Neuronen (Jaffe (1994); Seymour-Laurent (1995); Ogden (1996)) und Corticalneuronen (Robinson et al. (1993); Wang & Gruenstein (1997)) in Bezug auf das Nervensystem. Manche Zelllinien-Vertreter von peripheren Wirbeltier-Geweben zeigen bei hormoneller Stimulierung Oszillationen in einem Bereich von 5 mHz auf, beispielsweise Hepatozyten, die mit Oxytocin, Vasopressin, Angiotensin-II oder Norepinephrin behandelt wurden (Woods et al. (1986)). Einzelne Bauchspeicheldrüsen-β-Zellen, die mit Glucose behandelt wurden, zeigen große Schwankungen von zytoplasmatischem Natrium und Calcium (Grapengiesser et al. (1988); Grapengiesser (1996)). Bis heute gab es wenig direkte Hinweise auf ähnliche Schwankungen, die in situ auftreten, außer jedoch in Hippocampus-Scheiben, wo dies eher auf Astrozyten und nicht auf Neuronen beschränkt ist (Dani (1995); Duffy (1995)). Den Erfindern der vorliegenden Beschreibung sind keine Berichte in Bezug auf Schwankungen ähnlicher Natur in jedweden Insekten-Nervensystemen bekannt.

[0007] In einem ersten Aspekt stellt die vorliegende Erfindung ein In-situ-Verfahren zum Screenen einer Verbindung auf eine pharmakologische Aktivität bereit, das die folgenden Schritte umfasst:

- Nachweisen eines Anfangsmusters neuraler Aktivität in Insekten- oder Arachniden-Hirngewebe;
- Zusetzen der Verbindung zum Hirngewebe und Nachweisen eines resultierenden Musters neuraler Aktivität; und
- Beobachten der pharmakologischen Aktivität der Verbindung auf neurale Aktivität durch Vergleichen des Anfangsmusters intrazellulärer neuraler Aktivität mit dem resultierenden Muster neuraler Aktivität.

[0008] Ein Vorteil der vorliegenden Erfindung ist, dass das vorliegende Verfahren an intakten Geweben und nicht an kultivierten Zellen durchgeführt wird, was vertretbarerweise eine der Realität eher entsprechende physiologische Reflektion der Wirkungen bereitstellt, die jedes bestimmte Reagens auf neurale Funktion haben kann. Der Zusatz "in situ" wird für Gewebe verwendet, die in einem zu testenden Organismus verbleiben, oder für Gewebe, die vor dem Testen aus einem Organismus seziert wurden.

[0009] Es gilt anzumerken, dass die Bezeichnung "neurale Aktivität" alle messbaren Aspekte neuraler Funk-

tion einbindet, die von Veränderungen der intrazellulären Calciumkonzentration abhängig sind, zu ihnen führen oder gleichzeitig mit ihnen auftreten. Typischerweise kann die "neurale Aktivität" als ein Muster intrazellulärer Calciumschwankung nachgewiesen werden.

[0010] Es gilt anzumerken, dass die Bezeichnung "pharmakologische Aktivität" alle Aktivitäten einbindet, unabhängig davon, ob sie für den Organismus einen Nutzen darstellen oder nicht. Somit kann die Aktivität mit einer therapeutischen Aktivität verbunden werden, oder alternativ dazu kann die Aktivität für den Organismus abträglich oder toxisch, z.B. biozid, sein.

[0011] Der vorliegende Test, wie er für Drosophila-Hirngewebe eingesetzt wird, kann direkt verwendet werden, um chemische Wirkstoffe mit pharmakologischer oder insektizider Wirkung zu screenen. Schwankung neuraler Aktivität kann direkt oder indirekt mittels zahlreicher Verfahren nachgewiesen werden; umfassend, jedoch nicht beschränkt auf: a) transgenes Apoaequorin; b) andere Verfahren, die intrazelluläre Calciumkonzentration beobachten; c) andere Verfahren, die die Vorgänge von intrazellulären Calcium-Signalgebungs-Stoffwechselwegen beobachten; d) Verfahren, die die Vorgänge anderer Arten von Signalgebungs-Stoffwechselwegen beobachten; e) Verfahren, die neuronale elektrische Spannungen beobachten.

[0012] Beispielsweise zeigen fluoreszierende Sonden (wie beispielsweise Fura-2, Indo-1, Quin-2) eine spektrale Reaktion auf die Bindung von Calcium, und es ist dann möglich, unter Verwendung von Fluoreszenzmikroskopie, Durchflusszytometrie und Fluoreszenzspektroskopie Veränderungen der intrazellulären freien Calciumkonzentrationen nachzuweisen. Die meisten dieser fluoreszierenden Indikatoren sind Varianten der nicht-fluoreszierenden Calcium-Chelatbildner EGTA und BAPTA (Cobbold & Rink (1987)).

[0013] Neue fluoreszierende Indikatoren für Calcium, so genannte "Chamäleons", können ebenfalls verwendet werden, werden genetisch ohne Cofaktoren kodiert und können auf spezifische intrazelluläre Stellen gerichtet werden. Diese so genannten "Chamäleons" bestehen aus Tandemfusionen einer blau- oder cyan-emittierenden Mutante des grün fluoreszierenden Proteins (GFP), Calmodulin, dem Calmodulin-bindenden Peptid M13 und einem verstärkten grün- oder gelb-emittierenden GFP. Bindung von Calcium stellt eine Calmodulin-hülle rund um die M13-Domäne her, was den Fluoreszenz-Resonanz-Energietransfer zwischen flankierenden GFP zunehmen (Miyawaki et al. (1997)) oder abnehmen (Romoser et al. (1997)) lässt.

[0014] Darüber hinaus können potentiometrische optische Sonden verwendet werden. Potentiometrische optische Sonden messen Membranspannung in Organellen und in Zellen. In Verbindung mit Bildgebungsverfahren können diese Sonden verwendet werden, um Variationen der Membranspannung entlang von Neuronen und unter Zellpopulationen mit hoher räumlicher Auflösung und Abtastrate abzubilden (Rohr & Salzberg (1994)).

[0015] Mittels eines nicht einschränkenden Beispiels verwendeten die Erfinder der vorliegenden Erfindung die Fruchtfliege (Drosophila) als ein Modell für das vorliegend beschriebene Verfahren und wiesen intrazelluläre Calciumkonzentrationen durch Expression von Apoaequorin im Drosophila-Gehirn unter Steuerung des Hefe-Transkriptionsfaktors, GAL4, nach.

[0016] Das Drosophila-P[GAL4]-Enhancer-Trap-System wird sowohl zur Sichtbarmachung von bestimmten Zellklassen als auch zur Bereitstellung eines Mittels zum Manipulieren dieser Zellen in lebenden Organismen verwendet (Armstrong (1997)). Insertion des P[GAL4]-Transposons, die in der Nähe eines genomischen Transkriptionsenhancers auftritt, führt zur Expression des Hefe-Transkriptionsaktivators GAL4 in einem Muster, das jenes des naheliegenden Enhancers widerspiegelt.

[0017] Durch Platzieren des Calcium-Reporters Aequorin unter GAL4-Steuerung bauten die Erfinder der vorliegenden Erfindung ein System auf, innerhalb dessen schwankende Calciumkonzentrationen nicht-invasiv und mit Zelltyp-Spezifität im intakten Drosophila-Gehirn nachgewiesen werden können. Wie hierin beschrieben wurden Schwankungen in den Pilzkörpern, Gehirnzentren des mit dem Geruchssinn assoziierten Lernens und Erinnerns und für Partnerpräferenzen nachgewiesen. Pilzkörper oder analoge Strukturen sind in allen Insekten zu finden. Im Prinzip ist derselbe Ansatz für schwankende Aktivität in jedem beliebigen Zelltyp anwendbar.

[0018] Das Nachweisen kann an einem ganzen lebenden Organismus durchgeführt werden. Ein geringer Teil der Kutikula des Kopfes kann so entfernt werden, dass der Eintritt erforderlicher Reagenzien wie beispielsweise Coelenterazin (für ein Aequorin-Expressionssystem) ermöglicht wird. Mutierte Organismen, die eine relativ durchlässige und/oder transparente Kutikula besitzen, können auch verwendet werden. Alternativ dazu kann Hirngewebe aus dem Organismus seziert und Reagenzien wie beispielsweise Coelenterazin hinzugesetzt wer-

den.

[0019] Im Fall des Aequorin-Expressionssystems im Drosophila-Gehirn wird Calciumschwankung bald nach Zusatz von Coelenterazin nachweisbar, erreicht ihr volles Ausmaß innerhalb einer Stunde und kann 15 Stunden oder länger andauern. Das Nachweisen kann unter Verwendung einer CCD-Kamera oder mit einem Luminometer oder auch mit jedem beliebigen anderen Lichtdetektionssystem durchgeführt werden.

[0020] Nachdem ein Anfangsmuster neuraler Aktivität, z.B. intrazelluläre Calciumschwankung, nachgewiesen wurde, kann die zu screenende Verbindung zugesetzt und ihre pharmakologische Wirkung auf neurale Aktivität beobachtet werden. Die Verbindung kann natürliche oder synthetische Verbindungen einschließen.

[0021] Die pharmakologische Aktivität kann sich selbst auf zahlreiche Arten manifestieren. Beispielsweise kann die Verbindung für eine bestimmte Dauer zum Aufhören der neuralen Aktivität oder zu Variationen im Aktivitätsmuster oder auch zu beidem führen. Solche Variationen können Zunahme/Abnahme des Schwankungsausmaßes sowie Veränderungen der Frequenz und/oder des beobachteten Wellenmusters einschließen.

[0022] Da ein anfängliches Muster neuraler Aktivität nachgewiesen wird, ist es möglich zu ermitteln, ob die Verbindung auf agonistische oder antagonistische Weise wirkt. Das bedeutet, ob die Verbindung in weiterer Folge Frequenz/Amplitude/Grad neuraler Aktivität steigert oder senkt.

[0023] Das Verfahren findet besondere Anwendung beim Screenen von Verbindungen, die die natürliche neurale Aktivität des Gehirns stören oder auf andere Weise verändern können. Die Veränderung kann ein direktes Resultat der Wirkung der zu screenenden Verbindung auf Calciumdynamik sein, oder die Verbindung kann einen anderen Stoffwechselweg, wie beispielsweise einen Natrium- oder Kaliumkanal, beeinflussen und dadurch eine sekundäre oder resultierende Wirkung auf Calciumdynamik haben.

[0024] Das hierin beschriebene Verfahren findet besondere Anwendung in der Entwicklung von Pestiziden durch Bestimmen der Aktivität möglicher Pestizidverbindungen auf das Nervensystem eines Schädlings, wie beispielsweise das Nervensystem eines Insekts.

[0025] Das hierin beschriebene Verfahren kann auch zur Entwicklung von neuen Wirkstoffen oder neuen Anwendungen für bestehende Wirkstoffe, die wie nachgewiesen pharmakologische Aktivität auf Neuralgewebe aufweisen, führen. Solche Wirkstoffe umfassen Calciumkanalblocker, Anticholinesterasen, Atmungsstimulanzen, Antihypertensiva, Arzneimittel gegen Parkinsonkrankheit, Arzneimittel gegen Alzheimerkrankheit, Arzneimittel gegen Angina; und Arzneimittel gegen Arrhythmie.

[0026] Der Test kann auch verwendet werden, um auf umgebende Giftstoffe zu screenen, die neurale Aktivität stören oder auf andere Weise beeinflussen, beispielsweise Insektizide in Getreide, Boden oder Wasser, das von Feldern abfließt.

[0027] Die Entdeckung von Calciumschwankungen im Insektengehirn führte auch zu weiteren Anwendungen.

[0028] In einem weiteren Aspekt stellt die vorliegende Erfindung ein Verfahren zum Nachweisen eines Calcium-Signalgebungs-mutierten Organismus bereit, worin das Verfahren das Nachweisen eines Musters intrazellulärer Calciumschwankung in Hirngewebe eines Insekten- oder Arachniden-Testorganismus und Vergleichen dieses Musters mit einem Muster intrazellulärer Calciumschwankung in neuralem Gewebe eines nicht-mutierten Organismus umfasst.

[0029] Diese Mutanten können abnormale Oszillationsaktivität aufweisen.

[0030] Solch ein Verfahren kann verwendet werden, um auf natürlich vorkommende oder induzierte Mutationen zu screenen, die Calciumdynamik stört, und kann zur Entdeckung neuer Gene führen, deren Produkte neue Targets für die zuvor erwähnten Wirkstoffklassen sein können, oder zur Entwicklung von Pestiziden.

[0031] In wiederum einem anderen Aspekt stellt die vorliegende Erfindung auch ein Verfahren zur Bewertung einer Wirkung eines exogenen Gens auf das Muster intrazellulärer Calciumschwankung in neuralem Gewebe bereit, wobei das Verfahren das Nachweisen eines Musters intrazellulärer Calciumschwankung in neuralem Gewebe eines Insekten- oder Arachniden-Organismus, der das exogene Gen exprimiert, und das Vergleichen dieses Musters mit einem Muster intrazellulärer Calciumschwankung in neuralem Gewebe eines Organismus ohne dieses exogene Gen umfasst.

[0032] Das exogene Gen kann vorübergehend exprimiert werden, oder der Organismus kann für das bestimmte exogene Gen transgen gemacht werden. Das exogene Gen kann jedes beliebigen Ursprungs sein; insbesondere menschlichen oder tierischen Ursprungs, und kann unter der Annahme ausgewählt werden, dass es endogene Calciumsignalgebung im Nervensystem stören oder auf andere Weise verändern kann. Verbindungen können dann auf deren Wirkung auf Calciumsignalgebung im Expressionshintergrund des fremden Gens getestet werden.

[0033] Darüber hinaus kann es möglich sein, die zwei zuvor beschriebenen Ansätze zu kombinieren. Beispielsweise kann ein bestimmtes Gen in Menschen als möglicherweise für normales neurologisches Funktionieren relevant identifiziert werden. Eine mutierte Drosophila kann erzeugt werden oder kann erhältlich sein, die für das Drosophila-Äquivalent dieses Gens dysfunktional ist. Das menschliche Gen wird dann in der mutierten Drosophila exprimiert, und Verbindungen werden auf deren Wirkung auf Calciumschwankungen im Hintergrund der menschlichen Genexpression getestet.

[0034] Obwohl es zuvor in Verbindung mit Drosophila und Expression des Aequorin-Gens unter Verwendung des GAL4/UAS-Expressionssystems beispielhaft dargestellt wurde, kann solch ein Verfahren leicht auf andere Organismen, die endogene Schwankungen neuraler Aktivität im Gehirn aufweisen, und auf alternative Mittel zum Nachweisen neuraler Aktivität wie zuvor erwähnt (z.B. Calcium und potentiometrische Farbstoffe) ausgedehnt werden.

[0035] Beispielsweise können andere Insektenarten für das Aequorin unter Verwendung geeigneter, auf Transposon basierender Technologien transgen gemacht werden. Weiters kann Apoaequorin unter der Steuerung von Zell- oder Gewebespezifischen Promotoren, entweder direkt oder über ein System wie beispielsweise das GAL4/UAS-System, oder überall und nicht selektiv unter Verwendung von Hitzeschock, Actin oder ähnlichen Promotoren transgen exprimiert werden.

[0036] Das Aequorin kann auch durch vorübergehende (nicht Keimlinien-)Transformation beispielsweise mit einem infektiösen Mittel wie beispielsweise einem Baculovirus-Vektorsystem in Insekten und Adenovirus-systemen in Wirbeltiersystemen exprimiert werden.

[0037] Der allgemeine Ansatz könnte auf das neurale Gewebe jeder beliebigen Insektenart ausgedehnt werden, beispielsweise Insekten, die als Schädlinge erachtet werden und für die eine Kontrolle über sie notwendig ist. Solche Schädlinge umfassen Dictyoptera (Schaben); Isoptera (Termiten); Orthoptera (Heuschrecken, Grashüpfer und Grillen); Diptera (Hausfliegen, Stechmücken, Tsetsefliege, Schnaken und Fruchtfliegen); Hymenoptera (Ameisen, Wespen, Bienen, Sägewespen, Schlupfwespen und Gallwespen); Anoplura (Federlinge und Säugetierläuse); Siphonaptera (Flöhe); und Hemiptera (Wanzen und Blattläuse), sowie Arachniden wie beispielsweise Acari (Zecken und Milben).

[0038] Die vorliegende Erfindung wird unter Verweis auf die folgenden, nichteinschränkenden Beispiele näher beschrieben, worin:

[0039] [Fig. 1](#) Luminometerspuren von Aequorinaktivität in den Pilzkörpern von Drosophila zeigt. Lumineszenz ist in cps x 10⁻¹ angegeben von (a) 103Y-aeq, erwachsenes Gehirn von dem Zeitpunkt des Coelenterazin-Zusatzes weg; (b) 117Y-aeq, erwachsenes Gehirn; (c) 30Y-aeq, erwachsenes Gehirn; (d) 30Y-aeq, HU-abgetragenes erwachsenes Gehirn; (e) 117Y-aeq, ganze Fliege; (f) 117Y-aeq, frühes Puppenhirn; (g) 117Y-aeq, spätes Puppenhirn.

[0040] [Fig. 2](#) zeigt Calciumkanal-Pharmakologie. Repräsentative Spuren von 117Y-aeq erwachsenen Gehirnen. Waagrechter Balken, 5 min. Wirkung von (a) Calcium-freier Ringer-Lösung, (b) Cobalt, (c) Verapamil, (d) Nifedipin und (e) Diltiazem, (f) Dosenreaktionen von Verapamil (Phenylalkylamin) und Diltiazem (Benzothiazepin), chemisch unabhängigen Blockern von L-Typ-Calciumkanälen.

[0041] [Fig. 3](#) zeigt eine Wirkung auf Calciumsignalgebung von Modulatoren von spannungsgesteuerten Natriumkanälen. Waagrechter Balken, 5 min. Wirkung von a) Tetrodotoxin (TTX), b) Veratridin-Behandlung eines 117Y-aeq erwachsenen Gehirns. TTX ist ein Inhibitor von spannungsgesteuerten Natriumkanälen. Veratridin ist ein Natriumkanalöffner.

[0042] [Fig. 4](#) zeigt die Wirkung von spannungsgesteuerten Kaliumblockern auf zytoplasmatische Calciumschwankungen. Repräsentative Spuren von 117Y-aeq erwachsenen Gehirnen. Waagrechter Balken, 5 min. Dosenreaktionen für die Blocker von spannungsgesteuertem Kaliumkanal, (a) 4-AP, Tacrin, (b) TEA, Chinidin,

(c) 4-AP ist ein Blocker des raschen vorübergehenden I_A -Shaker-ähnlichen Stroms, (d) die Shaker-Mutante (Sh^5) ist für eine 4-AP-empfindliche Untergruppe von spannungsgesteuerten Kaliumkanal-Untereinheiten defekt, (e) Wirkung von 4-AP auf die Schwankungsperiode, (f) Tacrin und (g) Chinidin blockieren den verzögerten Gleichrichter- I_K -Strom, (h) TEA wird als Blocker für I_K und I_{CF} , den schnellen, Calcium-aktivierten Strom, beschrieben.

[0043] [Fig. 5](#) zeigt die Wirkung von Calcium-Signalgebung von Reagenzien, die an Neurotransmitter-Rezeptoren und cAMP-Zweitmessenger-Stoffwechselwegen aktiv sind. Repräsentative Spuren von 117Y-aeq erwachsenen Gehirnen. Waagrechter Balken, 5 min. Acetylcholin-Rezeptorenpharmakologie, (a) Reversible Reduktion der Oszillationsamplitude durch Acetylcholin, (b) Dosenreaktion auf Acetylcholin, (c) Nicotin bei 1 μ M ist ausreichend für komplettete Oszillationsunterdrückung. Die Rolle von GABAergen Neuronen bei Calciumschwankungen, (d) GABA steigert sowohl Amplitude als auch Dauer, (e) Picrotoxin, ein GABA-Rezeptorantagonist, hat die entgegengesetzten Wirkungen. Wirkung von Calcium-Signalgebung von Reagenzien, die an cAMP-Zweitmessenger-Stoffwechselwegen reaktiv sind, (f) Forskolin reduziert Oszillationsamplitude im Zusammenhang mit Wildtyp, (g) jedoch weniger effektiv im Rutabaga-Mutantenhintergrund (rut1). Die Rutabaga-Mutante ist in einer Calcium-aktivierten Adenylylcyclase defekt.

MATERIAL UND VERFAHREN

Herstellung von pUAST-Aequorin-Fliegen

[0044] Eine Apoaequorin-cDNA wurde aus dem Plasmid pAQ2 (bei Molecular probes Inc. USA erhältlich) durch doppelten Verdau mit SmaI und PstI extrahiert und in ähnlich gespaltenes pBKS+ (erhältlich bei Stratagene) insertiert. Neuerliche Spaltung mit NotI und KpnI ermöglichte die Insertion in den ähnlich gespaltenen pUAST-Transformationsvektor (Brand & Perrimon (1993)), stromab von den fünf UAS_G-Stellen (GAL4-Bindung), hsp70-TATA-Box und Transkriptionsstartstelle. Keimlinientransformierte Drosophila wurde erzeugt, und zwei funktional äquivalente Linien, UAS_G-aeg30D und UASG-aeg49A, wurden erhalten, die das Transgen an den angegeben zytogenetischen Stellen aufweisen (Rosay et al. (1997)). Neuerliche Mobilisation wurde verwendet, um neue Insertionen am X-Chromosom, an einem CyO-Ausgleichschromosom und am dritten Chromosom zu erzeugen (siehe Tabelle 1).

Drosophila-Verfahren

[0045] Die hierin beschriebenen P{GAL4}-Linien stammen aus einem von Yang et al. (1995; Tabelle 1) beschriebenen Screen. GAL4 ist ein Hefe-Transkriptionsfaktor, der in Drosophila funktionell ist. Sein Expressionsmuster und -zeitpunkt hängen vom genomischen Kontext des insertierten P{GAL4}-Elements ab. GAL4 kann verwendet werden, um Expression von sekundären Reportern, die an den GAL4-reaktiven Promotor, UAS_G, gebunden sind, zu steuern.

Hydroxylharnstoff-Ablation

[0046] HU-Ablation wurde gemäß deBelle & Heisenberg (1994) durchgeführt. Frisch geschlüpfte Larven (30 +/- 30 min. nach dem Larvenschlüpfen) wurden in 4-stündigem Rhythmus mit durch Hitze abgetöteten Hefesuspensionen, die 50 mg/ml HU enthielten, gefüttert. Die Larven wurden dann in Standardmedium ohne HU übertragen. Vergleichsinsekten wurde nur Hefe gefüttert.

Luminometrie

[0047] Gehirne wurden unter Insektensalzlösung (Na^+ , 132 mM; K^+ , 2 mM; Ca^{2+} , 2 mM; Cl^- , 158 mM; Mg^{2+} , 8,5 mM; $H_2PO_4^-$, 4,3 mM; HCO_3^- , 10,2 mM; Glucose, 5 mM; pH eingestellt auf 7,0 mit NaOH) seziert. Jede Luminometerspur stellt ein einzelnes Gehirn dar, das frei in 100 μ l des zuvor beschriebenen Mediums, das 2,5 μ M hcp-Coelenterazin (Molecular Probes) enthält, schwimmt. Lumineszenz wurde in einem Berthold-Wallac-LB9507-Luminometer aufgezeichnet. Es wurden Durchschnitte für die Daten von 5- bis 15-sekündigen Intervallen berechnet. Lumineszenz wird in cps/10 ausgedrückt. Maximale Hintergrundlumineszenz in Abwesenheit von GAL4 belief sich auf 200-400 cps.

Beispiel 1

Endogene Calciumschwankung in den MBs

[0048] Verschiedene neuronale Subtypen der Drosophila-Pilzkörper (MBs) werden durch das P{GAL4}-Enhancer-Trap-System (Yang et al. (1995); Armstrong et al. (1998)) aufgezeigt. Hierzu verwendeten die Erfinder der vorliegenden Erfindung das P{GAL4}-System, um zytosolische Expression von Aequorin (Rosay et al. (1997)), einem Calcium-empfindlichen lumineszierenden Protein, in den MBs zu steuern. Lumineszenz von einem intakten erwachsenen Gehirn (103Y-aeq49A; siehe Tabelle 1 für die Nomenklatur), dem der Aequorin-Co-Faktor hcp-Coelenterazin zugesetzt wurde, geht vorwiegend vom MB-Kelch hervor.

[0049] Zelltypen-spezifische Expression von aktivem Aequorin mit einem Muster, das auf Grundlage jenes Musters von GAL4-gerichteter β -Galactosidase-Expression vorhergesagt wurde, wurde im Zusammenhang mit der P{GAL4}-Linie 103Y, in der Kenyonzellen der erwachsenen Pilzkörper ganz klar aufgezeigt wurden, bestätigt.

[0050] GAL4-gerichtete β -Galactosidase-Aktivität in einem Kryostatfrontalabschnitt des erwachsenen Gehirns (103Y-lacZ) zeigt die Kelche und Zellkörper der gepaarten Pilzkörper auf. GAL4-gerichtete Aequorin-Aktivität in einem ganzen erwachsenen Gehirn (103Y-aeq), das in Schneider-Medium (Sigma), das 2,5 μ M hcp-Coelenterazin enthält, eingelegt ist; 3-minütige Aussetzung gegenüber einer Berthold-Night-Owl-CCD-Kamera (blau), auf eine Helffeldabbildung eingebettet, zeigte die Kelche ganz deutlich auf.

[0051] [Fig. 1a](#) zeigt eine Luminometerspur von Aequorin-Aktivität in einem 103Y-aeq49A-Gehirn. Das Gehirn wurde aus der Kopfkapsel entfernt und in einfache Insektensalzlösung (Ringer-Lösung), die 2,5 μ M hcp-Coelenterazin enthielt, gelegt. Starke Schwankung von Aequorin-Aktivität wurde bei einer durchschnittlichen Dauer im Minutenbereich beobachtet. Die Schwankung erreicht ihr volles Ausmaß nach 30 Minuten, was mit der bekannten Zeitabhängigkeit der Bildung von aktivem Aequorin aus Apoaequorin und Coelenterazin übereinstimmt, und kann 15 Stunden oder länger andauern. Die Amplitude der Wirkung impliziert die überlagerte Lumineszenz zahlreicher KCs, die synchron oszillieren.

[0052] Schwankungen mit den zuvor beschriebenen Eigenschaften wurde im Zusammenhang von mehreren P{GAL4}-Zelllinien beobachtet, die auf der Grundlage von KC-Expression ausgewählt wurden (z.B. [Fig. 1b](#), c). Schwankung kann in der lebenden Fliege beobachtet werden, der keine operative Verletzung zugefügt wurde, unter Ausnahme eines schmalen Schnitts in der Kopfkatikula, um den Eintritt von Coelenterazin zu ermöglichen ([Fig. 1e](#)).

[0053] Innerhalb eines beliebigen Gehirns können Dauer, Amplitude und Wellenform über Stunden hinweg effektiv konstant bleiben. Oszillation tritt, unabhängig von P{GAL4}-Hintergrund und Geschlecht, mit einer mittleren Dauer von 324 ± 13 Sekunden ($n = 88$) auf.

[0054] Experimente, die im Folgenden beschrieben werden, wurden im Zusammenhang mit P{GAL4}-Linien 30Y und 117Y durchgeführt ([Fig. 1b](#), c; Yang et al. (1995); Tettamanti et al. (1997); Armstrong et al. (1998)). Beide zeigen einen großen Anteil der erwachsenen KCs auf, und beide sorgen für Oszillationen mit einheitlich hohen Amplituden. In keinem Fall sind Expressionsmuster ausschließlich auf die Pilzkörper beschränkt.

Beispiel 2

Hydroxylharnstoff-Ablation und Entwicklungsplanung

[0055] Weitere Beweise, dass Oszillation innerhalb von KCs auftritt, wurden durch Untersuchungen an GAL4-aeq-Fliegen bereitgestellt, in denen die KCs selektiv ablatiert worden waren. Die 2.000-3.000 KCs jedes Drosophila-Pilzkörpers entstehen nur von vier Neuroblasten-Vorläufern, die vom mittleren Embryonalstadium bis zum späten Puppenstadium kontinuierlich aktiv bleiben. Gleich nach dem Larvenschlüpfen sind alle anderen Neuroblasten (Balken 1) ruhend, was die KCs auf Ablation durch etappenweises Füttern mit Hydroxylharnstoff (HU) empfänglich macht. HU-behandelte Tiere überleben und entwickeln sich zu gesunden erwachsenen Tieren, denen 90 % oder mehr des normalen Kenyon-Zellkomplements fehlen, und sie sind in deren assoziativen olfaktorischen Lernfähigkeiten stark eingeschränkt (deBelle & Heisenberg (1994)).

[0056] Die Wirkungen auf HU-Behandlung waren drastisch, wie in [Fig. 1d](#) für die Linie 30Y-aeq ($n = 8$) ersichtlich ist. Ähnliche Resultate wurden für die Linie 117Y-aeq erhalten.

[0057] Das Alter, in dem die Oszillation aufzutreten beginnt, wurde in Linie 117Y-aeq untersucht, in der ein signifikanter Anteil der späten Larven- und Puppen-KCs stark den GAL4-Transkriptionsfaktor exprimieren. Oszillation war zuerst zwischen 55 und 69 Stunden nach der Pupariumbildung (APF) nachweisbar und war hier-nach kontinuierlich präsent (vergleiche die [Fig. 1f](#) und g). Dies stimmt mit Entstehungszeitpunkt Erwachsenen-spezifischer Pilzkörperelemente, den α - und β -Lappen, überein.

Beispiel 3

Plasmamembran-Calciumkanäle

[0058] Oszillation endet nach dem Entfernen externen Calciums, entweder durch Pufferersetzung ([Fig. 2a](#)) oder durch Zusatz von 1 mM EGTA (nicht dargestellt). Oszillation tritt unter Zusatz von freiem externen Calcium wieder auf. Von Cobalt wurde berichtet, dass es alle spannungsgesteuerten Calciumkanäle in Drosophila-Ge-hirnmembran-Präparaten blockiert (Pelzer et al. (1989)). Hier wurde nun herausgefunden, dass es eine gradu-elle Pufferwirkung auf Oszillation im Bereich von 1-10 mM hat ([Fig. 2b](#)).

[0059] Wirbeltier-L-Typ-Calciumkanäle werden durch drei chemisch nicht verwandte Gruppen von Verbindun-gen blockiert; Phenylalkalylamine (z.B. Verapamil), 1,4-Dihydropyridine (z.B. Nifedipin) und Benzothiazapine (z.B. Diltiazem), von denen sich jede an eine andere Stelle an der $\alpha 1$ -Untereinheit (Calcium-leitend) bindet. Im Gegensatz dazu scheinen Drosophila-Hirnmembran-Präparate unabhängige Calciumkanäle zu enthalten, die auf Phenylalkalylamine (vorwiegend und mit unüblich hoher Affinität) und 1,4-Dihydropyridine empfindlich sind (z.B. Peltzer et al. (1989)). Sehr geringe spezifische Bindung wird für Diltiazem nachgewiesen. Honigbien-en-KCs zeigen einen Calciumstrom, der durch Verapamil und Nifedipin bei relativ hohen Konzentrationen (100 μ M; Schäfer et al. (1994)) beeinflusst wird.

[0060] Vorliegende Studien zeigten, dass alle drei Gruppen von Mitteln die Oszillationsamplitude signifikant reduzieren ([Fig. 2c-e](#)), und dies bei oder unter den Konzentrationen, die verwendet werden, um Calciumstrome in anderen Drosophila-Systemen zu blockieren (Byerly & Leung (1998); Gielow et al. (1995); Gu & Singh (1995)). Dosen-Reaktionskurven, die aufbauend auf den vor und nach der Behandlung gemessenen Amplitu-den graphisch dargestellt sind, ergeben ein EC₅₀ nahe bei 3 μ M für Verapamil und 10 μ M für Diltiazem ([Fig. 2f](#)). Keines der drei Mittel hatte eine regelmige Wirkung auf die Oszillationsfrequenz.

Beispiel 4

Wirkungen verschiedener Mittel auf Calciumkonzentrationsschwankungen

Natriumkanäle

[0061] Tetrodotoxin (TTX) ist ein effizienter Blocker von spannungsgesteuerten Drosophila-Natriumkanälen und somit von neuronaler elektrischer Aktivität. TTX-empfindliche Natriumstrome werden von Honigbien-en-KCs aufgewiesen (Shafer et al. (1994)). TTX führt zum Enden der Schwankung innerhalb einiger weniger Anwendungszyklen ([Fig. 3a](#)), wobei die präzise zeitliche Planung von der verwendeten Konzentration ab-hängt. Nach einer Zwischenphase, die wiederum von der TTX-Konzentration abhängt, tritt die Schwankung in Form einer Reihe von beabstandeten Schüben mit sehr hoher relativer Amplitude auf. Der erste Peak in jedem Schub ist besonders hoch. Die Schwankung wird durch 1 μ M Veratridin, einem Natriumkanalffner, unterbun-den ([Fig. 3b](#)), was mit einer ständigen Erhöhung der Basislinien-Calciumkonzentration einhergeht.

Kaliumkanäle

[0062] Pharmakologische Kriterien wurden verwendet, um mehrere spannungsaktivierte Kaliumstrome in Drosophila zu identifizieren, wobei die relativen Beiträge davon von dem Zellkontext abhängen. 4-Aminopyridin (4-AP) blockiert einen raschen vorergehenden spannungsgesteuerten Strom (IA-ähnlich) in kultivierten Dro-sophila-Larven-ZNS-Neuronen (Solc & Aldrich (1988)), und noch stärker in kultivierten Drosophila-Larven-KCs (Wright & Zhong (1995)) und in isolierten erwachsenen Honigbienen-KCs (Shafer et al. (1994)). Vorliegende Studien zeigen, dass 4-AP die Oszillationsamplitude auf dosenabhangige Weise reduziert ([Fig. 4a](#); EC₅₀ ~ 30 μ M). Es gibt auch eine dosenabhangige Reduktion von Oszillationsdauern ([Fig. 4e](#)).

[0063] Nicht-IA-ähnliche Drosophila-Kaliumkanäle scheinen alle durch Tetraethylammoniumacetat (TEA) blo-ckiert zu sein (Gho & Mallert (1986); Wu & Ganetzky (1992)). Die Erfinder der vorliegenden Erfindung haben erkannt, dass 100 μ M TEA Oszillationen vollständig unterbinden ([Fig. 4h](#)). EC₅₀ für TEA ist ~ 70 μ M ([Fig. 4b](#)).

Tacrin und Chinidin, Blocker von verzögerten spannungsgerichteten Gleichrichter-Strömen (I_K -ähnlich; Singh & Wo (1989); Kraliz & Singh (1997); Kraliz et al. (1997)) reduzieren sowohl Oszillationsamplitude als auch -frequenz noch stärker ([Fig. 4f](#), g; EC₅₀ für Tacrin beläuft sich auf etwa 1 μ M, Chinidin auf 2 μ M). Honigbienen-KCs zeigen einen verzögerten Gleichrichtertyp-Strom auf, der auf TEA nur schwach reaktiv ist, der jedoch durch 100 μ M Chinidin blockiert wird (Shäfer et al. (1994)). Da jedes der obigen Mittel zahlreiche andere Ionenkanäle und/oder andere neuronal wichtige Moleküle modulieren kann, wurden nach diesen Beobachtungen Mutantenstudien wie nachstehend für 4-AP und Shaker beschrieben durchgeführt.

[0064] Der Shaker-(Sh-)Locus definiert eine 4-AP-empfindliche Untergruppe von spannungsgesteuerten Kaliumkanal- α -Untereinheiten. Physiologische Wirkungen von Sh umfassen abnormale A-Typ-Kaliumströme in embryonalen Myozyten, Larven- und Puppenmuskel und zahlreiche assoziierte Defekte in Bezug auf die Neuralkaktivität und die synaptische Übertragung (z.B. Haugland & Wu (1990)). Die Erfinder der vorliegenden Erfindung haben die Wirkungen der Sh⁵-Mutation untersucht. Während Oszillation üblicherweise vor einem Sh⁵-Hintergrund auftrat (bis zu 30 % der Gehirne wiesen überhaupt keine Oszillation auf), war sie auf 4-AP 10-mal weniger empfindlich als die Sh⁺-Kontrolle ([Fig. 4a](#), d).

Neurotransmitter und Modulatoren

[0065] Antenno-glomeruläre Traktfasern (AGT-MB-Zufuhrelemente) in mehreren anderen Insektenarten sind cholinerg, und Calciumbildung kultivierter Honigbienen-KCs zeigte die Gegenwart von Rezeptoren für Acetylcholin (ACh) und Nicotin, die durch α -Bungarotoxin blockiert sind (Bicker & Kreissl (1994)). ACh reduziert die Oszillationsamplitude allmählich auf Dosis-abhängige und reversible Weise ([Fig. 5a](#), b). Nicotin war sehr viel stärker, und 1 μ M waren ausreichend, um die vollständige Unterbindung von Oszillation zu erreichen ([Fig. 5c](#)).

[0066] KC-Dendriten erhalten auch hemmende, GABAerge Zufuhr über immer wiederkehrende äußerliche Elemente (Bicker et al. (1985); Gronenberg (1987)). 1 mM GABA steigert sowohl die Amplitude als auch die Dauer ([Fig. 5d](#)). Picrotoxin, ein GABA-Rezeptorantagonist, hat entgegengesetzte Wirkungen ([Fig. 5e](#)).

cAMP-Stoffwechselweg

[0067] Forskolin, ein Aktivator von Adenylylcyclase, reduziert die Oszillationsamplitude mit geringer Wirkung auf die Periode ([Fig. 5f](#)). 1 mM Dibutyryl-cAMP war jedoch wirkungslos. Das Rutabaga-Gen kodiert für eine Calcium-aktivierte Adenylylcyclase, die in den Pilzkörpern stark exprimiert wird und die eine nachgewiesene Rolle im Lernen und Speichern der Drosophila spielt (Han et al. (1992)). Oszillation vor einem rut¹-Hintergrund war auf Forskolin weitgehend unempfindlich ([Fig. 5g](#)).

Tabelle 1

Linie	Chromosomale Position	Verweis
UAS _G -aeqA1	X-Chromosom	Diese Studie
UAS _G -aeq30D	30D	Rosay et al. (1997)
UAS _G -aeq49A	49A	Rosay et al. (1997)
UAS _G -aeqA8	CyO	Diese Studie
UAS _G -aeqA10	Chromosom 3	Diese Studie
UAS _G -aeqA14	Chromosom 3	Diese Studie
P{GAL4}30Y	70E	Yang et al. (1995) Armstrong et al. (1997)
P{GAL4}103Y	2D	Tettamanti et al. (1997)
P{GAL4}117Y	34C	Tettamanti et al. (1997) Armstrong et al. (1998)

Testen auf weitere Verbindungen/Mutationen unter Verwendung des vorliegenden Tests

[0068] Tabelle 2 listet andere Verbindungen auf, die Calciumschwankungen bewirken. Diese umfassen mehrere bekannte Insektizide sowie mehrere Verbindungen von klinischem therapeutischem Nutzen. Das Amnesiac-Gen kodiert für Peptide, von deren Aktivität zumindest teilweise angenommen werden kann, dass sie den cAMP-Stoffwechselweg moduliert.

Tabelle 2

Ziele & Verwendung	Verbindungen	Wirkung auf neurale Aktivität
a. Insektizide		
Atmungskette NDH SDH Entkoppler Neurotransmission ACh-Esterase GABA-A-R-Kanalblocker Glutamat(Cl-)R-Agonist Nicotin-ACh-R-Agonist	Rotenon Thiaproprionil CCCP Paraoxon Fipronil Ivermeitin B1a Imidacloprid Nithiazin Nicotin Spinosad Veratrin Veratridin Resmethrin	BI, AD BI BI,AD AD,FI AD,FI BI,AD AD AD AD AD AD AD BI BI AD,FI
Natriumkanal-Öffner Natriumkanal-Modulator		
b. Menschliche Therapie		
ACh-Esterase, Alzheimer Anästhesie, Schmerz Antileukämie, antineoplastisch Okulare perioperative Wirkstoffe Hypertension, Angina Tachycardien, Arrhythmien Nausea, Psychosen	Taerin Morphin Harringtonin Acetylcholin Nefedipin Verapamil Diltiazem Chinidin Trifluoroperazin	AD,FI AD,FI AD AD AD AD AD AD,FI AD,BD
c. Anderes		
Adenylylcyclase Calcium-ATPase Calciumkanal-Antagonist Calmodulin-Antagonist GABA-A-R-Kanal-Agonist GABA-A-R-Kanal-Blocker Nicotin-ACh-R-Antagonist Kaliumkanal-Antagonist Natriumkanal-Antagonist	Forskolin Thapsigargin Cobalt W7 GABA Muscimol Picrotoxin Dihydro-β-Erythroidin Mecamylamin 4-Aminopyridin TEA Tetrodotoxin	AD AD AD AD AI,FD AI,FD AD,FI AD,FD AD,FD AD,FI AD,FI AD
Mutationen	Genprodukt	Wirkung auf neurale Aktivität
Rutabaga Amnesiac Shaker	Adenylylcyclase Neuropeptid Kaliumkanal	Forskolin-unempfindlich A1 4-Aminopyridin

Abkürzungen: A = Amplitude, F = Frequenz, B = Basislinie, D = Abnahme,

I = Zunahme, ACh = Acetylcholin, R = Rezeptor

Literaturverzeichnis

- * Armstrong, J., and K. Kaiser, 1997, Enhancer-trap studies of the Drosophilabrain, in L.M. Houdebine, ed., Transgenic Animals: Generation and Use, Harwood Academic Publishers, p. 365-370.
- * Armstrong, D.J., deBelle, J.S., Wang Z. and Kaiser, K. (1998) Metamorphosis of the mushroom bodies; large scale rearrangements of the neural substrates for associative learning and memory in Drosophila. Learning

and Memory (in press).

- * Bicker, G. and Kreissl, S. (1994) Calcium imaging reveals nicotinic acetylcholine receptors on cultured mushroom body neurons. *J. Neurophysiol.* 71, 808-810.
- * Bicker, G., Schafer, S. and Kingan, T.G. (1985) Mushroom body feedback interneurones in the honeybee show GABA-like immunoreactivity. *Brain Res.* 1985 360, 394-397.
- * Brand, A.H., and Perrimon, N. (1993). Targeted gene expression as a means of altering cell fates and generating dominant phenotypes. *Development* 118, 401-415.
- * Byerly L. and Leung, H.T. (1988) Ionic currents of *Drosophila* neurons in embryonic cultures. *J. Neurosci.* 8, 4379-4393.
- * Cobbold, P.H., and Rink, T.J. (1987) Fluorescence and bioluminescence measurement of cytoplasmic free calcium. *Biochem J.* 248, 313).
- * Dani, J., and S. Smith, 1995, The triferring of astrocytic calcium waves by NMDA-induced neuronal activation: Ciba Found Symp., 188, 195-205.
- * deBelle J.S., and Heisenberg, M. (1994). Associative odor learning in *Drosophila* abolished by chemical ablation of mushroom bodies. *Science* 236, 692.
- * Duffy, S., and B. MacVicar, 1995, Adrenergic calcium signalling in astrocyte networks within the hippocampal slice: *J. Neurosci.*, 15, 5535-5550.
- * Gho, M. and Mallart, A. (1986) Two distinct calcium activated K⁺ currents in larval muscle fibers of *Drosophila*. *Pfluegers Arch.* 407, 526-533.
- * Gielow, M.L., Gu, G-G. and Singh, S. (1995) Resolution and pharmacological analysis of the voltage-dependent calcium channels of *Drosophila* larval muscles. *J. Neurosci.* 15, 6085-6093.
- * Grapengiesser E, Gylfe E and Hellman (1988) Glucoseinduced oscillations of cytoplasmic Ca²⁺ in the pancreatic beta-cell. *B Biochem Biophys ResCommun* 1988 151(3): 1299-1304.
- * Grapengiesser E (1996) Glucoseinduces cytoplasmic Na⁺ oscillations in pancreatic beta-cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1996 226(3): 830-835.
- * Gronenberg, W. (1987) Anatomical and physiological properties of feedback neurons of the mushroom bodies in the bee brain. *Exp. Biol.* 46, 115-125.
- * Gu, G-G. and Singh, S. (1995) Pharmacological analysis of heartbeat in *Drosophila*. *J Neurobiol.* 28, 269-280.
- * Han, P-L., Levin, L.R., Reed, R.R., and Davis, R.L. (1992). Preferential expression of the *Drosophila* rutabaga gene in mushroom bodies, neural centers for learning in insects. *Neuron* 9, 619-627.
- * Haugland, F.N. and Wu, C. F. (1990) A voltage-clamp analysis of gene-dosage effects of the Shaker locus on larval muscle potassium currents in *Drosophila*. *J. Neurosci.* 10, 1357-1371.
- * Kraliz, D. and Singh, S. (1997) Selective blockade of the delayed rectifier potassium current by tacrine in *Drosophila*. *J. Neurobiol.* 32, 1-10.
- * Kraliz, D., Bhattacharya, A. and Singh, S. (1997) Blockade of the delayed rectifier potassium current in *Drosophila* by quinidine and related compounds. *J. Neurogenet.* (in press).
- * Miyawaki A, Llopis J, Heim R, McCaffery JM, Adams JA, Ikura M, Tsien RY (1997) Fluorescent indicators for CA2+ based on green fluorescent proteins and calmodulin. *Nature*, 388(6645):882-887).
- * Ogden, D., 1996, Intracellular calcium release in central neurones: seminars in Neurosc., 8, 281-291.
- * Pelzer, S., Barhanin, J., Pauron, D., Trautwein, W., Lazdunski, M. and Pelzer, D. (1989) Diversity and novel pharmacological properties of Ca²⁺ channels in *Drosophila* brain membranes. *FMBO J.* 8, 2365-2371.
- * Rohr, S., and Salzberg, B.M. (1994) Multiple site optical recording of transmembrane voltage (MSORTV) in patterned growth heart cell cultures: assessing electrical behavior, with microsecond resolution, on a cellular and subcellular scale. *Biophys. J.* 67, 1301.
- * Romoser VA, Hinkle PM, Persechini A(1997) Detection in living cells of Ca²⁺- dependent changes in the fluorescence emission of an indicator composed of two green fluorescent protein variants, linked by a calmodulin-binding sequence. A new class of fluorescent indicators. *J Biol Chem* 1997 272(20): 13270-13274.
- * Rosay, P., Davies, S., Yu, Y., Sozen, M.A., Kaiser, K. and Dow, J.A.T. (1997) Cell-type specific calcium signalling in a *Drosophila* epithelium. *J. Cell. Sci.* 110, 1683-1692.
- * Seymour-Laurent, K., and M. Barish, 1995, Inositol 1,3,4-trisphosphate and ryanodine receptor distributions and patterns of acetyl choline – and caffeine-induced calcium release in cultured mouse hippocampal neurons: *J.Neurosci.*, 15, 2592-2608.
- * Shafer, S., Rosenboom, H. and Menzel, R. (1994) Ionic currents of Kenyon cells from the mushroom body of the honeybee. *J. Neurosci.* 14, 4000-4612.
- * Singh, S. and Wu, C-F. (1989) Complete separation of four potassium currents in *Drosophila*. *Neuron* 2, 1325-1329.
- * Solc, C.K. and Aldrich, R.W. (1988) Voltage-gated potassium channels in larval CNS neurons of *Drosophila*. *J. Neurosci.* 8, 2556-2570.
- * Tettamanti, M., Armstrong, J.D., Endo, K., Yang, M.Y., Furukubo-Tokunaga, K., Kaiser, K. and Reichert, H. (1997) Early development of the *Drosophila* mushroom bodies, brain centres for associative learning and me-

mory. Dev. Genes and Evol. 207, 242-252.

* Wang X and Gruenstein EI (1997) Mechanism of synchronized Ca²⁺ oscillations in cortical neurons. Brain Res 767(2): 239-249.

* Woods, N., K. Cuthbertson, and P. Cobbold, 1986, Repetitive transient rises in cytoplasmic free calcium in hormone-stimulated hepatocytes: Nature, 319, 600-602.

* Wright, N.J. and Zhong, Y. (1995) Characterization of K⁺ currents and the cAMP-dependent modulation in cultured Drosophila mushroom body neurons identified by lacZ expression. J.Neurosci. 15, 1025-1034.

* Wu, C-F. and Ganetzky, B. (1992) Neurogenetic studies of ion channels in Drosophila. In 'Ion Channels' Vol.3 (ed. T. Narahashi), Plenum Press, New York, pp. 261-314.

* Yang, M.Y., Armstrong, D.J., Vilinsky, I., Strausfeld, N.J. and Kaiser, K. (1995) Subdivision of the Drosophila mushroom bodies by enhancer-trap expression patterns. Neuron 15, 45-54.

Patentansprüche

1. In-situ-Verfahren zum Screenen einer Verbindung auf pharmakologische Aktivität, das die folgenden Schritte umfasst:

a) Detektion eines Anfangsmusters neuraler Aktivität in Insekten- oder Arachniden-Hirngewebe, worin das Ge- webe in einem Organismus verbleibt oder das Gewebe vor dem Testen aus einem Organismus entfernt wurde; b) Zusetzen der Verbindung zum Hirngewebe und Detektion eines resultierenden Musters neuraler Aktivität; und

c) Beobachten der Auswirkung der pharmakologischen Aktivität der Verbindung auf neurale Aktivität durch Ver- gleichen des Anfangsmusters intrazellulärer neuraler Aktivität mit dem resultierenden Muster neuraler Aktivität.

2. Verfahren nach Anspruch 1, worin die neurale Aktivität als Calciumoszillationsmuster nachgewiesen wird.

3. Verfahren nach Anspruch 1, worin das Muster neuraler Aktivität direkt oder indirekt durch a) ein Verfah- ren, das intrazelluläre Calciumkonzentration überwacht; b) ein Verfahren, das die Funktion von intrazellulären Calcium-Signalstoff-Stoffwechselwegen überwacht; c) ein Verfahren, das die Funktion anderer Arten von Sig- nalstoff-Stoffwechselwegen überwacht; oder d) ein Verfahren, das neurale elektrische Potenziale überwacht, nachgewiesen wird.

4. Verfahren nach Anspruch 2 oder Anspruch 3, Abschnitt a), worin das Verfahren zur Detektion des/der Muster(s) neuraler Aktivität die Expression von Apoaequorin im getesteten Hirngewebe umfasst.

5. Verfahren nach Anspruch 4, worin das Apoaequorin transgen exprimiert wird.

6. Verfahren nach Anspruch 4 oder 5, worin das Apoaequorin von einem Aequorin-Gen unter GAL4-Kon- trolle abgeleitet ist.

7. Verfahren nach einem der Ansprüche 4 bis 6, worin durch den Zusatz von Coelenterazin zum Apoae- quorin exprimierenden Hirngewebe die intrazelluläre Calciumkonzentration nachgewiesen wird.

8. Verfahren nach einem der Ansprüche 4 bis 7, worin Detektion des Musters neuraler Aktivität unter Ver- wendung einer CCD-Kamera, eines Luminometers oder anderer geeigneter Lichtdetektionsmittel erfolgt.

9. Verfahren nach Anspruch 3, Abschnitt a), umfassend die Verwendung fluoreszierender Sonden, die eine spektrale Reaktion bei der Bindung von Calcium zeigen, und das Detektieren von Änderungen der Konzentra- tion an intrazellulärem freiem Calcium unter Einsatz von Fluoreszenzmikroskopie, Durchflusszytometrie oder Fluoreszenzspektroskopie.

10. Verfahren nach Anspruch 9, worin die Fluoreszenzsonde ein so genanntes Chamäleon ist, das eine Tandemfusion einer blau- oder einer cyan-emittierenden Mutante von grün fluoreszierendem Protein (GFP), von Calmodulin, des Calmodulin-bindenden Peptids M13 und eines verstärkten grün- oder gelb-emittierenden GFP umfasst.

11. Verfahren nach Anspruch 3, Abschnitt d), umfassend die Verwendung von potentiometrischen opti- schen Sonden.

12. Verfahren nach einem der vorangehenden Ansprüche, worin Detektion an einem lebenden Organis-

mus erfolgt.

13. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 11, worin Detektion an Hirngewebe erfolgt, das aus einem Organismus entfernt worden ist.

14. Verfahren nach einem der vorangehenden Ansprüche, worin der Zusatz der Verbindung zu einer Beendigung der neuralen Aktivität für eine bestimmte Zeitspanne, zu einer Änderung des Aktivitätsmusters oder zu beidem führt.

15. Verfahren nach Anspruch 14, worin die Änderung eine Zunahme/Abnahme der Oszillationsamplitude oder eine Änderung der beobachteten Frequenz und/oder des beobachteten Wellenmusters ist.

16. Verfahren nach Anspruch 14 oder 15 zur Sicherstellung, ob die Verbindung auf agonistische oder antagonistische Weise wirkt.

17. Verfahren nach einem der vorangehenden Ansprüche, worin die pharmakologische Aktivität mit einer therapeutischen Aktivität in Verbindung steht.

18. Verfahren nach Anspruch 17, worin die therapeutische Aktivität, die der getesteten Verbindung zugeschrieben werden kann, aus der aus einem Calciumkanalblocker; einer Acetylcholinesterase; einem Atmungskettenmodulator; einem Antihypertensivum; einem Arzneimittel gegen Parkinsonkrankheit; einem Arzneimittel gegen Alzheimerkrankheit; einem Arzneimittel gegen Angina und einem Arzneimittel gegen Arrhythmie bestehenden Gruppe ausgewählt ist.

19. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 16, worin die pharmakologische Aktivität mit einer schädlichen oder toxischen Wirkung verbunden ist.

20. Verfahren nach Anspruch 19 zur Verwendung beim Screenen auf ein Pestizid.

21. Verfahren nach Anspruch 19 zur Verwendung beim Screenen auf Umweltgifte.

22. Verfahren nach Anspruch 21, worin die Insekten oder Arachniden aus der aus Dictyoptera; Isoptera; Orthoptera; Diptera; Hymenoptera; Anoplura; Siphonapetra; Hemiptera; und Acari bestehenden Gruppe ausgewählt sind.

23. Verfahren nach Anspruch 22, worin das Insekt aus der Klasse Diptera ausgewählt ist.

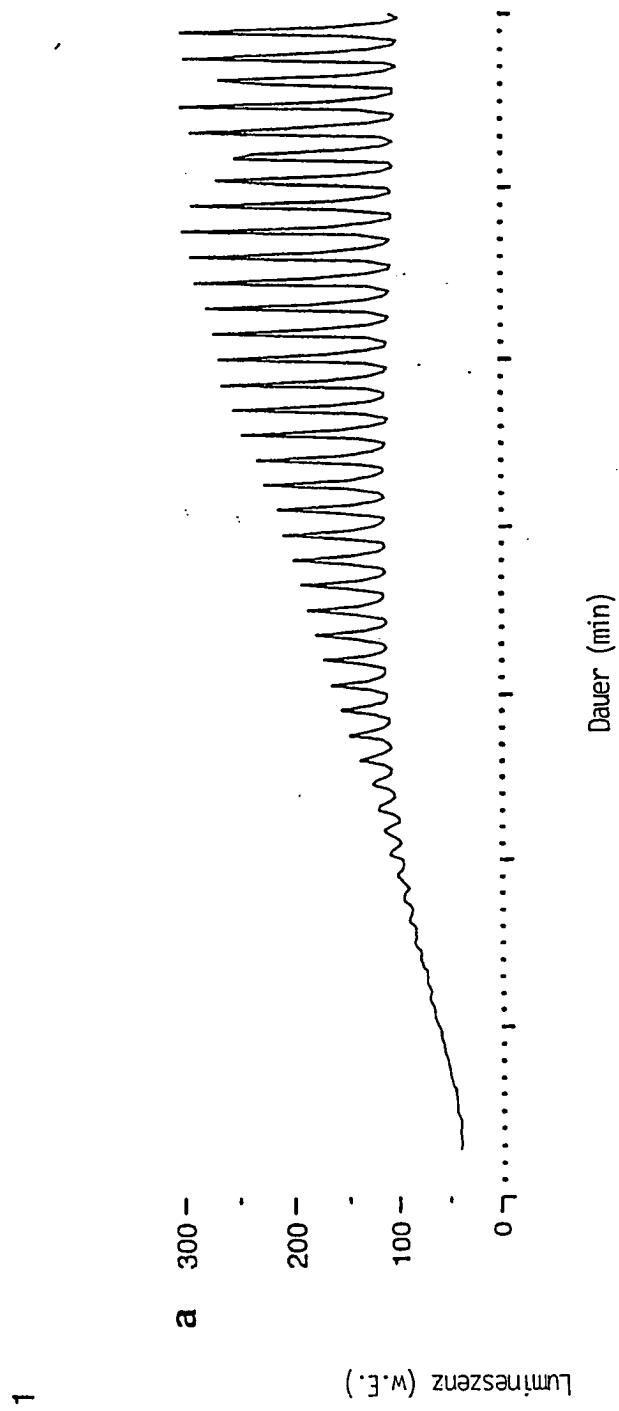
24. Verfahren zur Detektion eines mutierten, Calcium-signalisierenden Organismus, worin das Verfahren die Detektion eines intrazellulären Calciumoszillationsmusters in Hirngewebe eines Insekten- oder Arachniden-Testorganismus und das Vergleichen desselben mit einem intrazellulären Calciumoszillationsmuster in neuralem Gewebe eines nichtmutierten Insekten- oder Arachnidenorganismus umfasst.

25. Verfahren zur Bestimmung einer Wirkung eines exogenen Gens auf ein intrazelluläres Calciumoszillationsmuster in neuralem Gewebe, worin das Verfahren die Detektion eines intrazellulären Calciumoszillationsmusters in neuralem Gewebe eines Insekten- oder Arachnidenorganismus, der das exogene Gen exprimiert, und das Vergleichen des Musters mit einem intrazellulären Calciumoszillationsmuster in neuralem Gewebe eines Insekten- oder Arachnidenorganismus ohne exogenes Gen umfasst.

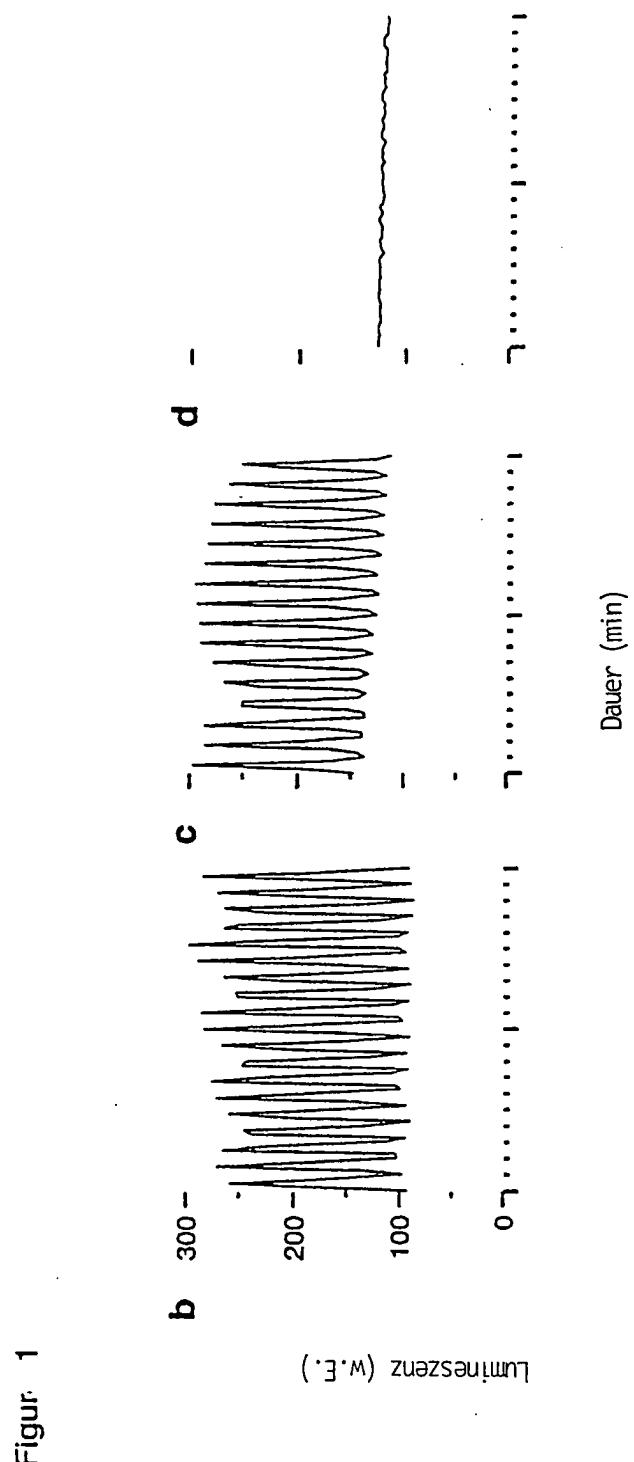
26. Verfahren nach Anspruch 25, worin der das exogene Gen exprimierende Organismus bezüglich eines äquivalenten endogenen Gens dysfunktionell ist.

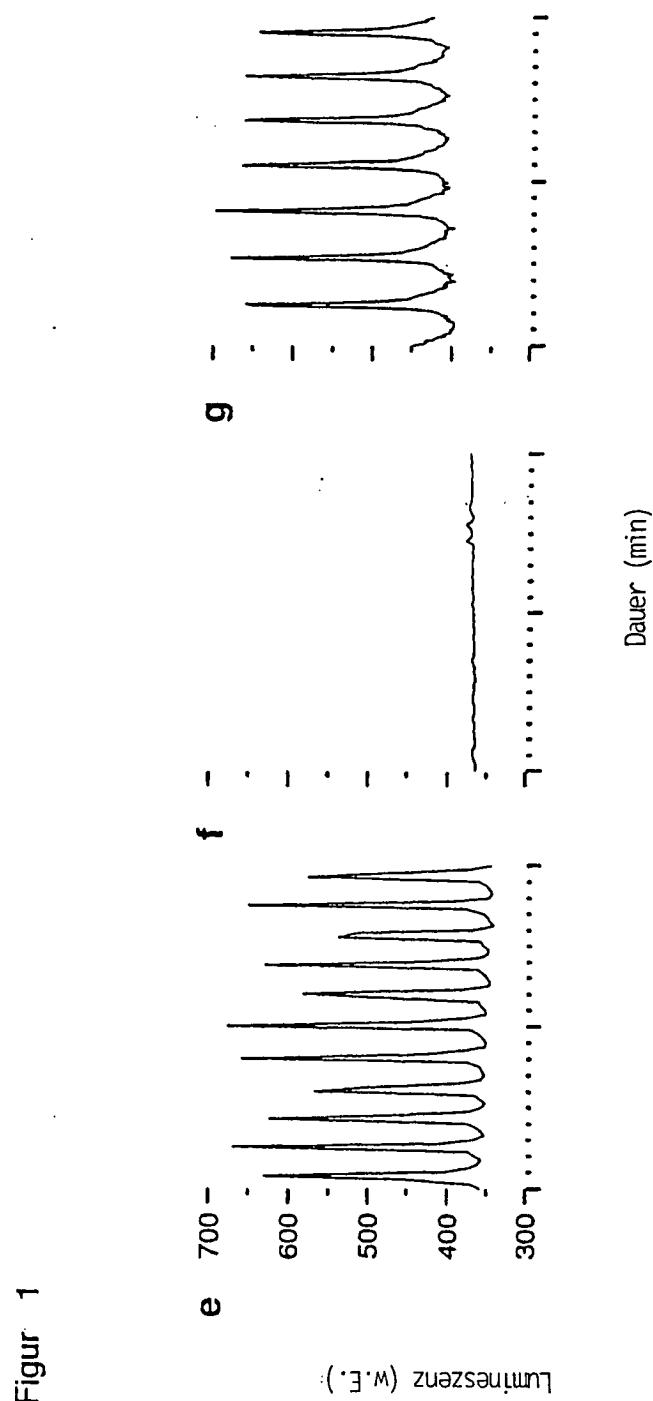
Es folgen 16 Blatt Zeichnungen

Anhängende Zeichnungen

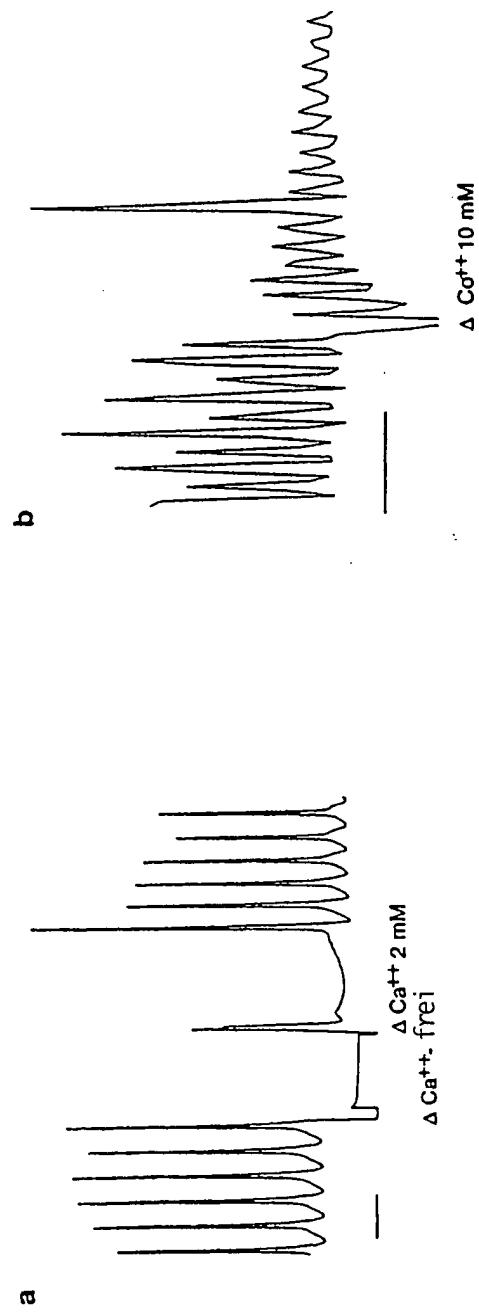


Figur 1

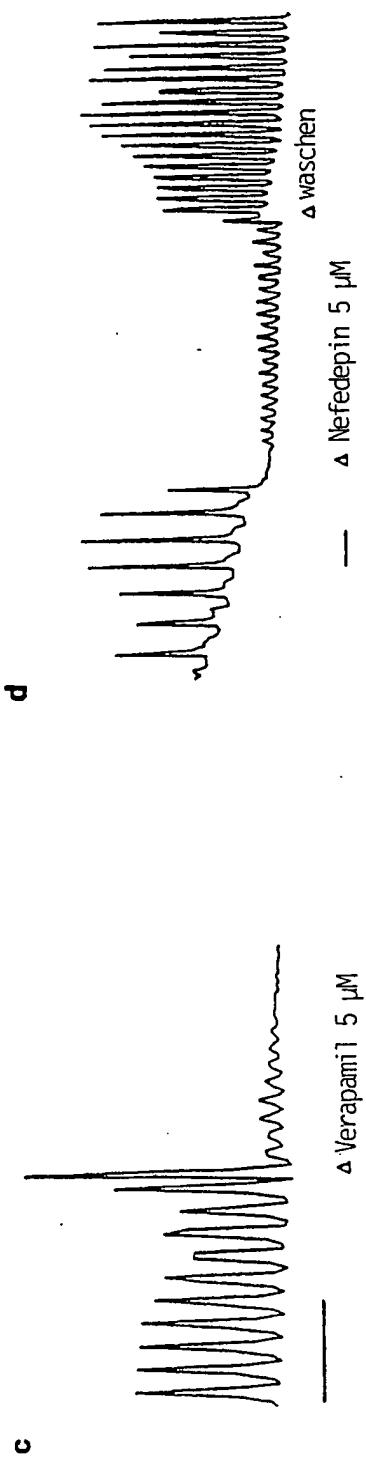


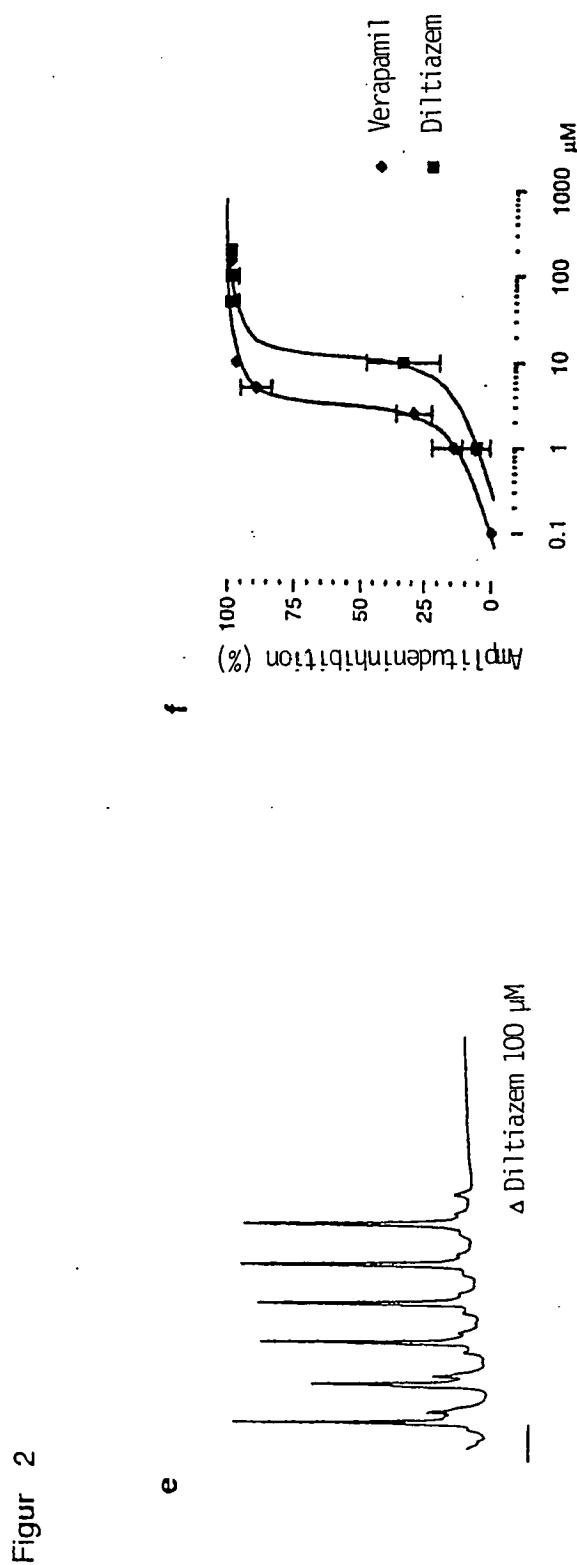


Figur 2



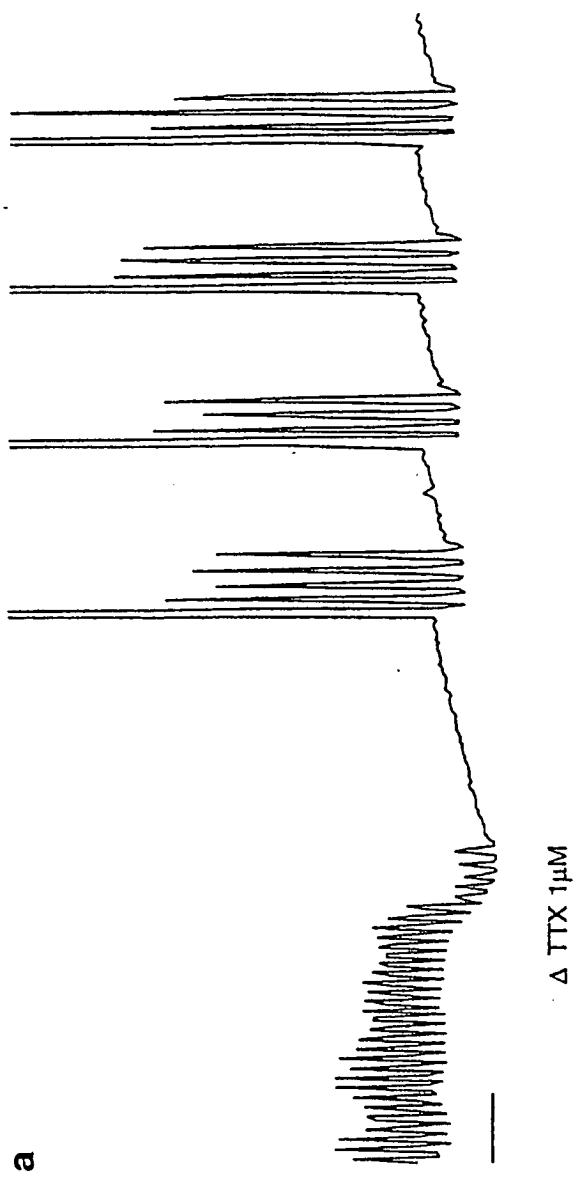
Figur 2





Figur 2

Figur 3



Figur 3

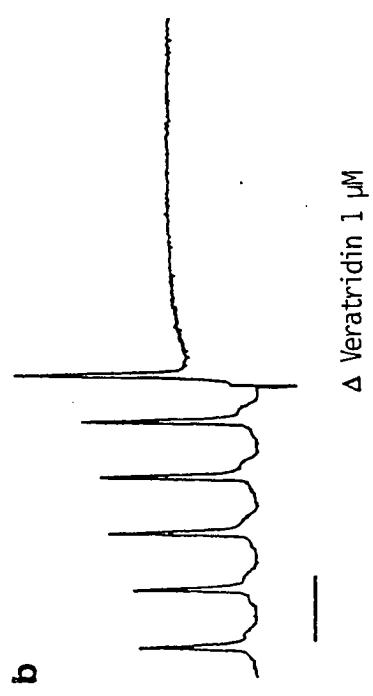
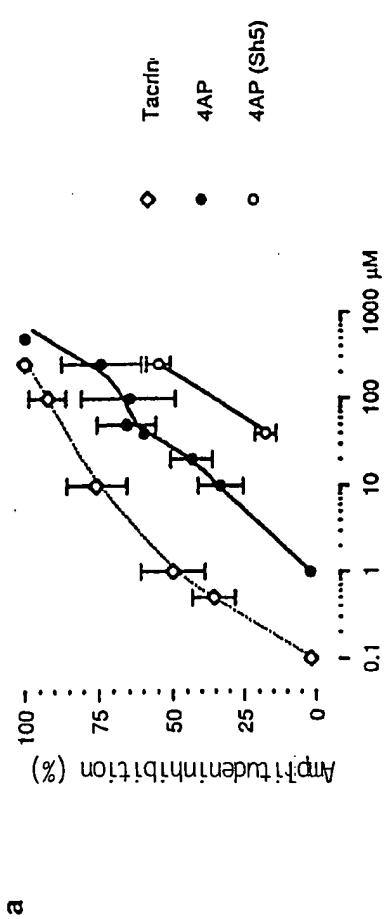


Figure 4



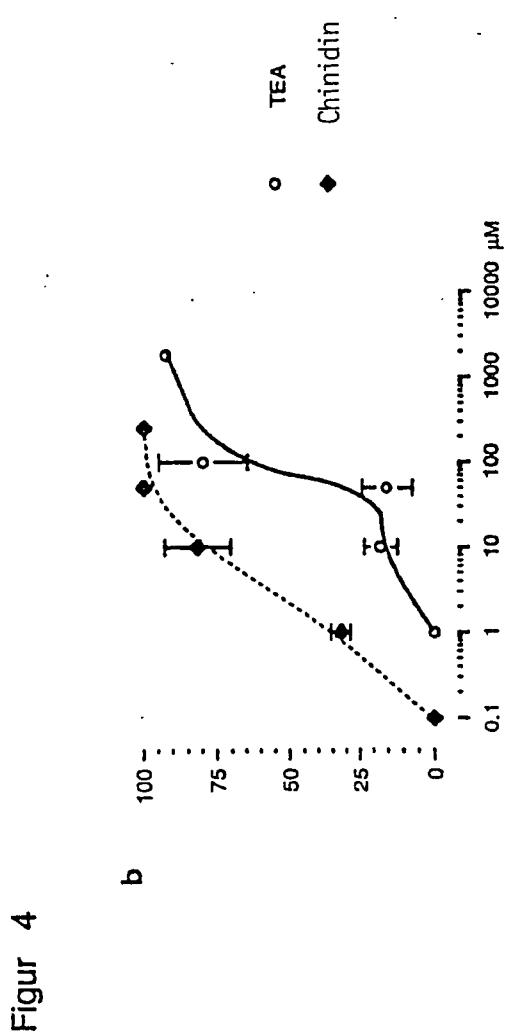
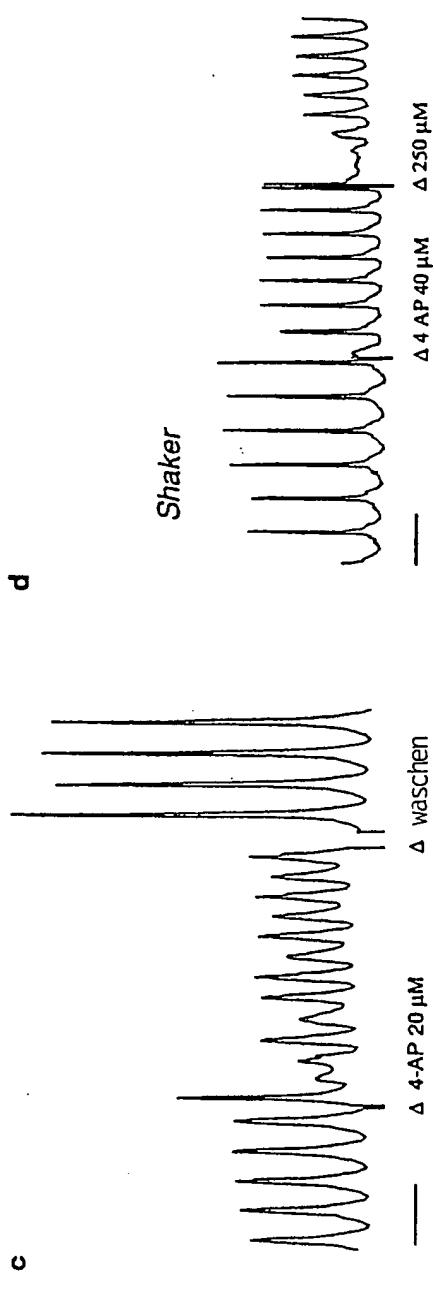
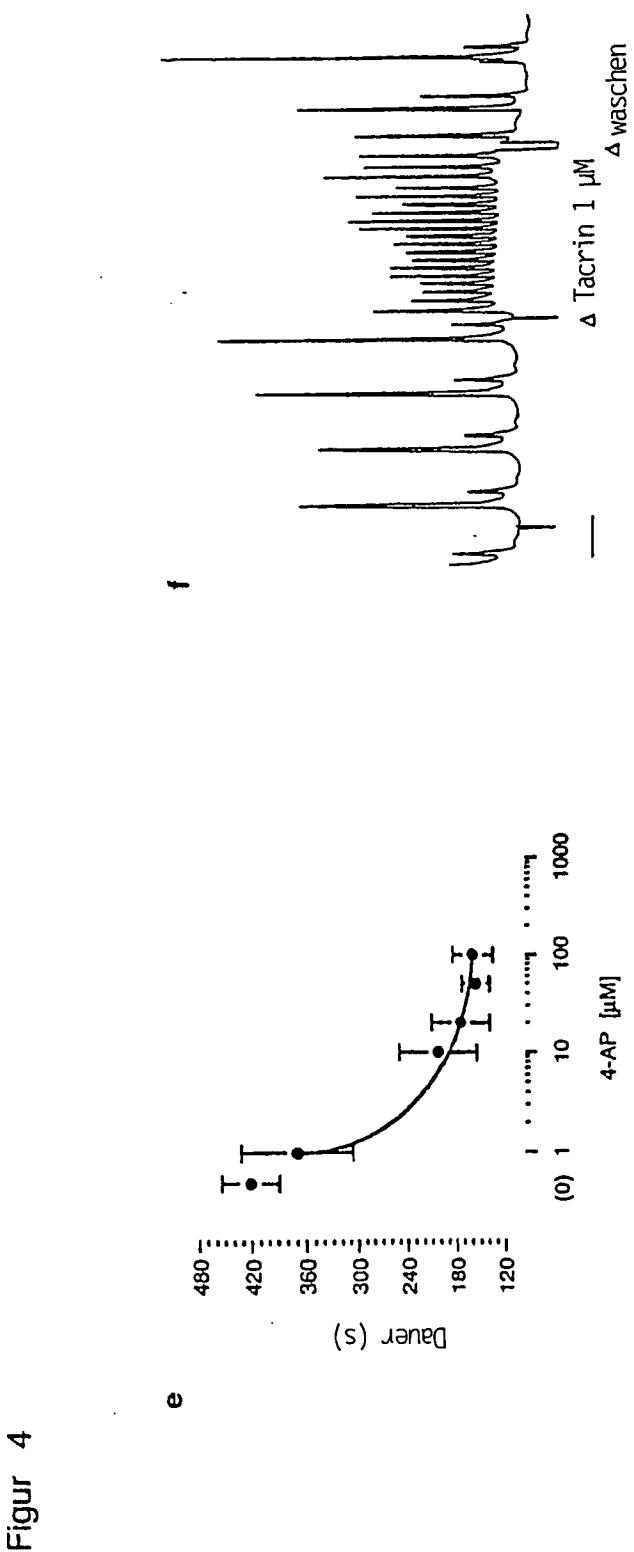


Figure 4

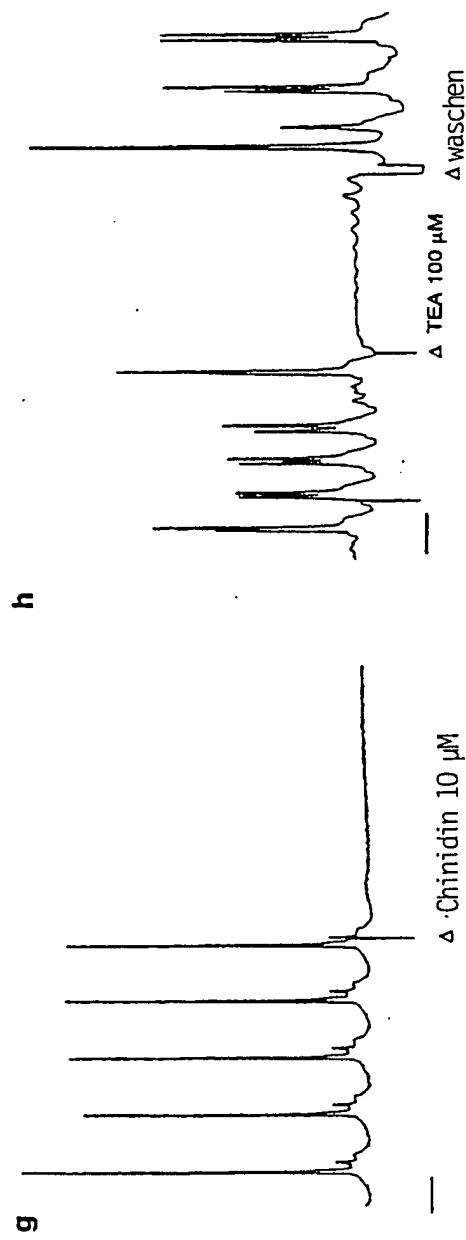
Figure 4





Figur 4

Figur 4



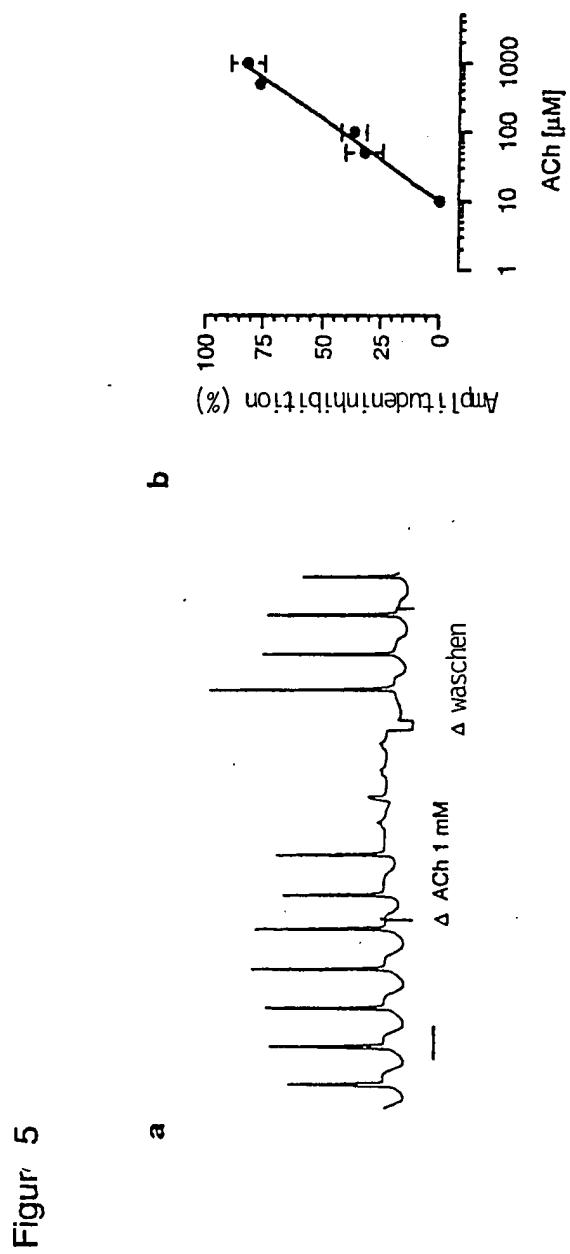
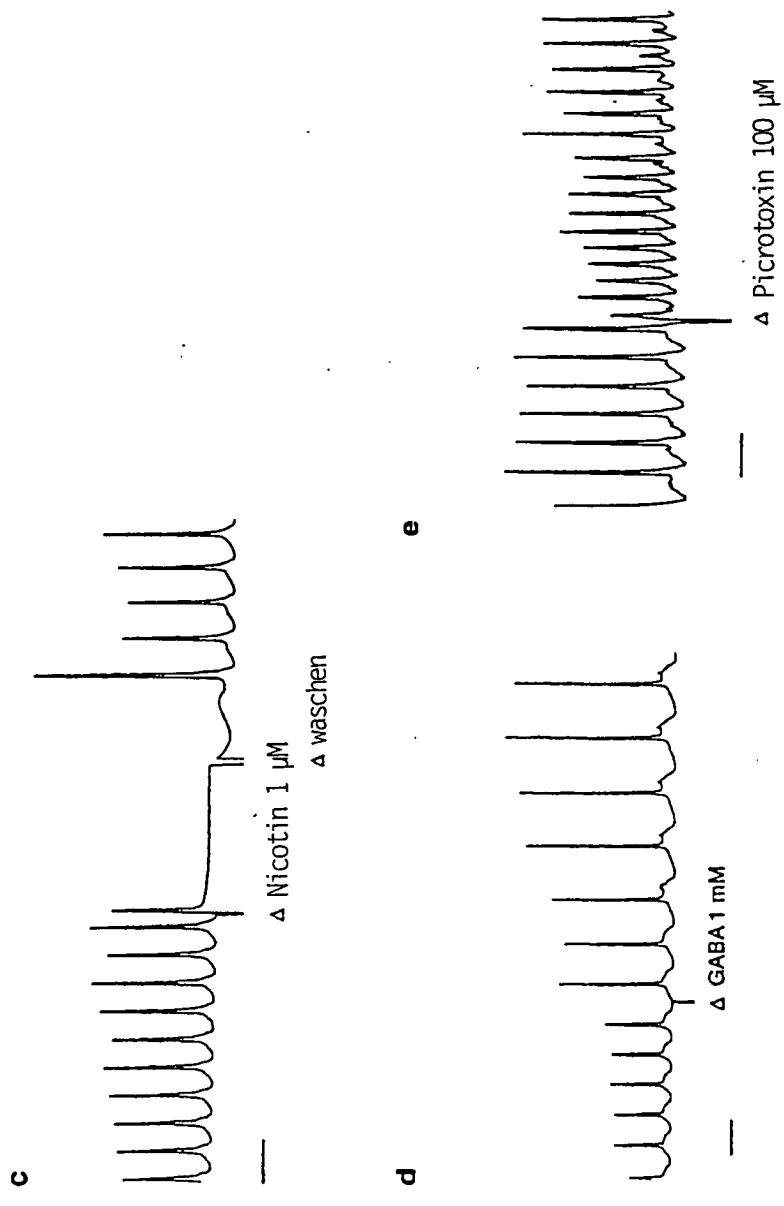


Figure 5

Figur 5



Figur 5

